

Tight Junction-bindendes
C-terminales *Clostridium perfringens* Enterotoxin
für Goldnanopartikel-vermittelte
Optoperforation von Zellen: Neue Methode für
die Krebstherapie

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation

von

Annegret Becker, M. Sc.

2019

Referent: Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo

Korreferent: Prof. Dr. Alexander Heisterkamp

Tag der Promotion: 17.12.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	II
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Zusammenfassung.....	1
Abstract	2
1 Einleitung.....	3
1.1 Tight Junctions.....	3
1.1.1 Claudine – Rückgrat der Tight Junctions	3
1.1.2 Rolle der Claudine bei der Krebsentstehung.....	6
1.2 <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin	8
1.2.1 Interaktion von CPE mit Claudinen	9
1.2.2 CPE-basierte Detektion und Behandlung von Krebszellen.....	11
1.3 Goldnanopartikel-vermittelte Optoperforation von Krebszellen	12
1.4 Zielsetzung der Dissertation.....	15
2 Manuskripte	17
2.1 Manuskript 1	17
2.2 Manuskript 2	33
3 Diskussion und Ausblick	48
3.1 Claudin-Expression in verschiedenen Krebszellen und C-CPE-Bindung.....	48
3.2 Optoperforation von Krebszellen mit C-CPE funktionalisierten AuNP	50
3.3 Parameter der Optoperforation von Krebszellen mit C-CPE-AuNP	54
3.4 Ausblick	60
4 Literaturverzeichnis.....	62
Curriculum Vitae.....	74
Danksagung... ..	76

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
AuNP	Goldnanopartikel
Caco-2	<i>Human colon adenocarcinoma</i>
Calcein AM	Calcein Acetoxymethylester
C-CPE	Carboxylterminus von <i>Clostridium Perfringens</i> Enterotoxin
CH-1/-2	<i>Hexameric complex 1/2</i>
CPE	<i>Clostridium Perfringens</i> Enterotoxin
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
ECL1/2	<i>Extracellular loop 1/2</i>
EGF-Rezeptor	<i>Epithermal growth factor</i> Rezeptor
GNOME-LP	<i>Gold nanoparticle –mediated laser perforation</i>
Hela	Henritta Lacks: <i>Human cervix carcinoma</i>
JAM	<i>Junctional Adhesion Molecules</i>
Ky5e140	<i>Human oesophageal squamous carcinoma</i>
MCF-7	<i>Human mammary adenocarcinoma</i>
MDA-MB-231	<i>Human mammary adenocarcinoma</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NIR	<i>Near-infrared</i>
OD	<i>Overlapping degree</i>
OE-33	<i>Human oesophageal adenocarcinoma</i>
<i>p</i>	Wahrscheinlichkeits-Wert
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDZ	<i>Postsynaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor, Zonula occludens-1</i>
siRNA	<i>Short interfering ribonucleic acid</i>
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
TEER	<i>Transepithelial electrical resistance</i>
TiHoDMglCarc1305	<i>Canine complex mammary adenoma</i>

TiHoDMglCarc1406.1	<i>Canine mammary carcinoma complex type</i>
TiHoDMglRef53A	<i>Canine non-neoplastic mammary tissue</i>
UV-Vis	<i>Ultraviolet-visible</i>
ZO-1	<i>Zonula occludens 1</i>
Z-VAD-FMK	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-(O-methyl)- fluoromethylketone

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Lokalisation und sekundäre Struktur der Claudine sowie die Claudin-Claudin-Interaktionen.....	5
Abbildung 1-2: Funktionelle Regionen von CPE und Struktur von C-CPE ₁₉₄₋₃₁₉	11
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der GNOME-LP und C-CPE funktionalisierten AuNP	16
Abbildung 3-1: GNOME-LP mit 200 nm großen AuNP.....	51
Abbildung 3-2: UV-Vis-Spektrum von Strep-Tactin konjugierten 25 nm großen AuNP.....	52
Abbildung 3-3: Illustration der Überlappung von aufeinanderfolgenden Laserpulsen	56

Zusammenfassung

Tight Junctions sind apikale interzelluläre Proteinverbindungen zwischen Epithelzellen. Die Überexpression von bestimmten Proteinen der Tight Junctions wie z.B. Claudin-3, -4 und -7 ist für einige Krebsarten charakteristisch. In der Krebsdiagnose und -therapie könnten diese Claudine als Marker verwendet werden, um Krebszellen zielgerichtet zu detektieren und behandeln zu können. Das C-terminale Fragment vom *Clostridium perfringens* Enterotoxin (C-CPE) kann spezifisch an diese Claudine binden. In dieser Arbeit wurden Goldnanopartikel (AuNP) mit dem rekombinanten C-CPE (Aminosäuren 194 bis 319) funktionalisiert, um die spezifische Ablation von Claudin-exprimierenden Krebszellen mit der Goldnanopartikel-vermittelten Laserperforation (GNOME-LP) Technik zu etablieren.

Mit der Analyse der Claudin-Expression von verschiedenen Krebszellen mittels quantitativer real-time PCR und Immunfluoreszenz konnten Claudin-3, -4 und -7 positive humane Darm- (Caco-2), Brust- (MCF-7) und Ösophaguskrebszellen (OE-33) sowie Hundeborstkrebszellen (TiHoDM-glCarc1305) identifiziert werden. Die transepithelialen elektrischen Widerstandsmessungen und Lokalisationsstudien zeigten, dass das rekombinante C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ spezifisch an die Claudin-3, -4 und -7 positiven Krebszellen binden konnte. Die Optoperforation von mit 5 µg/ml C-CPE funktionalisierten AuNP behandelten Krebszellen mittels der GNOME-LP Technik tötete über 70 % der Claudin-positiven Krebszellen bei einer Laserfluenz von 60 mJ/cm² und einer Scangeschwindigkeit von 5 mm/s. Nicht-funktionalisierte AuNP verursachten keinen Zelltod. Zusätzlich konnte mit dieser optischen Methode die Struktur von Sphäroiden aus Ösophagus- und Brustkrebszellen in Matrigel geschädigt werden.

Für eine zukünftige *in vivo* Anwendung ist es wesentlich die Zelltod-induzierenden physikalischen und biologischen Mechanismen zu verstehen. Bezogen auf die C-CPE-Funktionalisierung der AuNP, konnte mit einer höheren C-CPE-Konzentration von 20 µg/ml die Tötungseffizienz der Krebszellen mit einer reduzierten Laserfluenz auf 30 mJ/cm² maximiert werden. Unabhängig von der verwendeten Laserfluenz wurde eine maximale Tötungseffizienz bei einer Scangeschwindigkeit von 5 mm/s erreicht. Die Optoperforation von aus Darmkrebszellen bestehenden Sphäroiden im Matrigel zerstörte nachhaltig die Sphäroidstruktur. Sphäroide bestehend aus Ösophaguskrebszellen wurden stärker beschädigt als die optoperforierten Sphäroide mit 5 µg/ml C-CPE funktionalisierten AuNP. Die Betrachtung der biologischen Mechanismen zeigte, dass die GNOME-LP von mit C-CPE-AuNP behandelten Zellen eine Bindung von Annexin V an die Membran und eine reduzierte Aktivität der Mitochondrien aufwies. Die Aktivität der Caspase-3/-7 war in den Zellen nicht erhöht. Die gelelektrophoretische Analyse der DNA nach der Behandlung zeigte keine Apoptose-vermittelte Fragmentierung der DNA. Die Ergebnisse deuten vielmehr auf einen durch die GNOME-LP/C-CPE-AuNP Applikation hervorgerufenen nekrotischen als auf einen apoptotischen Zelltod hin. Damit ist die GNOME-LP mit C-CPE funktionalisierten AuNP eine vielversprechende effiziente Methode zur Ablation von Claudin-positiven Krebszellen. Die Tötungseffizienz sollte zukünftig in Xenotransplantaten erforscht werden, um die optobasierte Methode präziser an *in vivo* Bedingungen anzupassen.

Schlagerworte: Krebszellen, Claudine, C-CPE, GNOME-LP

Abstract

Tight Junctions are apical intercellular protein connections between epithelial cells. The over expression of specific tight junction proteins like claudin-3, -4 and -7 is characteristic for some cancer types. In cancer diagnosis and therapy these claudins can be used as markers to target, detect, and treat cancer cells. The non-cytotoxic C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE) binds specifically on these claudins. In this thesis, gold nanoparticles (AuNPs) were functionalized with the recombinant C-CPE (amino acids 194 to 319) as a tool to establish a new method for a specific ablation of claudin expressing cancer cells by using the gold nanoparticle-mediated laserperforation (GNOME-LP) technique.

Analysis of the claudin expression in different cancer cells with quantitative real-time PCR and immunofluorescence experiments revealed the human colon (Caco-2), breast (MCF-7) and esophagus (OE-33) cell lines as well as the canine mammary cell line (TiHoDMglCarc1305) as claudin-3, -4 and -7 positive cancer cells. Transepithelial electrical resistance measurements and localization experiments showed binding of the recombinant C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ on the claudin-3, -4 and -7 positive cancer cells. The optoperforation of 5 µg/ml C-CPE functionalized AuNPs treated cancer cells by the gold nanoparticle-mediated laser perforation (GNOME-LP) technique killed over 70 % of the claudin-positive cancer cells at a laser fluence of 60 mJ/cm² and a scanning speed of 5 mm/s. The same laser fluence did not kill the cells when incubated with non-functionalized AuNPs. Furthermore, by using the optical method the formation of spheroids composed of esophagus cancer cells or breast cancer cells in Matrigel was reduced.

For future *in vivo* application, it will be crucial to know the physical and biological mechanisms induced by cell death. Regarding the C-CPE functionalization of the AuNPs, increased C-CPE concentration of 20 µg/ml for the C-CPE-AuNP complex formation maximized the killing efficiency with a reduced laser fluence of 30 mJ/cm². Independently of the applied laser fluence, the maximal killing efficiency was achieved at a scanning speed of 5 mm/s. The optoperforation of spheroids composed of colon cancer cells in Matrigel permanently destroyed the complete spheroid formation. The formation of spheroids composed of esophagus cancer cells was more effectively reduced compared to optoperforated spheroids with 5 µg/ml C-CPE functionalized AuNPs. At the biological level, GNOME-LP of C-CPE-AuNPs treated cells showed annexin V binding to the cell membrane and a reduced mitochondria activity. The activity of caspase-3/-7 in the cells was not increased. Gel electrophoretic analysis of the DNA after optical treatment demonstrated no apoptosis-related DNA fragmentation. The results suggest that the GNOME-LP/C-CPE-AuNPs application induced rather necrotic than apoptotic reaction in cancer cells. Finally, the GNOME-LP with C-CPE functionalized AuNPs is a promising efficient approach for ablation of claudin-positive cancer cells. The killing efficiency should be investigated on xenograft in future to rationally adapt the opto-based method for future *in vivo* conditions.

Key words: cancer cells, claudins, C-CPE, GNOME-LP

1 Einleitung

1.1 Tight Junctions

Epithelien sind Zellschichten, die Körperhöhlräume und externe Oberflächen in multizellulären Organismen auskleiden. Ihre Hauptaufgabe ist die Ausbildung einer physikalischen und chemischen Barriere. Beispielsweise agiert die Epidermis als Hautbarriere gegen die äußeren Einflüsse und das intestinale Epithelium stellt eine Barriere gegen bakterielle Toxine im Darmlumen dar (Günzel & Yu 2013). Epithelzellen sind über ihre laterale Membran durch einen Komplex von interzellulären Proteinverbindungen miteinander verbunden. Die apikalsten interzellulären Verbindungen stellen die Tight Junctions dar. An der apikalen lateralen Membrandomäne bilden sie eine kontinuierliche, periphere, gürtelartige Struktur (Förster 2008). Sie formen eine selektive parazelluläre Barriere für Wasser, Ionen, größere Moleküle und andere Zellen. Außerdem sind sie an der Ausbildung der Zellpolarität beteiligt (Guillemot et al. 2008). Diese Funktionen der Tight Junctions sind essentiell für das Epithelium, um verschiedene Kompartimente innerhalb des Körpers auszubilden und die Homöostase zu erhalten (Will et al. 2008). Die Tight Junctions bestehen aus einem Zusammenschluss von mehreren Proteinen, von denen die sogenannten Claudine die Barrierefunktion der Tight Junctions bestimmen.

1.1.1 Claudine – Rückgrat der Tight Junctions

Tight Junctions bilden ein Netzwerk aus Strängen, bestehend aus Claudinen und vielen weiteren Transmembranproteinen inklusive Occludin, Tricellulin und *Junctional Adhesion Molecules* (JAMs) (van Itallie & Anderson 2014). Sie sind über die zytoplasmatischen Adapterproteine Zonula Occludens (ZO) -1, -2, -3 mit dem Zytoskelett verbunden (Umeda et al. 2006). Claudine werden als die Hauptkomponenten der Tight Junctions betrachtet, da sie auch in Abwesenheit von anderen Proteinen der Tight Junctions in der Lage sind, Stränge in heterologen Systemen auszubilden (Furuse et al. 1998). Sie bilden somit das Rückgrat der Tight Junctions und bestimmen maßgeblich die parazelluläre Abdichtung (Chiba et al. 2008; Liu et al. 2016).

Nach Krause et al. (2008) besteht die Familie der Claudine in Säugetieren aus 27 Gen-Mitgliedern. Wobei nicht alle Claudingene in allen Säugetieren existieren. Zum Beispiel kommt Claudin-13 in Nagetieren vor, aber nicht in Menschen (Thompson et al. 2010). Daher geht man heute von 26 humanen Claudinen aus (Günzel & Yu 2013). Die verschiedenen Claudinisoformen werden in einer gewebe- und zellspezifischen Kombination exprimiert, die in einer gewebe- und zellspezifischen

Barrierefunktion der Tight Junctions resultiert (Krause et al. 2008). So kommen Claudin-1, -3, -4, -7 und -8 in zahlreichen Epithelgeweben vor (Günzel & Yu 2013). Beispielsweise werden in den Brustdrüsen (Baumgartner et al. 2017), in dem Ösophagus (Lioni et al. 2007; Takala et al. 2007) sowie im Verdauungs- (Li, J. et al. 2015) und Respirationstrakt (Schlingmann et al. 2015) Claudin-3, -4 und -7 exprimiert. Claudin-2 ist vor allem in durchlässigen Epithelgeweben wie in der Leber und dem proximalen Tubulus der Nieren zu finden. Claudin-5 spielt unter anderem eine wichtige Rolle in den mikrovaskulären zerebralen Endothelzellen (Wang et al. 2017).

Humane Claudine bestehen aus 207 bis 305 Aminosäuren und sind 21 bis 34 kDa groß (Günzel & Yu 2013). Alle Claudine bestehen aus vier Transmembrandomänen, die über zwei extrazelluläre Schleifen (ECL) – die größere ECL1 und die kleinere ECL2 – und eine kleine intrazelluläre Schleife verbunden sind. Die 52 lange Aminosäuresequenz von ECL1 liegt hoch konserviert in den verschiedenen Claudinisoformen vor und weist unter anderem zwei Cysteinreste auf, die vermutlich in die Ausbildung der Barrierefunktion involviert sind (Escudero-Esparza et al. 2011; Krause et al. 2008). Der Carboxyl- und Aminoterminal (C- und N-Terminus) befindet sich im Zytoplasma (Chiba et al. 2008). Der N-Terminus ist mit 7 Aminosäuren kurz. Am 21 bis 63 Aminosäuren langem C-Terminus befindet sich eine PDZ-Domäne (Findley & Koval 2009), über die die Mehrheit der humanen Claudine mit den PDZ-Domänen von Tight Junction-assoziierten Adapterproteinen interagieren kann (Suzuki et al. 2017). Claudin-12, -22, -25 und -27 weisen keine PDZ-Domäne auf (Günzel & Yu 2013). Das Akronym PDZ setzt sich aus PSD95 (*postsynaptic density protein*), Dlg 1 (*Drosophila disc large tumor suppressor*) und ZO-1 zusammen (Subbaiah et al. 2011).

Damit Tight Junction-Stränge ausgebildet werden können, interagieren Claudine miteinander (Abbildung 1-1). Dabei können *cis*-Interaktionen zwischen Claudinen entstehen, die innerhalb einer Zelle entlang der Plasmamembran vorkommen. Die *trans*-Interaktion von Claudinen entsteht zwischen benachbarten Zellen. Die dadurch resultierenden Polymere können entweder aus einer oder aus unterschiedlichen Claudinisoformen gebildet werden. Diese können innerhalb einer Zelle (homomerische bzw. heteromerische *cis*-Interaktion) oder zwischen angrenzenden Zellen (homotypische bzw. heterotypische *trans*-Interaktion) vorliegen. Die *cis*-Interaktion wird über die Transmembrandomänen und den extrazellulären Schleifen der Claudine vermittelt. Diese Oligomerisierung wird bereits im Golgi Apparat oder an der Plasmamembran realisiert. Die *trans*-Interaktion findet zwischen den extrazellulären Schleifen ECL1 und ECL2 der Claudine statt (Krause et al. 2008; Suzuki et al. 2017). Die Claudin-Claudin-Interaktionen können nicht zwischen allen Claudinisoformen entstehen. Bei der *trans*-Interaktion bestimmen Aminosäurereste in den extrazellulären Schleifen und bei *cis*-Interaktionen zusätzlich Aminosäurereste in den Transmembrandomänen, ob homo-

oder heterotypische Interaktionen zwischen Claudinen ausgebildet werden können (Günzel & Fromm 2012).

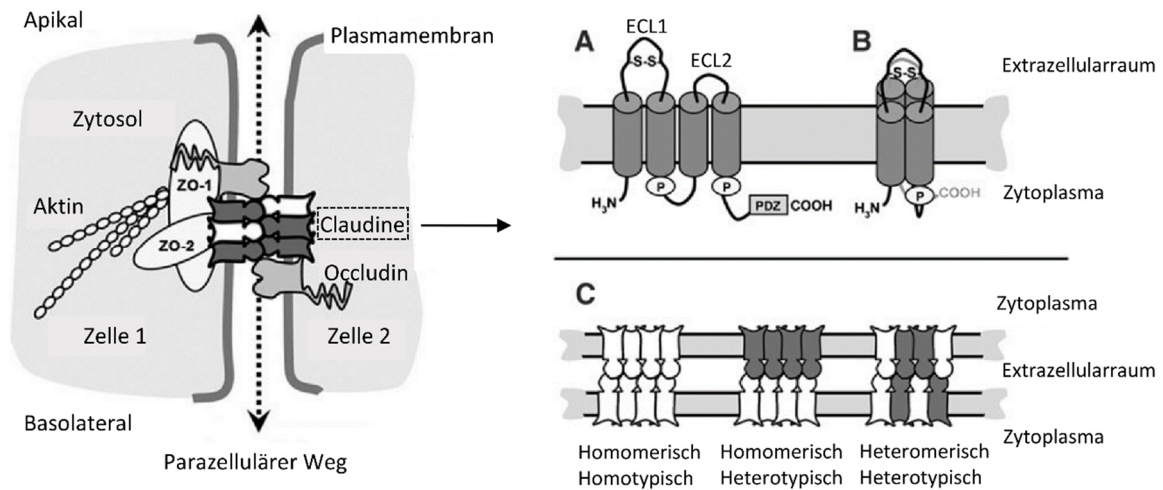


Abbildung 1-1: Lokalisation und sekundäre Struktur der Claudine sowie die Claudin-Claudin-Interaktionen. (A) Typische Claudin-Struktur mit vier Transmembrandomänen, den zwei extrazellulären Schleifen (ECL1 mit putativer Disulfidbindung (S-S) und ECL2) und der PDZ-Domäne am Ende des intrazellulären C-Terminus. Der C-Terminus und die intrazelluläre Schleife mit potentieller Region für die Palmitoylierung (P). (B) Vermutliche Konformation eines Claudins in der Plasmamembran. (C) Klassen der Interaktion zwischen Claudinen innerhalb der Tight Junction-Stränge. Dargestellt sind zwei angrenzende Zellen mit einer Claudinisoform (homomonomerisch/homotypisch) oder verschiedenen Claudinisoformen (homomonomerisch/heterotypisch; heteromonomerisch/heterotypisch). Claudine können in dem Extrazellulärraum über ihre ECLs miteinander (homotypische/heterotypische *trans*-Interaktion) oder in der Plasmamembran derselben Zelle (homomonomerische/heteromonomerische *cis*-Interaktion) interagieren (adaptiert von Overgaard et al. (2011)).

Basierend auf den Eigenschaften der Claudine, parazelluläre Kanäle zu bilden oder die parazelluläre Permeabilität einzuschränken, werden sie in poren- oder barrierebildende Claudine kategorisiert (Overgaard et al. 2011; Krug et al. 2012). Hierbei formt ECL1 von einigen Claudinen die ladungs- und größenabhängigen Poren (Li et al. 2013). Es wird angenommen, dass ein Überschuss an positiv oder negativ geladenen Aminosäureresten im ECL1 zu Ladungsabstoßungen führt und somit Poren entstehen, die entweder für Kationen oder Anionen permeabel sind. Die Verteilung von Aminosäureresten sowie die Anziehungskraft von gegenüberliegenden Aminosäureresten mit unterschiedlicher Ladung im ECL1 erzeugt wahrscheinlich die parazelluläre Abdichtung zwischen Claudinen (Krause et al. 2008).

Eine veränderte Expression von Claudinen auf transkriptionaler oder post-transkriptionaler Ebene kann die Integrität der Tight Junctions beeinflussen (Fujibe et al. 2004; Kwon 2013). Für verschiedene Krebstypen wurde eine reduzierte oder fehlerhafte Ausbildung von Tight Junctions beschrieben (Chiba et al. 2008; Salvador et al. 2016). Daher kann eine fehlregulierte Expression von Claudinen

mit unterschiedlichsten Krebserkrankungen korrelieren oder diese verursachen (Osanai et al. 2017).

1.1.2 Rolle der Claudine bei der Krebsentstehung

Krebs entsteht durch abnormales Zellwachstum mit dem Potential in umliegendes Gewebe einzudringen und sich in andere Körperregionen auszubreiten. Viele Studien konnten im vergangenen Jahrzehnt belegen, dass die Fehlregulierung der Claudine zur Entstehung von Krebs beiträgt (Oliveira & Morgado-Díaz 2007; Ouban & Ahmed 2010; Osanai et al. 2017). Die Expression der Claudine kann z.B. in Brust-, Darm- und Ösophaguskrebs entweder abnormal runter- oder hochreguliert vorliegen (Günzel & Fromm 2012). Die Variabilität der Claudinexpression innerhalb einer Krebsart zeigt wie heterogen diese Krankheit ist. Inwiefern die abnormale Regulierung von Claudinen Krebs verursacht oder eine Folge des erkrankten Gewebes ist, konnte bis heute indessen nicht abschließend geklärt werden (Escudero-Esparza et al. 2011; Tabariès & Siegel 2017). Diese Fehlregulierung von Claudinen führt zu modifizierten Tight Junctions. Analog zur Ausbildung von Zelladhäsionsstrukturen sind Tight Junctions Komponenten von Zellsignalen, die in der Zellproliferation, -differenzierung und -apoptose involviert sind. Aus diesem Grund kann eine fehlerhafte Regulierung der Claudine die parazelluläre Barriere und Zellmotilität modifizieren sowie zu einem Verlust der Zellpolarität führen (Günzel & Fromm 2012). Diese Faktoren begünstigen die Entstehung von pathologischen Neoplasma (Geschwulste) in verschiedenen Organen, wie z.B. im Verdauungstrakt (Osanai et al. 2017).

Die Zellpolarität dient der apikalen und basolateralen Ausrichtung der Epithelzellen und verleiht ihnen somit ihre Morphologie und Funktion. Die Desorganisation oder der Verlust der Zellpolarität durch die beeinträchtigte Barrierefunktion der Tight Junctions führt zur Fehllokalisierung von Rezeptoren, sodass die Zelle irregulär extrazellulären Signalen ausgesetzt ist (Osanai et al. 2017). Als Folge kommt es zu abnormalem Zellwachstum, wenngleich die Zellwachstumssignale wie unter physiologischen Bedingungen richtig reguliert werden (Osanai et al. 2017). Besonders die reduzierte Expression von bestimmten Claudinen in einigen Krebsarten korreliert mit beeinträchtigten Tight Junctions und geht mit dem Verlust der Zellpolarität einher (Li, X.-M. et al. 2015). Zelllinien aus Ösophaguskarzinomen verzeichnen eine reduzierte Claudin-1 und -7 Expression zusammen mit dem Fehlen von Par3 und E-Cadherin (Kitaichi et al. 2017; Lioni et al. 2007). Par3 ist eine Komponente des Zellpolaritätsregulierenden Par-Komplexes (Aranda et al. 2008) und E-Cadherin ein transmembranes Zelladhäsionsprotein (van Roy 2014). Der Verlust von beiden Proteinen führt zur Desorientierung der Zellmorphologie und erhöht so die Invasion und Metastasenbildung von Krebszellen in umliegendes Gewebe (Usami et al. 2006; Kitaichi et al. 2017). Ein verringertes Vorkommen von Claudin-

3, -4 und -7 zeichnet den Brustkrebssubtypen *Claudin-low* aus. Der *Claudin-low* Subtyp zeigt zusätzlich keine Expression von E-Cadherin und *epithelial growth factor receptor 2* (HER2) (Campbell et al. 2011; Dias et al. 2017). Zudem wurde in dem Subtyp eine Anreicherung von Krebszellen mit *epithelial-to-mesenchymal transition* (EMT) Merkmalen entdeckt (Prat et al. 2010). EMT ist gekennzeichnet durch die genetisch regulierte Transdifferenzierung von polarisierten Zellen zu Mesenchymzellen. Krebszellen, die den EMT-Prozess durchlaufen, weisen weder eine Zellpolarität noch -adhäsion auf. Es wird angenommen, dass EMT die Migration von Krebszellen erhöht und somit die Bildung von Metastasen begünstigt (Tulchinsky et al. 2019). Krebszellen mit EMT-Merkmalen exprimieren außerdem bestimmte Transkriptionsfaktoren, die mit der Chemoresistenz der EMT-Krebszellen assoziiert sein können (Soundararajan et al. 2019; Zhou et al. 2017). Im Gegensatz zu dem *Claudin-low* Subtyp konnte eine erhöhte Expression von Claudin-3 und -4 in hochgradig bösartigen Brustkrebsarten beobachtet werden (Lanigan et al. 2009; Kominsky et al. 2004). Demgegenüber weist niedriggradiges bösartiges Brustkrebsgewebe eine reduzierte Claudin-4 Expression auf (Tokés et al. 2005). Darüber hinaus ist die Expression von Claudin-2 in Brustkrebszellen herab reguliert, aber sich ausbreitende Brustkrebszellen verändern sich hin zu einem Phänotyp mit einer erhöhten Claudin-2 Expression, sobald sie in die Leber gelangen. Die Brustkrebszellen interagieren homotypisch mit Claudin-2 exprimierenden Leberzellen, sodass sich Lebermetastasen bilden können (Tabariès et al. 2012).

Besonders zu Ovarialkrebs existieren einige Studien, die eine Überexpression von Claudin-3 und -4 aufzeigen (Rangel et al. 2003; Agarwal et al. 2005; Hicks et al. 2016; La Martín de Fuente et al. 2018). Zusätzlich führt eine abnormale Phosphorylierung von Claudin-3 und -4 durch bestimmte Proteinkinasen in Ovarialkrebszellen zu deren Fehllokalisierung, wodurch die parazelluläre Permeabilität erhöht wird (D'Souza et al. 2005; D'Souza et al. 2007). Weiterhin überexprimieren Pankreaskrebszellen Claudin-3 und -4 (Montgomery et al. 2006) und die Phosphorylierung von Claudin-4 führt zu einem ähnlichen Effekt wie in Ovarialkrebszellen (Kyuno et al. 2011). Aber auch in Ösophagus-, Darm- und Prostatakrebs können Claudin-3 und -4 abnormal hoch exprimiert werden (Escudero-Esparza et al. 2011).

In Darm-, Ovarial- und Magenkrebszellen ist die übermäßige Expression von Claudin-3 und -4 mit einer erhöhten Matrix-Metalloproteasen (MMP)-Aktivität, wie MMP-2 und MMP-9, assoziiert (Takehara et al. 2009; Agarwal et al. 2005; Hwang et al. 2010). Matrix-Metalloproteasen bilden eine große Familie aus Enzymen, die die extrazelluläre Matrix degradieren können (Hwang et al. 2010). Es wird vermutet, dass durch die erhöhte Aktivität von spezifischen MMPs die Invasivität und Ausbreitung der Krebszellen mit einer übermäßigen Claudin-Expression gefördert wird (Hwang et al.

2010; Osanai et al. 2017). Die Inhibierung von Claudin-3 durch *small interfering* RNA (siRNA) reduziert das Wachstum und die Metastasenbildung von Ovarialkrebs-Xenotransplantaten in Mäusen (Huang et al. 2009). Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die Hypothese, dass Claudin-3 einen krebsfördernden Effekt hat. Eine erhöhte Aktivität von MMP-2 und MMP-9 wird durch die Überexpression von Claudin-4 in der Darmzelllinie Caco-2 hervorgerufen (Hagen 2017). Eine andere Arbeit zeigte in jeweils *in vitro* und *in vivo* Analysen, dass die erhöhte Expression von Claudin-4 die Produktion von Angiogenesefaktoren induziert und so die Angiogenese von Ovarialkrebs begünstigt (Li et al. 2009).

Allgemein führt eine erhöhte Expression von Claudinen zu einer atypischen Lokalisation innerhalb der Zelle. Hierbei sind Claudine statt an der apikalen lateralen Membrandomäne an der basolateralen Membrandomäne, in intrazellulären Komponenten und im Nukleus lokalisiert (Hagen 2017). Analog zu den Krebsarten mit einer reduzierten Claudin-Expression wird ein Zusammenhang zwischen der übermäßigen Claudin-Expression und einer Resistenz gegen Chemotherapie sowie schlechter Überlebenschancen von betroffenen Patienten beobachtet (Singh et al. 2017).

Zusammenfassend zeigen die Studien, dass die Art und Weise der Fehlregulation von Claudinen innerhalb und zwischen den Krebsarten sehr unterschiedlich ausfallen kann und zudem den Verlauf der Krebsentwicklung beeinflusst. Daher macht die klinische Relevanz und die funktionelle Bedeutung von Claudinen in diversen Krebsarten sie zu potentiellen therapeutischen Targets. Ein besonderes Interesse besteht darin, das *Clostridium perfringens* Enterotoxin sowohl als potentiellen therapeutischen Wirkstoff, als auch für Diagnosezwecke zu nutzen (Yao et al. 2010; Saeki et al. 2010; Tabariès et al. 2012; Singh et al. 2017).

1.2 *Clostridium perfringens* Enterotoxin

Das *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) ist ein grampositives, sporenbildendes, anaerobes Bakterium, das Lebensmittelvergiftungen in Menschen und Nutztieren verursachen kann. Das Bakterium gelangt durch kontaminiertes Essen über den Magen in den Dünndarm. Die Virulenz des *C. perfringens* entsteht durch dessen Bildung von mindestens 17 verschiedenen Toxinen. Anhand der Fähigkeit die Toxine Alpha-, Beta-, Epsilon- und Iota in Kombination zu bilden, werden *C. perfringens* in fünf Toxintypen (A-E) unterteilt (Freedman et al. 2016; Uzal et al. 2010). Ungefähr 5 % aller *C. perfringens* bilden neben den anderen Toxinen das Toxin *C. perfringens* Enterotoxin (CPE) (Kokai-Kun et al. 1994). Das CPE ist ein 319 Aminosäure langes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 35 kDa (Shrestha et al. 2016). Die meisten CPE-positiven Stämme werden als Typ A klassifiziert, aber auch einige C- und D-Typen bilden das Enterotoxin (Li et al. 2010). Während Typ E-Stämme

eine Variante vom CPE bilden, konnte das CPE in Typ B-Stämmen bis heute nicht identifiziert werden. (Freedman et al. 2016). CPE wird während der Sporulation von *C. perfringens* im Dünndarm exprimiert und akkumuliert so im Bakterium. Es wird entlassen, sobald die sporulierenden Bakterienzellen lysieren. Nach der Freisetzung in das intestinale Lumen bindet das CPE an intestinale Epithelzellen und initiiert eine Kette von Ereignissen, die schließlich zum Zelltod führen können (Katahira et al. 1997; Llanco et al. 2017). Als natürliche Rezeptoren für CPE wurden bestimmte Claudine identifiziert.

1.2.1 Interaktion von CPE mit Claudinen

Die Virulenz von CPE entsteht durch dessen Fähigkeit an spezifische Claudine zu binden. Die CPE-Bindung kann schließlich zum Zelltod führen. Mehrere Studien identifizierten Claudin-3, -4, -6, -7 und -9 als CPE-Rezeptoren mit einer hohen Affinität und Claudin-1, -2, -8, -14 und -19 als CPE-Rezeptoren mit einer niedrigen Affinität (Fujita et al. 2000; Kimura et al. 2010; Robertson et al. 2010; Saitoh et al. 2015; Shrestha & McClane 2013; Sonoda et al. 1999; Winkler et al. 2009). CPE bindet nicht an Claudin-5, -10 bis -13 und Claudin-15 bis -18, sowie ebenfalls nicht an Claudin-20 bis -24 (Kimura et al. 2010; Veshnyakova et al. 2012; Winkler et al. 2009). Mit einer Dissoziationskonstante (K_d) von ca. 1×10^{-8} M zeigen Claudin-3 und -4 die größte CPE-Affinität (Sonoda et al. 1999; Fujita et al. 2000). Für Claudin-6, -7 und -8 liegt die K_d im Bereich von 10^{-6} M (Veshnyakova et al. 2012). Es besteht allgemeiner Konsens, dass CPE initial an seine Rezeptoren bindet, die außerhalb der Tight Junctions an der Plasmamembran vorliegen (Winkler et al. 2009). Einmal gebunden bildet es einen kleinen Komplex (ca. 90 kDa). Dieser Komplex besteht zusätzlich zum Enterotoxin aus CPE-Rezeptoren und nicht-CPE-Rezeptoren (Wieckowski et al. 1994; Robertson et al. 2010). Es wird davon ausgegangen, dass die Präsenz von nicht-CPE-Rezeptoren durch deren Interaktion mit CPE-Rezeptoren hervorgerufen wird (Mitchell & Koval 2010). An der Oberfläche der Plasmamembran oligomerisieren ungefähr sechs dieser kleinen CPE-Komplexe und bilden eine Präpore. Die Präpore dringt in die Plasmamembran der Wirtszelle ein und bildet einen 450 kDa großen Porenkomplex (CH-1) (Robertson et al. 2007; Smedley et al. 2007). Die CH-1 Pore ist permeabel für Moleküle kleiner als 200 Da einschließlich Calcium. Der Einstrom von Calcium lässt das osmotische Gleichgewicht in der Zelle kollabieren und induzierte morphologische Zellschäden, die schließlich zum Zelltod führen (Chakrabarti & McClane 2005). Die veränderte Morphologie von sterbenden Zellen trägt dazu bei, dass mehr Claudine an der basolateralen Membran oder an angrenzenden Zellen freiliegen (Singh et al. 2001). Die freiliegenden Claudine erlauben eine stetig vermehrte CPE-Bindung, die zu zusätzlichen CH-1 Poren führen. Die CH-1 Poren binden schließlich Occludin und lagern sich zu einem größeren CPE-Porenkomplex (CH-2) zusammen (Mitchell & Koval 2010). Die Funktion der

600 kDa großen CH-2 Pore konnte bisher nicht geklärt werden (Shrestha et al. 2016). Die Bindung von Occludin über die CPE-Rezeptoren an CH-2 ist mit der Internalisierung von Occludin und Claudinen assoziiert und resultiert in einer beeinträchtigten intestinalen Epithelbarriere (Mitchell & Koval 2010).

Funktionsanalysen der CPE-Struktur ergaben, dass CPE aus einer N-terminalen zytotoxischen Domäne und einer C-terminalen Bindungsdomäne besteht (Hashimoto et al. 2017). Die Region für die Oligomerisierung und für die Insertion von CPE in die Plasmamembran sowie für die Porenausbildung liegt innerhalb der zytotoxischen Region des N-Terminus (Aminosäuren 37-171) (Mitchell & Koval 2010; Saitoh et al. 2015). Das C-terminale Fragment von CPE (C-CPE), bestehend aus den Aminosäuren 184 bis 319, ist die Rezeptorbindungsdomäne. Die minimale C-terminale Bindungsdomäne umfasst die Aminosäuren 290 bis 319 (Abbildung 1-2). Die Behandlung von konfluenten Epithelzellen mit rekombinanten C-CPE₁₈₄₋₃₁₉ und C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ Varianten beeinträchtigt, ohne zytotoxische Effekte die Barrierefunktion von Tight Junctions (Kondoh et al. 2005; Takahashi et al. 2005; Uchida et al. 2010). In der C-CPE-Region sind die Tyrosinreste Y306, Y310, Y312 und die Leucinreste L223, L254, L315 kritisch für die CPE-Claudin-Bindung (Abbildung 1-2) (Hanna et al. 1991; Takahashi et al. 2008; Suzuki et al. 2017). Die Aminosäuren vom C-CPE bilden eine hydrophobische Bindungstasche mit einem großen und kleinen Hohlraum. Die CPE-Rezeptoren wie Claudin-3 und -4 weisen hydrophobische Aminosäurereste in der Region des ECL2 auf, die exakt in die Bindungstaschen von CPE passen, sodass CPE an seine Rezeptoren binden kann (Suzuki et al. 2017). Das essentielle Motiv bei allen CPE-Rezeptoren ist die Aminosäuresequenz Asparagin-Prolin-(Valin/Leucin)-(Valin/Leucin)-(Prolin/Alanin) (NP-(V/L)-(V/L)-(P/A)) und liegt in der Kurvenregion vom ECL2 (Abbildung 1-2) (Winkler et al. 2009). Das Motiv im ECL2 kann zwischen den CPE-Rezeptoren variieren. So ist das Motiv für humanes Claudin-3 NPVVP und für humanes Claudin-4 NPLVA (Veshnyakova et al. 2012). Das Motiv im ECL2 bestimmt also die Sensitivität von Claudinen für CPE. Aber auch ECL1 scheint eine Rolle bei der Bindung von CPE zu spielen. Es wird angenommen, dass ECL1 die Interaktion zwischen CPE und Claudinen durch eine Vergrößerung der hydrophobischen Kontaktfläche unterstützt (Saitoh et al. 2015). Erfolgt eine CPE-Bindung an seine Rezeptoren führt dies zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren. Die Konformationsänderung bei Claudin-4 nach der CPE-Bindung löst die *cis*-Interaktion zwischen den Claudin-4 Molekülen und resultiert in einer beeinträchtigten Barrierefunktion der Tight Junctions (Shinoda et al. 2016).

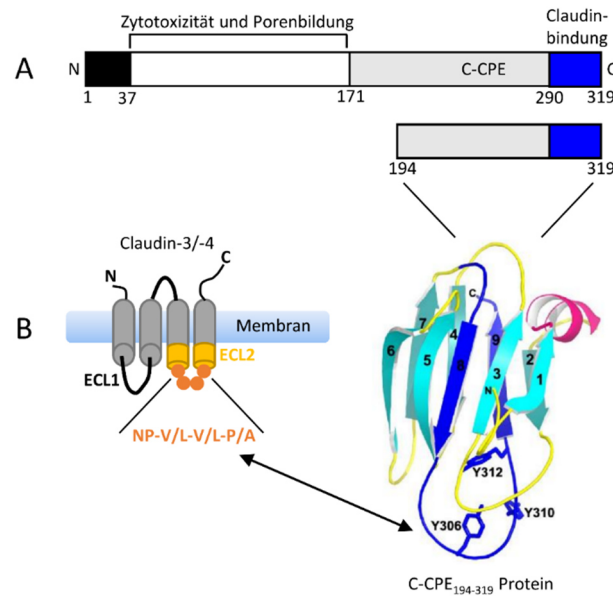


Abbildung 1-2: Funktionelle Regionen von CPE und Struktur von C-CPE₁₉₄₋₃₁₉. (A) Die Bindungsdomäne für Claudin (dunkelblau) mit 30 Aminosäureresten liegt innerhalb des C-Terminus. (B) Die Reste in der Bindungsdomäne Y306, Y310 und Y312 (dunkelblau) bestimmen die Claudinbindung. Das Motiv NP-V/L-V/L-P/A im ECL2 (orange) vom Claudin bestimmt die Sensitivität für die CPE-Bindung (adaptiert von Gao & McClane (2012) und van Itallie et al. (2008)).

1.2.2 CPE-basierte Detektion und Behandlung von Krebszellen

Die übermäßig erhöhte Expression von Claudin-3 und -4 in bestimmten Krebsarten machen sie zu vielversprechenden Targets, weil sie eine Entwicklung von CPE-basierten therapeutischen Wirkstoffen und Detektionssystemen ermöglichen (Shrestha et al. 2016). Gegenwärtige präklinische Therapieansätze umfassen das zytotoxische CPE alleine und das C-CPE-Fragment als Zielmolekül.

In vitro CPE-Behandlung von humanen Krebszelllinien und humanen Brusttumorgewebe resultiert in Zytolyse und Zelltod abhängig von der eingesetzten CPE-Dosis (Kominsky et al. 2004; Michl et al. 2001; Santin et al. 2005). Mit Hilfe von murinen Xenotransplantatmodellen wurde auch die *in vivo* Effizienz der CPE-Therapie getestet. Intratumorale Injektion von CPE in Bauchspeicheldrüsen- und Brusttumor verhindert deutlich das Tumorstadium oder verursacht eine Tumorrückbildung durch induzierte Nekrose (Santin et al. 2005; Michl et al. 2001). Weiterhin inhibiert die intraperitoneale Injektion von CPE das Wachstum von explantierten chemoresistenten humanen Ovarialkrebszellen in Mäusen ohne schwerwiegende gastrointestinale Nebeneffekte (Santin et al. 2005; Casagrande et al. 2011). Ähnlich inhibierenden Effekt auf Tumorstadium hatte die intratumorale Injektion von CPE in Mäusen, die PC-3 Prostatakrebszellen in sich trugen (Maeda et al. 2012). Der Einsatz von CPE birgt jedoch die Möglichkeit, Nebeneffekte im gesunden Gewebe hervorzurufen. So wird z.B. auch im normalen Prostatagewebe Claudin-3 stark exprimiert (Hashimoto et al. 2017).

Die Verwendung von C-CPE könnte eine vielversprechende Alternative zum CPE sein, um den potentiellen zytotoxischen Effekt von CPE zu vermeiden. Aktuell werden verschiedene C-CPE basierende Ansätze untersucht. Ein Ansatz ist die Aufnahme und Penetration von therapeutischen Wirkstoffen in den Tumor mit Hilfe von C-CPE zu verbessern. Die Aufnahme und Penetration von therapeutischen Wirkstoffen kann durch den steigenden interstitiellen Flüssigkeitsdruck bei wachsenden Tumoren verhindert werden und erschwert somit die Tumorbehandlung (Hofmann et al. 2006). In diesem Kontext analysierten Gao et al. (2011), inwiefern C-CPE die Aufnahme von Anti-Tumorstoffen verbessert. In humanen ovariellen Krebszellen induziert C-CPE die Degradation von Claudin-4 und sensibilisiert die sonst chemotherapieresistenten Zellen gegen den Arzneistoff Paclitaxel. Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe anhand von subkutanen Xenotransplantaten bestehend aus ovariellen Krebszellen zeigen, dass die kombinierte Verabreichung von C-CPE und Paclitaxel das Tumorstadium in Mäusen signifikant reduziert. Daher wurde vermutet, dass durch Verabreichung von C-CPE die Aufnahme von Paclitaxel verbessert wird (Gao et al. 2011). Ein anderer Ansatz besteht in der Verwendung von C-CPE fusioniert mit tumorspezifischen Faktoren. Die Fusion von C-CPE₂₉₀₋₃₁₉ an einen Tumornekrosefaktor und C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ an einem Inhibitorfaktor der Proteinsynthese induzierte Zytotoxizität entsprechend in ovariellen Krebszellen und Brustkrebszellen (Yuan et al. 2009; Ebihara et al. 2006). Ebenso ermöglicht die Fusion von Fluoreszenzfarbstoffen an C-CPE die Visualisierung von Tumorgewebe sowie sehr kleinen Metastasen in Echtzeit. In ovariellen Xenotransplantat tragenden Mäusen konnte nach einer Injektion von C-CPE₂₉₀₋₁₉₄ fusioniert an Fluorescein-Isocyanat (FITC) oder an einem Nahinfrarotfluoreszenztag ovarielle Tumore und kleine Metastasen detektiert werden (Cocco et al. 2015). Im Gegensatz zu der konventionellen Krebstherapie, könnte das CPE oder C-CPE daher eine präzisere Detektion und Behandlung von Krebsarten ermöglichen, die die entsprechenden Claudine aufweisen.

1.3 Goldnanopartikel-vermittelte Optoperforation von Krebszellen

Die Entwicklung von Goldnanopartikel (AuNP) für den Einsatz in der Krebsdiagnose und -therapie ist Gegenstand intensiver Forschung (Singh et al. 2018). Durch die synthetische Herstellung der AuNP sind ihre Größe und Form kontrollierbar. Zudem können diese in großen Mengen produziert werden. Als Edelmetall sind AuNP resistent gegen Korrosion und Oxidation sowie biokompatibel (Bucharskaya et al. 2016; Singh et al. 2018). Eine andere wichtige Eigenschaft ist die verfügbare Oberfläche. Die Oberfläche kann mit verschiedenen Wirkstoffen, Nukleinsäuren, Peptiden oder Proteinen beladen werden (Bucharskaya et al. 2016; Dreaden et al. 2012). Die dadurch entstehende Funktionalisierung der AuNP ermöglicht eine spezifisch gerichtete Detektion und Behandlung von Zellen, wie z. B. Krebszellen (Singh et al. 2018). Anhand von AuNP (\varnothing 115-150 nm) konjugiert mit

Bombesinpeptiden konnten spezifisch *gastrin-releasing peptide* (GRP) Rezeptoren detektieren werden. GRP-Rezeptoren werden besonders in Prostata-, Brust- und kleinen Lungenkarzinomen überexprimiert (Chanda et al. 2010). Für den *in vivo* Einsatz ermöglicht die Konjugation mit spezifischen Tumorerkennungsmolekülen, deutlich höhere AuNP-Konzentrationen zu verwenden und gleichzeitig die Anreicherung der AuNP in der Leber und den Nieren zu vermeiden (Patra et al. 2008). Zusätzlich kann die Aufnahme von Chemotherapeutika in Tumorgewebe durch deren Konjugation an AuNP erhöht werden. Die durchlässigen Gefäßsysteme von Tumorgewebe erlauben die Akkumulation von den AuNP (Singh et al. 2018).

Eine weitere Möglichkeit Tumorzellen zu behandeln, ist die Aktivierung der AuNP durch eine Laserbestrahlung. Für die Aktivierung der AuNP werden häufig Lasersysteme verwendet, die im Bereich von Nano-, Pico- oder Femtosekunden Laserpulse erzeugen (Boulais et al. 2012). Verglichen zu kontinuierlichen Laserstrahlen liefern gepulste Laser in kürzerer Zeit mehr Energie (Rau et al. 2016). Treffen Laserpulse auf AuNP, absorbieren die AuNP Photonen. Dies induziert eine kollektive Oszillation von freien Elektronen an der Oberfläche der AuNP. Die Oszillation der Elektronen erzeugt ein elektrisches Feld. Diese spezifische Eigenschaft der AuNP wird als Oberflächenplasmonresonanz (SPR) beschrieben. Der SPR-Effekt ist abhängig von der Wellenlänge des eintreffenden Laserlichts. Die Größe und Form der AuNP bestimmt diese Wellenlänge. SPR tritt bei 20 nm großen AuNP bei einer Welllänge von 520 bis 530 nm auf. Mit zunehmender Größe der AuNP verschiebt sich die SPR-Wellenlänge in den roten Bereich (Boulais et al. 2012). Die Energie der SPR induziert innerhalb weniger Nanosekunden eine Erhitzung der AuNP und des nah liegenden Mediums (Qin & Bischof 2012). Diese Erhitzung kann wiederum zur Bildung von plasmonischen Nanobläschen führen (Stern et al. 2007; Singh et al. 2018; Heinemann et al. 2013). Die Hitze sowie die plasmonischen Nanobläschen können zu dauerhaft oder transient thermischen und mechanischen Schäden an der Zellmembran führen (Saha et al. 2016). Ob diese optisch induzierte Perforation der Zellen dauerhaft oder transient ist, hängt von der Laserwellenlänge, Laserleistung, Strahlungsdauer sowie Größe und Form der AuNP ab (Rau et al. 2016). Eine transiente Laserperforation ermöglicht die Manipulation der Zellen durch das Einbringen von Wirkstoffen, Nukleinsäuren oder Proteinen (Vines et al. 2019; Li et al. 2017). In verschiedenen Studien konnten Zellen mittels der Goldnanopartikel-vermittelter Laserperforation (GNOME-LP) mit kleinen Fluoreszenzfarbstoffen, siRNA und Plasmid-DNA beladen werden (Baumgart et al. 2012; Boulais et al. 2012; Heinemann et al. 2013; Schomaker & Heinemann et al. 2015).

Eine dauerhafte Schädigung der Zellemembran mit plasmonischen AuNP kann die Zellvitalität reduzieren und schließlich zum Zelltod führen. Dieser Effekt kann zur Ablation von Tumorzellen genutzt werden (Bucharskaya et al. 2016). In verschiedenen Tumormodellen, wie z.B. Brustkrebs, konnten irreversible Schäden mit AuNP und Laserbestrahlung erzeugt werden. So akkumulierten intravenös injizierte 100 nm große AuNP an SK-BR-3 Brustkrebszellen in Mäusen. Die anschließende Laserbestrahlung eliminierte dauerhaft die Krebszellen (Hirsch et al. 2003). In einem ähnlichen Ansatz konnte *in vivo* mit 110 nm große AuNP Xenotransplantate aus Prostatakrebszellen komplett eliminiert werden (Stern et al. 2007). Saha et al. (2016) konnten das Wachstum durch die Behandlung von Pankreatumorzellen mit 20 nm großen AuNP inhibieren. Andere Arbeiten verwendeten AuNP konjugiert mit Antikörpern zur Detektion und Behandlung von Tumoren. Brust- und Ovarialkrebszellen, die HER2 überexprimieren, konnten mit AuNP, die mit dem Antikörper Herceptin konjugierten waren, detektiert und getötet werden (van de Broek et al. 2011). Herceptin bindet hierbei spezifisch an die HER2 (van de Broek et al. 2011). In einem ähnlichen Ansatz wurde mit AuNP (\emptyset 20 nm) konjugiert an *epidermal growth factor* (EGF) Rezeptor-Antikörpern das Wachstum von Brustkrebszellen in dreidimensionalen Matrigel inhibiert. Mit steigender Bestrahlungsdauer konnten die Kolonien aus Brustkrebszellen komplett eliminiert werden (Minai et al. 2018).

Abhängig von der verwendeten Laserleistung und Bestrahlungsdauer wird beeinflusst, inwiefern ein Apoptose oder Nekrose assoziierter Zelltod durch die AuNP-vermittelte Optoperforation induziert wird (Melamed et al. 2015; Pérez-Hernández et al. 2015; Abadeer & Murphy 2016). So wurde in einer Studie mit Transferrin-funktionalisierten Goldstäbchen behandelte HeLa-Zellen mit unterschiedlicher Laserleistung und Bestrahlungsdauer eines gepulsten Femtosekundenlasers (800 nm) behandelt. Eine konstante Laserleistung von 30 W/cm² kombiniert mit einer längeren Bestrahlungsdauer (30 Scans) resultierte in nekrotischen Zellen. Eine kürzere Bestrahlungsdauer (10 Scans) induzierte in den Zellen apoptotische Reaktionen. Die Erhöhung der Laserleistung auf 55,6 W/cm² verursachte Nekrose bereits nach einem Scan (Li & Gu 2010).

Apoptose ist der programmierte Zelltod und stellt einen hochregulierten Energie-abhängigen Prozess dar, um selektiv geschädigte oder aberrante Zellen im Körper zu eliminieren. DNA-Schäden oder oxidativer Stress können Apoptose initiieren (Vermeulen et al. 2005). Charakteristisch für apoptotische Zellen sind morphologische Veränderungen wie Phosphatidylserin-Exposition an der äußeren Membranschicht (Segawa et al. 2014), Zellschrumpfung, Bildung von Membranbläschen, Kondensation von Chromatin im Zellkern und Fragmentierung der DNA sowie des Zellkerns. Schließlich zerfällt die Zelle in membranumschlossene Fragmente (*apoptotic bodies*), die *in vivo* von Phagozyten registriert und entfernt werden (Martinez et al. 2010). Die morphologischen Zeichen der

Apoptose sind ein Resultat der Aktivierung einer intrazellulären Caspase-Kaskade. Caspasen sind Proteasen, die durch Schneiden von bestimmten Proteinen den Zelltod induzieren können. Caspasen werden in normalen Zellen als inaktive Proenzyme synthetisiert und können durch autoproteolytische Spaltung oder durch Spaltung über andere Caspasen aktiviert werden. Die Aktivierung der initiale Casapase-8, -10 oder -9 leitet die Apoptose ein. Die aktiven Initiator-Caspasen spalten nachgeschaltete Effektor-Caspasen, unter anderem Caspase-3, -7 und -6. Die Effektor-Caspasen spalten wiederum zelleigene Proteine wie z. B. Lamin, Aktin und aktivieren Endonuklease G, die die DNA fragmentiert (Vermeulen et al. 2005). Im Gegensatz zur Apoptose wird die Nekrose als unkontrollierter versehentlicher Zelltod betrachtet, der durch nicht-spezifischen Stress, wie Toxizität und Schädigung, verursacht werden kann. Bei der Nekrose kollabiert die Membran und die Zelle schwillt an, sodass die Zelle schließlich platzt und die zellulären Bestandteile freigesetzt werden (Chen et al. 2018). Die freigesetzten Bestandteile, auch als *damage-associated patterns* (DAMPs) beschrieben, verursachen *in vivo* eine Endzündungsreaktion (Kono & Rock 2008).

1.4 Zielsetzung der Dissertation

Die abnormal erhöhte Expression speziell von Claudin-3 und -4 in vielen verschiedenen Krebsarten, wie z.B. in Ovarial-, Brust-, Darm-, und Ösophaguskrebszellen, kann die Malignität der Krebszellen fördern, indem sie sich in umgebenes Gewebe ausbreiten und schließlich Metastasen ausbilden (Hicks et al. 2016; Tokés et al. 2005; Takehara et al. 2009; Montgomery et al. 2006). Zusätzlich kann die fehlregulierte Expression der Claudine chemoresistente Krebszellen verursachen (Osanai et al. 2017). Die übermäßig erhöhte Expression von Claudinen in bestimmten Krebszellen macht die Claudine zu potentiellen Biomarkern. Die spezifische Bindung von C-CPE an seine Rezeptoren Claudin-3 und -4, könnte daher eine spezifische Detektion von Krebszellen ermöglichen (Casagrande et al. 2011; Saeki et al. 2010). In Kombination mit der GNOME-LP-Technik (Heinemann et al. 2013) könnte C-CPE zudem zur spezifischen Eliminierung der Krebszellen beitragen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, zu untersuchen, inwiefern die Verwendung von C-CPE funktionalisierten AuNP für die laserinduzierte Optoperforation zur spezifischen Tötung von CPE-Rezeptor exprimierenden Krebszellen geeignet ist (Abbildung 1-3). Für die Funktionalisierung von Strep-Tactin konjugierten 25 nm großen AuNP sollte zunächst die C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ Variante mit einem N-terminalen Strep-tag II rekombinant produziert werden. Um die Funktionalität des C-CPE Proteins und die Spezifität der GNOME-LP-Technik mittels C-CPE funktionalisierter AuNP zu analysieren, sollten auf molekularer Ebene Krebszellen bestimmt werden, die C-CPE-Rezeptoren oder keine C-CPE-Rezeptoren

aufweisen. Als Modell von Krebszellen dienten humane Zelllinien aus Dickdarm-, Brust- und Ösophagusadenokarzinom sowie Zelllinien aus krebsartigen Hundeb Brustgewebe. Da Tumore dreidimensionale Strukturen sind, sollte die Anwendbarkeit der C-CPE funktionalisierten AuNP in Kombination mit der GNOME-LP an Krebszellen getestet werden, die in einem 3D-Kultursystem bestehend aus Matrigel tumorähnliche Strukturen (Sphäroide) ausbildeten. Durch die Verwendung von verschiedenen C-CPE-Konzentrationen zur AuNP-Funktionalisierung sowie die Bestrahlung der Zellen mit unterschiedlichen Laserfluenzen sollten physikalische Parameter für ein effizientes Zelltöten definiert werden. Abschließend sollte unter Betrachtung der Zellmembran, Mitochondrien, DNA und Caspase-3/-7-Aktivität analysiert werden, ob ein apoptotischer oder nekrotischer Zelltod durch die Optoperforation induziert wird.

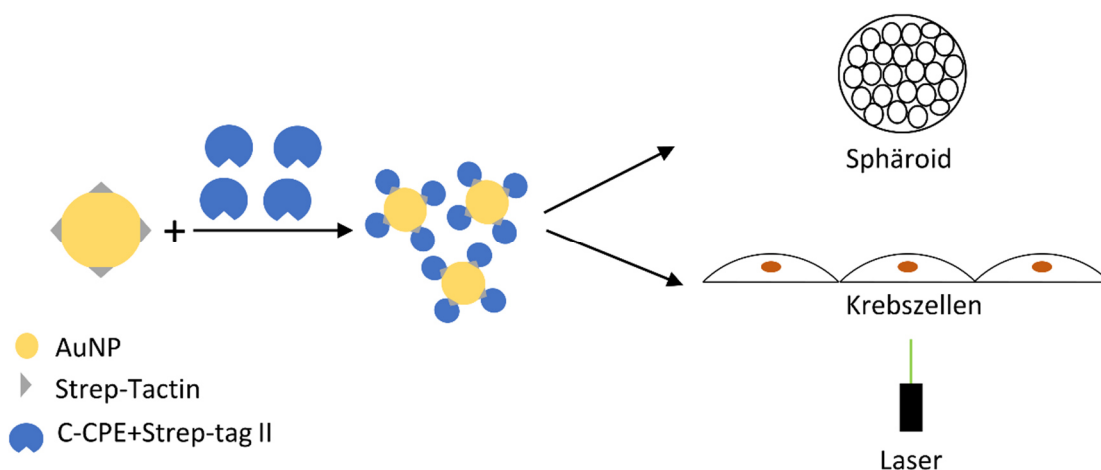


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der GNOME-LP und C-CPE funktionalisierten AuNP für das Töten von Krebszellen.

2 Manuskripte

2.1 Manuskript 1

Funktionalisierung von Goldnanopartikeln mit dem C-Terminus des *Clostridium perfringens* Enterotoxins für Ablation von Tumorzellen mittels der Goldnanopartikel-vermittelten Laserperforationstechnik

Functionalization of gold nanoparticles by the *Clostridium perfringens* enterotoxin C-terminus for tumor cell ablation using the gold nanoparticle-mediated laser perforation technique

Annegret Becker, Miriam Leskau, Babara L. Schlingmann-Molina, Susanne C. Hohmeier, Suhayla Alnajjar, Hugo Murua Escobar, Anacllet Ngezahayo

Scientific Reports – Nature Research Journal

Volume 8, Article 14963 (2018), DOI: 10.1038/s41598-018-33392-0

Published by Springer Nature. This publication is an open access article and is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.



RightsLink®

SPRINGER NATURE

Title: Functionalization of gold-nanoparticles by the *Clostridium perfringens* enterotoxin C-terminus for tumor cell ablation using the gold nanoparticle-mediated laser perforation technique

Author: Annegret Becker et al

Publication: Scientific Reports

Publisher: Springer Nature

Date: Oct 8, 2018

Copyright © 2018, Springer Nature

Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons CC BY](#) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.

To request permission for a type of use not listed, please contact [Springer Nature](#)

SCIENTIFIC REPORTS

Corrected: Publisher Correction

OPEN

Functionalization of gold-nanoparticles by the *Clostridium perfringens* enterotoxin C-terminus for tumor cell ablation using the gold nanoparticle-mediated laser perforation technique

Annegret Becker¹, Miriam Leskau¹, Barbara L. Schlingmann-Molina², Susanne C. Hohmeier^{3,4}, Suhayla Alnajjar³, Hugo Murua Escobar^{3,4} & Anaclet Ngezahayo^{1,5}

A recombinant produced C-terminus of the *C. perfringens* enterotoxin (C-CPE) was conjugated to gold nanoparticles (AuNPs) to produce a C-CPE-AuNP complex (C-CPE-AuNP). By binding to claudins, the C-CPE should allow to target the AuNPs onto the claudin expressing tumor cells for a subsequent cell killing by application of the gold nanoparticle-mediated laser perforation (GNOME-LP) technique. Using qPCR and immunocytochemistry, we identified the human Caco-2, MCF-7 and OE-33 as well as the canine TiHoDMgICarc1305 as tumor cells expressing claudin-3, -4 and -7. Transepithelial electrical resistance (TEER) measurements of Caco-2 cell monolayer showed that the recombinant C-CPE bound to the claudins. GNOME-LP at a laser fluence of 60 mJ/cm² and a scanning speed of 0.5 cm/s specifically eliminated more than 75% of claudin expressing human and canine cells treated with C-CPE-AuNP. The same laser fluence did not affect the cells when non-functionalized AuNPs were used. Furthermore, most of the claudin non-expressing cells treated with C-CPE-AuNP were not killed by GNOME-LP. Additionally, application of C-CPE-AuNP to spheroids formed by MCF-7 and OE-33 cells grown in Matrigel reduced spheroid area. The results demonstrate that specific ablation of claudin expressing tumor cells is efficiently increased by activated C-CPE functionalized AuNPs using optical methods.

Despite advances in diagnostic and treatment, cancer is still a leading cause of death worldwide. Therefore, the development of new tools to tackle neoplastic and malignant cells while causing minimal harm to non-neoplastic cells is still an ongoing research goal addressed by different methodical approaches. In this context, analysis of tumor specific molecules that can be specifically targeted is a promising strategy¹.

Among different tumor cell markers, the epidermal growth factor 2 receptor HER2 has attracted the research community. In about 25% of breast cancer diagnosed patients, HER2 is amplified. Because of the aggressive nature of HER2⁺ breast cancers, the amplification of HER2 correlates with poor prognosis^{2,3}. Consequently, the use of HER2 antibody (Trastuzumab) was proposed as part of a new class of drugs. Although, treatment of HER2⁺ metastatic breast cancer revealed beneficial effects^{4,5}, several patients developed a therapeutic resistance^{2,6}. Other molecules targeting the EGF signaling system such as Lapatinib, a small molecule that inhibits tyrosine kinase, have been developed. However, like in the case of Trastuzumab, resistance to this molecule was observed⁷.

¹Institute of Cell Biology and Biophysics, Department of Biophysics and Cell Physiology, Leibniz University Hannover, Hannover, Germany. ²Meissa Vaccines, South San Francisco, California, USA. ³Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany. ⁴Division of Medicine, Haematology, Oncology and Palliative Medicine, University of Rostock, Rostock, Germany. ⁵Center of System Neuroscience, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.N. (email: ngezahayo@biophysik.uni-hannover.de)

Received: 18 June 2018
Accepted: 27 September 2018
Published online: 8 October 2018

New approaches are oriented towards using gold nanoparticles mediated tumor cell killing as a new and minimally invasive method to eliminate malignant tumor cells⁸. For this, gold nanoparticles are applied to tumor cells. After adhesion onto the cells, the gold nanoparticles are activated by application of a laser beam. The interaction between the laser and the gold nanoparticles induces localized surface plasmon resonance (LSR) and heat generation, which irreversibly perforate the cells resulting in cell death⁹. The efficiency of the method was shown *in vitro* and even in animal models. Studies showed that gold nanoparticles applied intravenously to animals, harboring a human tumor xenograft composed of SK-BR-3 cells, allowed a complete elimination of the tumor by an optical activation of the gold nanoparticles^{10–12}. The challenge of this approach is to achieve a specific targeting of gold nanoparticles onto the cancer cells. In this context, the functionalization of gold nanoparticles with biological molecules recognizing target molecules specifically expressed in the membrane of tumor cells seems to be a promising option. Consequently, it was shown that anti-HER2 antibody functionalized gold nanoparticles bound six times better to tumor cells than non-functionalized gold nanoparticles¹³. Similarly, the usage of an antibody against transferrin receptor promoted the binding of gold nanoparticles on Neuro2A tumor cells which upregulate their expression of transferrin receptor¹⁴.

The aim of the present report was to analyze whether the C-terminus of the *C. perfringens* enterotoxin (C-CPE) could be used for a functionalization of gold nanoparticles in order to specifically address and kill tumor cells. The use of *C. perfringens* enterotoxin (CPE) to target tumor cells raised after it was observed that the development of many tumor types correlated with a dysregulated expression of claudin-3, -4 or -7^{15–17}. In breast, esophagus and colon tumors these claudins are often upregulated which is frequently associated with poor survival of the patients^{18–20}. The elevated expression of claudin-3, -4 and -7 in tumor development is particularly interesting since they are natural receptors for the CPE^{21–25}. Accordingly, several studies using cell cultures and animal models showed that CPE was able to destroy cancer cells. It was shown, for example that CPE efficiently killed cancer cells derived from chemotherapy-resistant human ovarian cancer and implanted in an animal model²⁶. Similarly, CPE destroyed human breast tumor xenografts when directly applied to the tumor. Unfortunately, intraperitoneal administration of the CPE to the animal in order to destroy the tumor was lethal to the animals although the dose were the same as those applied directly to the tumor²⁷. The data strongly indicates that a systemic application of the complete CPE as therapeutic agent might cause deleterious side effects.

Combination of genetic, biochemical, and structural biologic methods to decipher the structure/function relationship of the 319 amino acid residues CPE polypeptide revealed that CPE is a three-domain protein, characteristic of several other pore forming toxins²⁸. The C-terminus of the CPE (C-CPE; D194-F319) serves as the binding domain to claudin-3, -4 and -7^{29–31}. Due to the C-CPE binding to a subset of claudins, C-CPE modulates the tight junctions and thus the barrier function of epithelial tissues without triggering cell death. Therefore, a functionalization of an active cell destroying component (e.g. nanoparticles) by C-CPE is thought to represent a promising valid approach in tumor therapy. As proof of principle, we propose to use a combination of the GNOME-LP photonic technique and C-CPE functionalized AuNPs (C-CPE-AuNP) to specifically kill claudin expressing tumor cells. The GNOME-LP technology has been used as a rapid method for a transient cell permeabilization allowing an uptake of molecules, like dyes or siRNA into cells^{32–35}. The reversible cell permeabilization was achieved by heat generated through the interaction of a femtosecond laser pulse and gold nanoparticles randomly adherent on the cells. In these experiments, energy density of the applied laser beam was adjusted to achieve a transient cell permeabilization^{32,35,36}, followed by closing of the cell membrane. Using C-CPE-AuNP, our hypothesis is that the AuNP should specifically bind claudin expressing cells and an adjusted laser energy should activate the AuNP to irreversibly permeabilize the cells, inducing thereby their death.

This report demonstrates that a recombinant produced C-CPE construct can be used to functionalize gold nanoparticles (AuNP) in order to elicit tumor cell death by activation of the AuNPs using a laser beam in a photonic technique known as gold nanoparticle-mediated laser perforation (GNOME-LP). Implementation of functionalized gold nanoparticles was done by fusion the N-terminal domain of C-CPE with the Strep-Tag II. The Strep-Tag is a classical octo-amino acid peptide (W-S-H-P-Q-F-E-K) allowing a simple protein purification using affinity chromatography³⁷. Importantly, the Strep-Tag warrants protein coupling to diverse materials such as chromophores or nanomaterials conjugated with the Strep-Tag ligand Strep-Tactin. Accordingly, our results show that the C-CPE could be used to functionalize Strep-Tactin conjugated chromophores for a claudin visualization at cell membranes, or Strep-Tactin conjugated gold nanoparticles for efficiently killing of claudin (claudin-3, -4 and -7) expressing tumor cells using the GNOME-LP technique. This report opens the possibility for a development of GNOME-LP technique with C-CPE functionalized gold nanoparticles for tumor therapy.

Results

The goal of our study was to test whether the C-CPE-AuNP complex composed of gold nanoparticles (AuNP) coupled to a recombinant produced C-terminus of *C. perfringens* enterotoxin (C-CPE) could be used for an efficient and specific killing of claudin expressing tumor cells (Fig. 1). Since, claudin-3, -4 or -7, the CPE receptors, can be upregulated in tumor cells, the use of C-CPE-AuNP could be a promising technique for a specific cancer therapy.

Identification of tumor cells expressing claudin-3, -4 or -7. As human tumor cells, the colon adenocarcinoma cell line Caco-2, the cervix adenocarcinoma cell line Hela, the mammary gland adenocarcinoma cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 as well as the esophageal squamous carcinoma cell line Kyse-140 and the esophageal adenocarcinoma cell line OE-33 were used. Real-time PCR with GAPDH and ACTB as housekeeping genes was performed for a quantitative comparison of the claudin expression between the different cells (Fig. 2a). Since, gene expression for GAPDH and ACTB were similar, data for ACTB are not shown. Caco-2 cells are known to express claudins, which allow the Caco-2 cells to form a very tight barrier as attested by measurements of the transepithelial electrical resistance (TEER)³⁸. Correspondingly, the real-time PCR results for claudin-3, -4 and

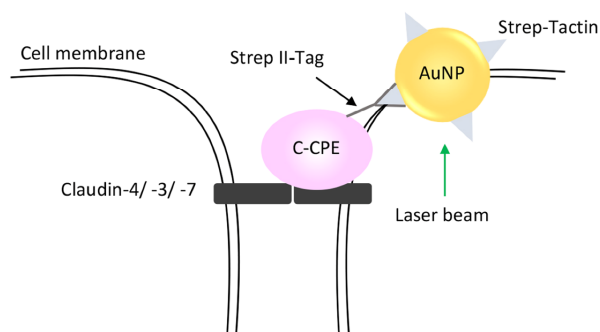


Figure 1. Schema depicting of the C-CPE-AuNP complex binding to claudin-3, -4 and -7 expressing tumor cell exposed to a laser beam.

-7 detected in the different cells were normalized to the respective claudin expression found in Caco-2 cells. As shown in Fig. 2a, human cells used in this study can be classified in a group of high-expression of claudin comprising Caco-2, MCF-7, and the OE-33 versus a group of claudin low-expression cells comprising MDA-MB-231, Kyse140 as well as HeLa. At the protein level, immunocytochemistry showed presence of claudin-3, -4 and -7 at cell-cell junctions in Caco-2, MCF-7 and OE-33 cells (Fig. 2b) which was expected from the PCR data for these claudin expressing cells. In HeLa, MDA-MB-231, Kyse140 cells, the claudins were not detected by the immunostaining (Fig. 2b) suggesting to consider these cells as claudin non-expressing cells.

In previous works, expression of claudin-3, -4 and -7 was studied in cells derived from canine mammary tissues. Real-time PCR analysis showed a high expression of the claudins in the TiHoDMglCarc1305 cells, while TiHoDMglCarc1406.1 and TiHoDMglRef53A cells showed a very low expression of claudin-3, -4 and -7^{39,40}. Similarly, for the human cells, immunocytochemistry experiments found claudin-3 and -4 at cell-cell junctions of TiHoDMglCarc1305 cells, while none of these claudins were detected in TiHoDMglCarc1406.1 and TiHoDMglRef53A cells (Fig. 2c). Taken together, the data identified the human Caco-2, MCF-7 and OE-33 cells as well as the canine TiHoDMglCarc1305 cells, expressing claudin-3, -4 and -7, as good candidates to test whether claudin expressing tumor cells can be specifically targeted using GNOME-LP technique in combination with the C-CPE-AuNP complex.

The functionality of the recombinant C-CPE. To investigate whether our recombinant produced C-CPE bound to claudins, we performed two types of experiments. First, we analyzed whether the recombinant produced C-CPE was efficient in reduction of TEER of Caco-2 cell monolayer cultivated on the membrane of transwell inserts. TEER measurements were performed for post-confluent monolayer Caco-2 with a TEER of 800–1000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. In a time- and dose-dependent manner, 1–20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ C-CPE constantly reduced the TEER by 30–60% (Fig. 3a). Additionally, the non-cytotoxicity of C-CPE⁴¹ was confirmed with the MTT viability assay (Fig. 3b). Secondly, the C-CPE was coupled to Strep-Tactin Chromeo 488 and applied to the different tumor cells for 3 h. The C-CPE-Chromeo 488 complex marked the boundaries of claudin expressing human Caco-2, MCF-7, OE-33 as well as canine TiHoDMglCarc1305 cells but not the claudin non-expressing HeLa, MDA-MB-231 and Kyse140 cells or TiHoDMglCarc1406.1 and TiHoDMglRef513A cells (Fig. 3c,d). In summary, the data show that the recombinant produced C-CPE construct bound specifically to claudins at cell-cell junctions between adjacent cells and thus dose-dependently disturbed the barrier function of tight junctions without affecting the viability of the cells.

Application of the C-CPE-AuNP complex for an optic induced killing of claudin expressing tumor cells. In order to test the applicability of GNOME-LP mediated killing by the C-CPE-AuNP complex, Strep-Tactin conjugated 25 nm AuNPs were mixed with the C-CPE construct at a final concentration of $2.5 \cdot 10^{10}$ AuNPs/ml and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ C-CPE. The C-CPE concentration was chosen after we observed that the 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was enough for binding to claudin expressing cells and destabilization of the barrier function of a Caco-2 monolayer (Fig. 3a). The C-CPE-AuNP complex was applied to the Caco-2 cells and the setting parameters of GNOME-LP were tested by observing whether the treatment induced propidium iodid uptake (Fig. 4a). Detection of propidium iodid uptake was considered as indicator of cell death. The counting of cells stained with Hoechst and propidium iodid allowed to estimate the killing efficiency. Cells stained with Hoechst but not with propidium iodid were considered as not killed. First, the GNOME-LP was applied at the maximal laser fluence (60 mJ/cm²) at a scanning speed of 0.5 cm/s on cells that were incubated with the C-CPE-AuNP complex for different time points to allow complex adhesion to the cells surface.

As shown in Fig. 4b, the survival of Caco-2 cells decreased with the duration of the adhesion time, achieving a minimal survival of less than 30% for an adhesion time of 3 h. Further prolongation of the incubation time did not increase the killing effect (data not shown). Therefore, an adhesion time of 3 h was chosen for further experiments. In control groups, treated either with AuNP or C-CPE alone, GNOME-LP application did not impair

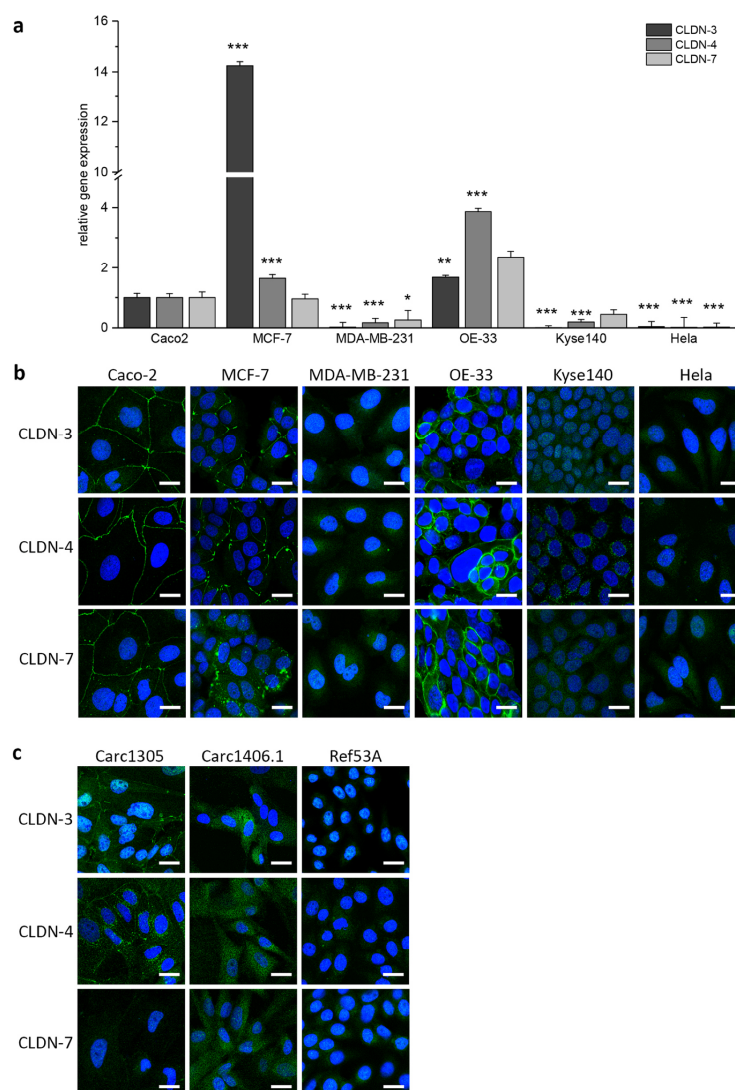


Figure 2. Claudin gene expression in different tumor cells **(a)** Quantification of claudin (CLDN) gene expression with qRT-PCR. Heterogeneous claudin-3, -4, -7 gene expression in MCF-7, MDA-MB-231, OE-33, Kyse140 and Hela cells. The graphs represent the mean \pm SEM gene expression level of CLDN-3, -4 and -7 relative to GAPDH. The results were analyzed with Student's t test. *Significant difference to the control reference: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. **(b,c)** Immunostaining of claudins in human **(b)** and canine **(c)** tumor cells. Expression pattern of CLDN-3, -4 and -7 (green) was variable between tumor cells. In Caco-2, MCF-7 and OE-33 cells CLDN-3, -4 and -7 (green) are localized at cell-cell junctions. Signals of CLDN expression were absent in MDA-MB-231, Kyse140 and Hela cells. Canine cell lines Carc1305, express CLDN-3 and -4 but not CLDN-7 at cell-cell junctions whereas Carc1406.1 and Ref53A cells lack CLDN expression. Nuclei are stained with DAPI. Scale bar, 20 μ m.

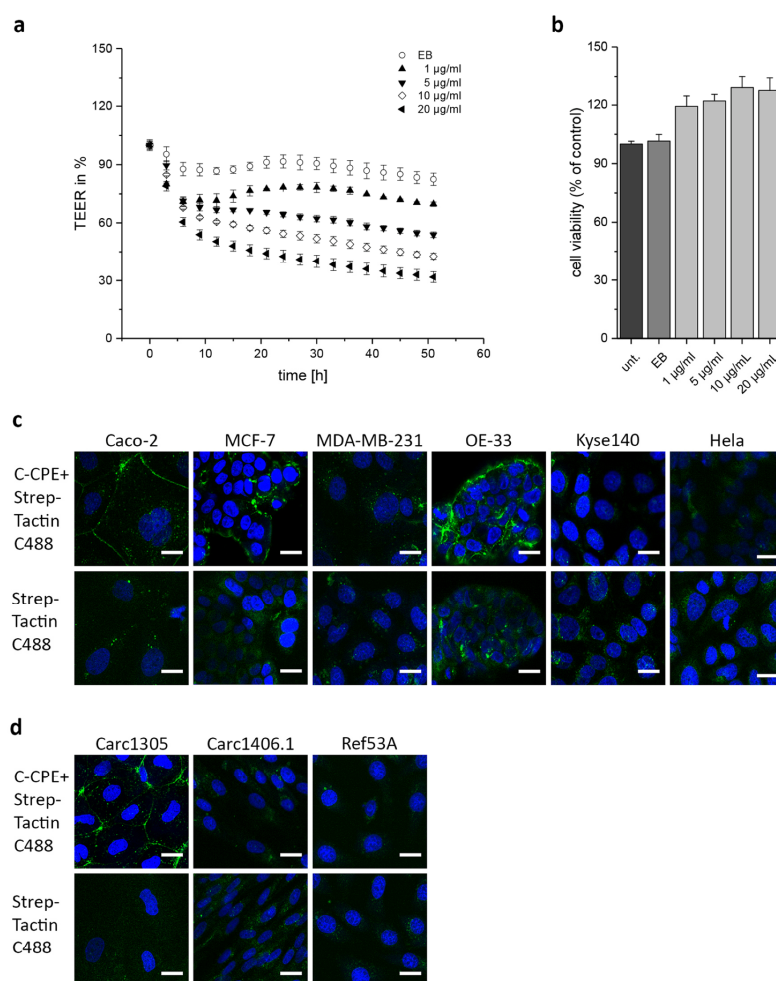


Figure 3. Functionality of the recombinant C-CPE. (a) TEER measurement of Caco-2 cell monolayer treated with different C-CPE concentrations. C-CPE reduced TEER of Caco-2 cells over time in a dose dependent manner. Elution buffer (EB) of C-CPE did not affect TEER. Graphs represent the mean \pm SEM of TEER relative to untreated cells as control reference. (b) Cell viability analyzed with MTT cytotoxicity assay after 24 h C-CPE treatment. No effect of C-CPE application on cell viability. Graphs represent the mean \pm SEM of cell viability relative to untreated cells as control reference. (c,d) Specific binding of C-CPE-Strep-Tactin-Chromeo 488 complex (C-CPE + Strep-Tactin C488) on claudin (CLDN) expressing cells. C-CPE binding at cell-cell junctions of Caco-2, MCF-7, OE-33 and Carc1305 cells (green). No binding of C-CPE on MDA-MB-231, OE-33, Kyse140, HeLa, Carc1406.1 and Ref53A cells. Application of 5 µg/ml C-CPE conjugated to Strep-Tactin-Chromeo 488 for 3 h. Nuclei are stained with Hoechst. Scale bar, 20 µm.

cell survival (Fig. 4b). Further, we observed that the killing efficiency was inversely dependent on the scanning speed. Application of a constant laser fluence of 60 mJ/cm² at scanning speed from 8 cm/s to 0.5 cm/s increased the killing efficiency. To analyze this dependency, the relative cell survival was plotted against the reverse of the respective scanning speed. Using the non-linear curve fit assistant of OriginPro 2017, the data points were fitted to the exponential equation (Fig. 4c).

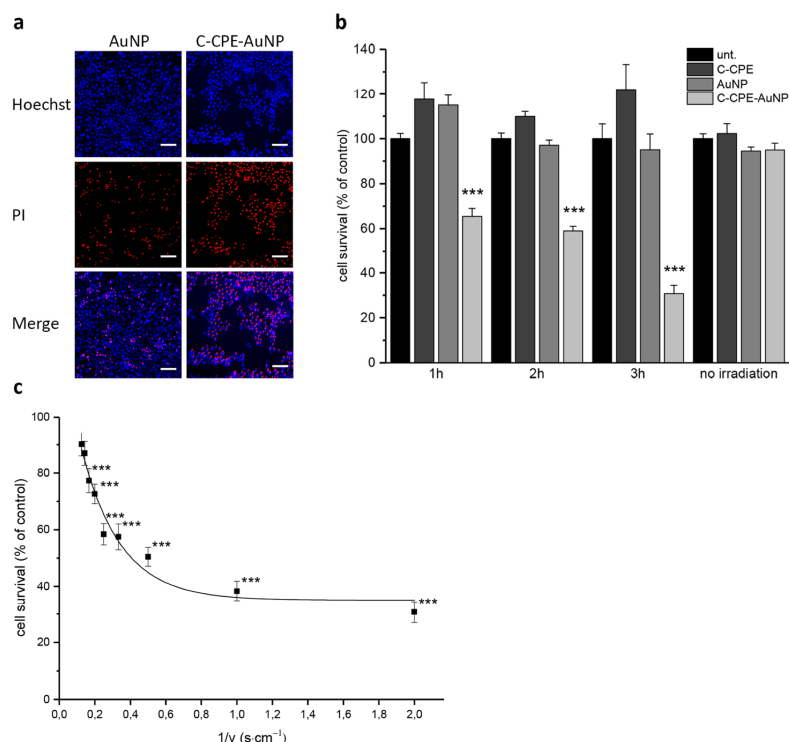


Figure 4. Killing tumor cells using gold nanoparticles functionalized with C-CPE (C-CPE-AuNP). **(a)** Propidium iodide (PI) uptake as indicator of cell death of Caco-2 cells after GNOME-LP application (60 mJ/cm^2 at 0.5 cm/s). The micrographs show an increased PI uptake in cells treated with GNOME-LP in combination with C-CPE-AuNP complex compared to cells treated with GNOME-LP in combination with non-functionalized AuNP. All nuclei are stained with Hoechst (blue). PI uptake (killing) is shown in red. Scale bar, $100 \mu\text{m}$. **(b)** Increased efficiency of C-CPE-AuNP complex mediated cell killing by prolonged adhesion time of the complex onto the cells. **(c)** The efficiency of cell killing was also enhanced by reduction of the scanning speed as shown in the plot of the relative cell survival against the reverse of respective scanning speed. All graphs represent the mean \pm SEM of cell survival relative to untreated cells as control reference. Results analyzed with Student's t test. *Significant difference to the control reference: *** $P < 0.001$.

$$y = a + (b - a)e^{\left(-\frac{\alpha - \alpha_{th}}{k}\right)}$$

From the equation, a scanning speed for half-maximal efficiency (k) of 5 cm/s was estimated. In the above equation "y" gives the relative amount of cells, which survived the killing for each scanning speed. "b" is the relative amount of cell survival (100%) when a GNOME-LP was not applied. "a" is the relative amount of cells which survived the treatment at minimal scanning speed (0.5 cm/s). α gives the reverse of the scanning speed, and α_{th} is the reverse of the maximal scanning speed (0.15 s/cm^{-1}) at which a significant cell killing was observed. For further analyses, we applied a laser fluence of 60 mJ/cm^2 and a scanning speed of 0.5 cm/s to the other cells types after an adhesion time of 3 h to test the efficiency of the killing method. Laser exposure of claudin expressing cells such as the human MCF-7 cells or the canine TiHoDMglCarc1305 cells decreased the cell survival up to 30% (Fig. 5a). For the OE-33 cells, GNOME-LP in combination with C-CPE functionalized AuNPs reduced the cell survival by about 40%, GNOME-LP in combination with non-functionalized AuNPs did not affect the cell survival. The reduced cell killing efficiency may be related to the size of OE-33 cells. Schomaker *et al.*¹² showed that, small cells were less sensitive to GNOME-LP as compared to large cells. As shown in Fig. 5d OE-33 cells were small in comparison to MCF7 or Caco-2 cells. In general, no significantly decreased cell survival of the claudin non-expressing human HeLa or the canine TiHoDMgl1406.1 and TiHoDMglRef53A cells was observed after the treatment of the C-CPE-AuNP complex combined with the GNOME-LP. In those cells, the application of

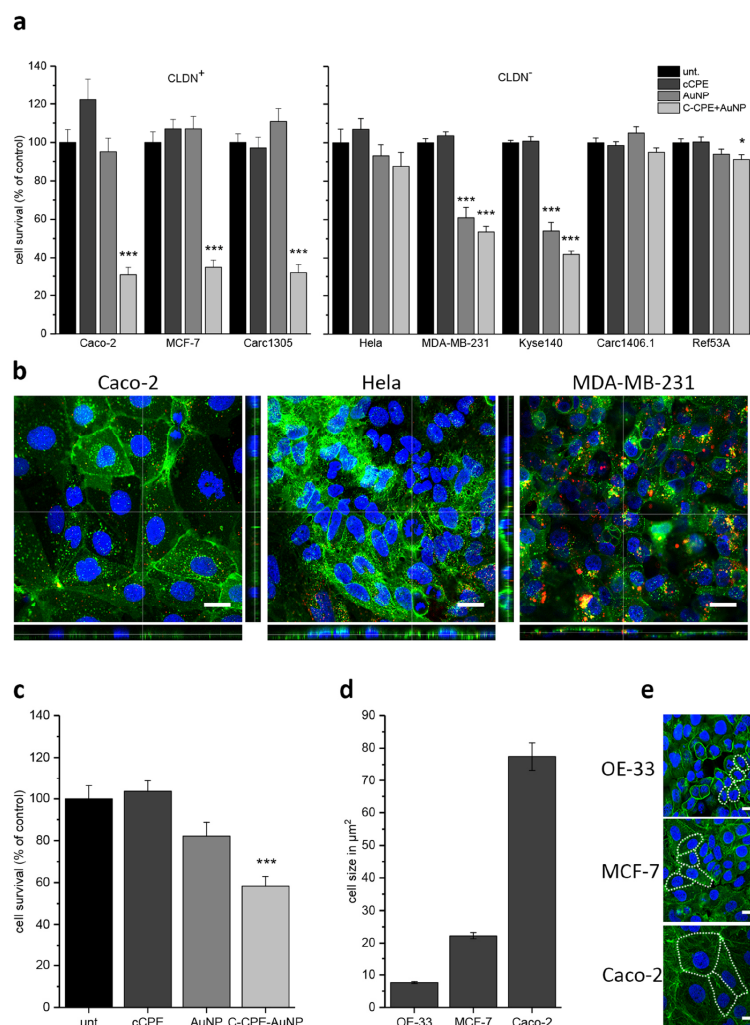


Figure 5. Killing effect of different tumor cells with C-CPE functionalized AuNP. (a) GNOME-LP (60 mJ/cm² at 0.5 cm/s) applied in combination with C-CPE-AuNP reduced cell survival of the claudin expressing Caco-2, MCF-7 and Carc1503 cells. The claudin non-expressing Hela, Carc1406.1 and Ref53A were not affected. Note the reduction of cell survival of the claudin non-expressing MDA-MB-231 and Kysc140 cells. For these cells, the reduction of cell survival was also achieved by non-functionalized AuNP. Graphs represent the mean \pm SEM of cell survival relative to untreated cells as control reference. The results were analyzed with Student's t test. *Significant difference to the control reference: * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$. (b) Confocal fluorescence images showing endocytosis of 40 nm nanobeads (red) by Caco-2, MDA-MB-231, and Hela cells. In MDA-MB-231 cells more beads (red) and even beads contained in endocytosis vesicles (yellow) were detected compared to Caco-2 or Hela cells. Cell membranes were stained with CellBrite (green) and Nuclei with Hoechst (blue). Scale bar, 25 μm . (c) Application of GNOME-LP in combination with the C-CPE-AuNP complex increased the reduced OE-33 cell survival compared to non-functionalized AuNPs. Graphs represent the mean \pm SEM of cell survival relative to untreated cells as control reference. The results were analyzed with Student's t test. *Significant difference to the control reference: *** $P < 0.001$. (d) Different cell size of OE-33, MCF-7 and Caco-2. Graphs represent the mean \pm SEM of area size. (e) Exemplary micrographs showing the area (dotted lines) of OE-33, MCF-7 and Caco-2 cells. Staining of F-Actin with Phalloidin iFluor 488 (green) and Nuclei stained with Hoechst (blue). Scale bar, 100 μm .

GNOME-LP in presence of the C-CPE-AuNP complex killed about 10% of the cells. The results are comparable to that found when GNOME-LP was applied in combination with AuNP or C-CPE alone (Fig. 5a). For the claudin non-expressing human MDA-MB-231 and Kyse140 cells the GNOME-LP treatment in combination with AuNPs without C-CPE killed 39% and 46% cells respectively. This killing efficiency was not significantly increased when GNOME-LP was combined with the C-CPE-AuNP complex. The killing of AuNP treated MDA-MB-231 cells and Kyse140 cells may be related to endocytotic activity of these cells allowing them to internalize the AuNPs. The high endocytotic activity of the MDA-MB-231 cells could be experimentally shown with fluorescent nanobeads (40 nm). Compared to Caco-2 or HeLa cells, MDA-MB-231 internalized more nanobeads (Fig. 5b). Taken together, the result show that the functionalization of AuNPs with C-CPE increases the killing efficiency and specificity of tumor cells expressing the relevant claudin proteins.

Application of the C-CPE-AuNP complex for an optic induced killing of 3D tumor spheroid models.

Tumors are 3D cell systems with an extracellular matrix maintaining the cells together. For the cell killing within a tumor, the C-CPE-AuNP complex must be able to diffuse through the matrix and bind to the cells. We therefore evaluated whether cells in extracellular matrix are still accessible for the C-CPE-AuNP complex. Cultivated in Matrigel, OE33 and MCF-7 cells formed spheroids whose volume increased with the cultivation duration (Fig. 6a,b). Within the spheroids, the cells expressed claudins as revealed by staining with Strep-Tactin Chromeo 488 conjugated to C-CPE. In the staining experiments, claudin was mostly found as expected in cell-cell junctions (Fig. 6a). The data showed that the cells within 3D spheroids correctly express the claudin proteins. The results further suggest that the C-CPE was able to enter the Matrigel and to specifically bind to claudin proteins in the cell-cell junctions. Therefore, we tested the usability of the C-CPE-AuNP complex combined with GNOME-LP for spheroid killing. The C-CPE-AuNP complex, C-CPE, or AuNP alone were given to the spheroids. After a diffusion and adhesion time of 3 h, microscopic images of the spheroids were taken followed by GNOME-LP (60 mJ/cm², 0.5 cm/s) treatment (Fig. 6c). Images were again taken 2–4 h after the GNOME-LP treatment in exactly the same plane of spheroids as before GNOME-LP application to allow a comparison of the spheroid areas before and after GNOME-LP treatment. The results indicated that GNOME-LP in combination with the C-CPE-AuNP complex reduced the spheroid area (Fig. 6d). The spheroids treated with AuNP alone in combination with GNOME-LP showed less pronounced reduced area compared to spheroids treated with GNOME-LP combined with the C-CPE-AuNP complex. The images of spheroids after GNOME-LP with the C-CPE-AuNP complex application showed additionally destroyed spheroid boundaries, probable due to cell death (Fig. 6c). The killing efficiency was increased by multiple laser exposure suggesting that a multiple laser treatment of tumor spheroids could result in a total ablation (Fig. 6d). Furthermore, by staining the apoptosis marker annexin V 48 h after laser treatment, we found an increased apoptosis in the spheroids treated with GNOME-LP combined with the C-CPE-AuNP complex as compared to GNOME-LP combined with the non-functionalized AuNPs (Fig. 6e), suggesting a long time effect of the GNOME-LP combined with the C-CPE-AuNP complex. Collectively, the results clearly indicate that the C-CPE-AuNP complex increased the killing efficiency of the GNOME-LP technique in an *in vitro* 3D culture system.

Discussion

The present report shows that C-CPE coupled to Strep-Tactin conjugated gold nanoparticles (C-CPE-AuNP) can be combined with the gold nanoparticle-mediated laser perforation (GNOME-LP) technique³² for a specific targeting of claudin-3, -4 and 7 expressing tumor cells (Figs 1, 4 and 5).

Many tumor types such as colon and breast tumor, are characterized by a reinforced expression of the CPE receptors claudin-3 -4 or -7^{23,24,43-45} (Fig. 2). It was therefore proposed to use CPE for tumor diagnosis and therapy⁴⁶⁻⁵⁰. Previous experiments demonstrated that CPE by binding to a subset of claudins, e.g. claudin-3 and -4, killed cancer cells¹⁵⁻¹⁷. Since a systemic application of CPE to kill tumor xenograft caused deleterious side effects²⁷ another way to use the enterotoxin for tumor killing should be developed. We suggest to use the non-cytotoxic C-terminal domain (D194-F319), which binds to claudins^{51,52}, for functionalization of a cell destroying component e.g. gold nanoparticles (Fig. 1). The AuNPs can then be specifically targeted on claudin expressing cells e.g. tumor cells. Optical method to activate the AuNPs can be applied for the tumor ablation. In this context, C-CPE could be a tool in cancer therapy with less side-effects compared to the original CPE. The technique could be a complement or an alternative to antibodies functionalized AuNPs^{14,53-55}.

Our observations show that the Strep-Tag fused to the N-terminal domain of our C-CPE construct does not alter the protein function and thus we used the C-CPE construct to functionalize gold nanoparticles. The decreased TEER (Fig. 3a) of expressing cells Caco-2 cell monolayer as well as of the MCF-7, OE-33 and TiHoDMglCarc1503 cell monolayer (data not shown) without affecting cell viability (Fig. 3b) suggests that the C-CPE specifically targeted claudin proteins causing a modulated tight junction integrity (Table 1). Therefore, C-CPE is not per se cytotoxic and might cause less harmful side effects. Concerning the binding affinity of C-CPE to specific claudins, C-CPE binds to claudin-3 and claudin-4 with a K_d value around $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ estimated using an optimized assay with claudin-3 and claudin-4 transfected cells²². For the 15 kDa C-CPE, 10^8 M^{-1} correspond to a concentration of about 1.2 µg/ml. In our experiments, we used a C-CPE concentration of 5 µg/ml. This concentration is in the concentration range, which was used by other authors (4–10 µg/ml) for cells naturally expressing the C-CPE receptors *in vitro* and *in vivo*^{33,34}. The reduced sensitivity to C-CPE is possible due to a different expression of the proteins in native cells as compared to transfected cells. However, the data showed that our recombinant C-CPE bound to its receptors in the cell membrane. The Strep-Tag was used to functionalize chromophore labeled Strep-Tactin for imaging claudin expressing cells or Strep-Tactin conjugated gold nanoparticles for tumor cell killing. Imaging of C-CPE binding to tumor cells (Fig. 3c,d) confirmed that the protein is capable to specifically target its receptors claudin-3, -4 and -7 expressed in the relevant tumor cells and demonstrated that the functionalization did not alter the binding capacity to the claudins.

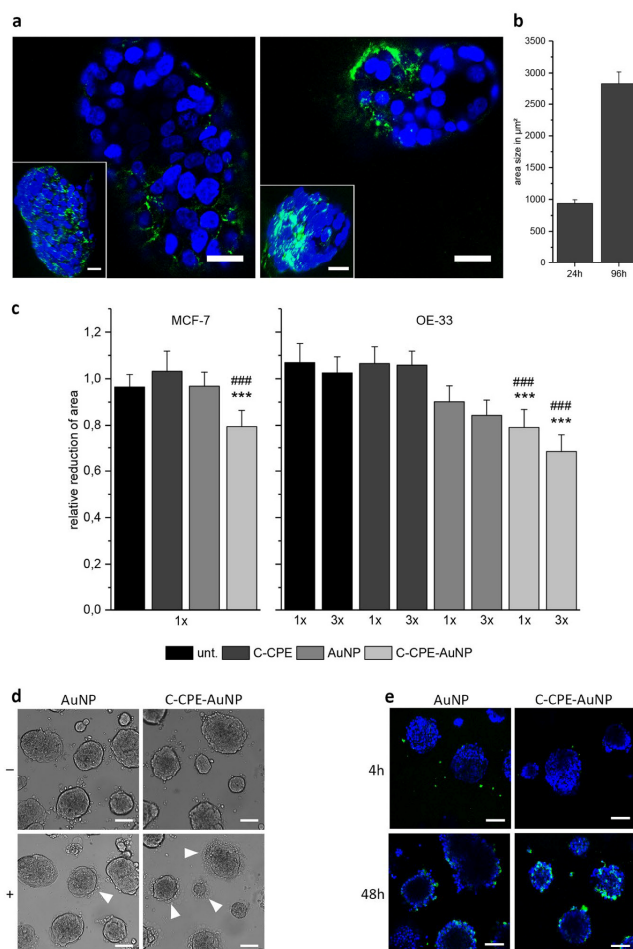


Figure 6. Killing of cells grown in spheroids with C-CPE Functionalized AuNPs. **(a)** Spheroids formed by OE-33 and MCF-7 cells cultivated in Matrigel. Confocal images of spheroids showing C-CPE-Strep-Tactin-Chromo488 (green) binding at cell-cell contacts. The inserts are reconstituted images of the spheroids after Z-stack recordings. Nuclei are stained with Hoechst (blue). Scale bar, 25 μm . **(b)** OE-33 spheroids proliferate in Matrigel indicated by increased spheroid area size over cultivation time. The spheroids were imaged in the same plane 24 h and 96 h after seeding. Graphs represent the mean \pm SEM of area size. **(c)** Quantitative evaluation of the spheroid area reduction by combination of GNome-LP with non-functionalized AuNPs or the C-CPE-AuNP complex. The C-CPE-AuNP complex increased the efficiency to reduce the spheroid area of MCF-7 and OE-33. Multiple GNome-LP application (3x) increased the reduction of the OE-33 spheroid area. Graphs represent the mean \pm SEM of the spheroid area reduction relative to the spheroid area before laser irradiation. The results were analyzed with Student's *t* test. *Significant difference to the untreated spheroids; *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$ significant difference to the AuNP treated spheroids. **(d)** Exemplary micrographs showing OE-33 spheroids before (–) and after (+) GNome-LP application with the C-CPE-AuNP complex or non-functionalized AuNPs. The presence of the C-CPE-AuNP complex reduced spheroid area and disrupted spheroid boundaries indicated by arrow heads. Scale bar, 100 μm . **(e)** Annexin V staining (green) of non-functionalized AuNPs and C-CPE-AuNP treated OE-33 spheroids after 4 h and 48 h threefold GNome-LP applications. The C-CPE-AuNP complex in combination with GNome-LP induced cell apoptosis after 48 h and smaller spheroids compared to non-functionalized AuNPs treated spheroids. Nuclei are stained with Hoechst (blue). Scale bar, 100 μm .

Cell line	Species	Tissue	CLDN expression	C-CPE binding	C-CPE effect on TEER	Cell killing
Caco-2	human	colon adenocarcinoma	CLDN-3, -4, -7	+	↓	+
MCF-7	human	mammary adenocarcinoma	CLDN-3, -4, -7	+	↓	+
MDA-MB-231	human	mammary adenocarcinoma	–	–	–	+
OE-33	human	Esophageal adenocarcinoma	CLDN-3, -4, -7	+	↓	+
Kyse140	human	Esophageal squamous carcinoma	–	–	–	+
Hela	human	cervix carcinoma	–	–	–	–
TiHoDMglCarc1305	canine	complex adenoma	CLDN-3, and -4	+	↓	+
TiHoDMglCarc1406.1	canine	carcinoma complex type	–	–	–	–
TiHoDMgl Ref53A	canine	non-neoplastic mammary tissue	–	–	–	–

Table 1. Result summary of claudin (CLDN) expression, C-CPE binding and cell killing of human and canine cells.

The GNOME-LP technology was previously found as a high-throughput, cell friendly and rapid method for a transient cell permeabilization allowing an uptake of molecules, like dyes or siRNA into cells^{32,33,36,56}. The gentle cell permeabilization was achieved by heat generated through the interaction of laser pulses and gold nanoparticles randomly adherent on the cells. In these experiments, gold nanoparticles and energy density of the applied laser beam were adjusted to achieve a transient permeabilization^{32,42,56}. In consideration of the survival, patch-clamp experiments suggested that the repair of the cells after GNOME-LP treatment had two components. (i) The closure of a GNOME-LP induced pore that has to take place within about 10 s after GNOME-LP application. (ii) A slow (about 20 min) rearrangement of the lipid bilayer in the former pore to build a totally intact membrane. During the repair process, an uptake of small molecules from the external milieu is possible^{42,57}. The survival depends on a success of these repair process. To analyze killing efficiency of GNOME-LP application using PI uptake, it is important to give PI in the cell milieu after the repair process. Evidently, the survival of cells could be strongly reduced by increasing the energy density of the applied laser beam^{58–60}. In our cell treatment, the GNOME-LP at a fluence of 60 mJ/cm² and a scanning speed of 0.5 cm/s in combination with large AuNP (200 nm) without functionalization clearly reduced cell survival to about 50% (data not shown). However, the efficiency and particularly the specificity were lower compared to tumor cell killing using C-CPE functionalized gold nanoparticles (Fig. 5a). The functionalizing of AuNPs with C-CPE (C-CPE-AuNP) reduced the cell survival to less than 30% of claudin expressing Caco-2, MCF-7 and TiHoDMglCarc1305, while the exposure of claudin non-expressing cells such as Hela, TiHoDMglCarc1406.1 and TiHoDMglRef53A did not affected the cell survival (Fig. 5a). The increased cell killing efficiency could, at least partly, be related to the fact that the 25 nm (Ø) AuNPs have an optimal absorbance at 527 nm^{61,62}, which is very close to the used laser wavelength (532 nm). Moreover, nanoparticles with reduced diameter may be appropriated for cell killing *in vivo*, since they may diffuse better into tumors. The increase of specificity is solely due to the close binding of the AuNPs on claudin expressing cells via the hook constituted by C-CPE. Of note, firstly, the claudin expressing OE-33 cells seemed to be less tackled by the combination of GNOME-LP and the C-CPE-AuNP complex (Fig. 5a). Schomaker *et al.*⁴² reported that plasmon mediated cell permeabilization efficiency was related to the cell size. Thus, the reduced cell killing efficiency OE-33 cells could be due to their small size in comparison to MCF-7 or Caco-2 cells (Fig. 5d,e). Secondly, the claudin non-expressing cells such as MDA-MB-231 or Kyse140 were significantly killed by GNOME-LP (60 mJ/cm², 0.5 cm/s) combined with C-CPE-AuNP or AuNPs (Fig. 5a) possibly due to elevated endocytotic activity of these cells (Fig. 5b). However, the observation that C-CPE functionalized AuNPs increased killing of claudin expressing cells up to more than 75% revealed the powerful efficiency of the AuNP functionalization by C-CPE. Killing tumor cells by optical methods was also shown when gold nanoparticles were functionalized using antibodies against EGF- or TF- receptors^{13,14}. The data in this report show that C-CPE could represent an easy and competitive complement or alternative functionalization method to combat tumors. With respect to tumors, the data produced using the esophageal adenocarcinoma OE-33 and the mammary adenocarcinoma MCF-7 cells cultivated in 3D culture systems showed that C-CPE was still able to recognize the claudins at the cell membrane within the 3D structures (Fig. 6a) and to link gold nanoparticles in a tissue-like system. OE-33 and MCF-7 cells are particularly interesting cells models, which were largely used as xenografts and constitute good tumor models^{63,64}. Mentionable is the reduced killing efficiency of the C-CPE-AuNP complex and that non-functionalized AuNP achieved a non-negligible killing level (Fig. 6d). This is probable due to non-specific retention of the gold nanoparticles in the matrix, which might take place in tissues. However, our results showed that when gold nanoparticle were functionalized with C-CPE, a significant more elevated killing of the cells within the matrix compared to non-functionalized gold nanoparticles. However, we observed a reduced killing efficiency in the 3D culture system compared to cells growing in monolayer using a laser fluence of 60 mJ/cm² and a scanning speed of 0.5 cm/s. It is possible that the Matrigel caused a loss of energy. We can also not exclude that the cells in 3D may express less claudins as compared to the cells cultivated in 2D, although the imaging using chroemio 488 dye labeled C-CPE did not show a strong reduction of claudin expression (Figs 3c and 6a). The possible energy loss because of the matrix can be compensated by a multiple application of the GNOME-LP, where a threefold application of GNOME-LP increased the killing efficiency (Fig. 6c). Interestingly, we could show that the combination of GNOME-LP and C-CPE functionalized AuNPs had a long time effect characterized by a continuous apoptosis (Fig. 6e) suggesting that even cells that were not directly destroyed, were irreparable injured by the treatment. Moreover, the use of near-infrared (NIR) laser pulses (650–900 nm) which are less absorbed by tissue⁶⁴ could be

Target gene	Primer sequence 5'-3'	
CPE	Frw	GAAAGATGTGTTTAAACAGTTCATCTACA
	Rev	TTAAAAATTTTGAAATAATATTGAATAAGGGTAATTCACACTTA
C-CPE	Frw	<u>GCGCATATGGATATAGAAAAAGAAATCCTTGATTTAGC</u>
	Rev	<u>GCCTCAAGAAATTTTGAAATAATATTGAATAAGGG</u>

Table 2. Primer sequences used for C-CPE production. Restriction site *NdeI* of forward primer (Frw) and *XhoI* of reverse primer (Rev) are underlined.

an option to improve the cell killing in tumor tissues and tissue-like structures. For instance, the co-application of NIR laser pulses with the C-CPE-AuNP complex could be used for cutaneous neoplasia. Furthermore, endoscopic guided laser ablation in combination of pre-treated C-CPE-AuNP tumors could be a strategy to specific combat chemo-resistant tumor types overexpressing the C-CPE receptor claudin-3 and -4 without adverse side effects.

Conclusion

Our observations show that C-CPE can be used to functionalize gold nanoparticles in order to specifically and efficiently kill a broad spectrum of claudin expressing tumor cells using an optical device such as the GNOME-LP (Fig. 1, Table 1). The method can be used even when cells proliferate in Matrigel showing that the method could be an opportunity to target tumors in tissues during a therapeutic intervention. The report also demonstrates that C-CPE can be linked to a chromophore labeled Strep-Tactin allowing the visualization of tumor cells expressing claudins. For some cancers, metastatic cells express claudin proteins. Therefore, the C-CPE coupled to a chromophore or AuNPs could be an interesting tool in cancer diagnosis and even therapy used for detection or killing of metastatic cells in body fluids.

Materials and Methods

Preparation of the *C. perfringens* enterotoxin C-terminal fragment (C-CPE). The coding region of C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ protein (NCBI Acc. Nr. M98037.1) was amplified from the genomic *C. perfringens* DNA (NCTC8239, DSMZ, Braunschweig, Germany) using specific primers (Table 2). Subsequently, the amplified *c-cpe* gene was purified for TA-cloning in pGEM-T easy vector (Promega). After plasmid isolation, the *c-cpe* gene fragment was amplified using primers with *NdeI* and *XhoI* restriction sites (Table 2). For protein expression in *E. coli* Rosetta pLysSRARE2 (Novagen, Merck, Darmstadt, Germany) the *c-cpe* gene was inserted in the expression vector pet22b using *XhoI* and *NdeI* restriction sites, which allowed fusion of the *c-cpe* gene with the Strep II-Tag. The correct insertion of the gene in the vector (pet22b-strep-c-cpe) was verified by sequencing. After transformation in *E. coli* Rosetta, the expression of C-CPE protein was induced by adding 1 mM IPTG. Thereafter, the cells were collected, lysed and the Strep II-Tag fusion C-CPE was isolated and purified using the Strep-Tactin Superflow column (IBA, Göttingen, Germany). The elution buffer consisting of (in mM) 150 NaCl, 1 EDTA, 2.5 Desthiobiotin, 100 Tris/HCl (pH: 8) was used to separate Strep-C-CPE from the column. The product was quantified by photometry and verified by western blot using the Strep-Tactin HRP antibody (1:4000).

Cell Culture. Human tumor cell lines Caco-2, MCF-7, Hela (DSMZ, Braunschweig, Germany), OE-33, Kyse140, MDA-MB-231 as well as canine tumor cell lines^{39,40} TiHoDMglCarc1305 (former called T120A.), TiHoDMglCarc1406.1 (former called DT14/06T) and TiHoDMglRef53A (former called MTH53A) were grown in tissue coated petri dishes at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The human cell lines and canine cell lines were cultured in, respectively, DMEM Ham's F12 (Biochrom) and M199 medium (Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin.

Spheroid formation. Spheroids formed by OE-33 or MCF-7 cells grown in growth factor reduced Matrigel (Corning). Briefly, 60 µl Matrigel were given in a well of a µ-Plate 96 well (ibidi, Martinsried, Germany). The plate was placed in cell culture incubator for 30 min to allow gel formation. Next, the Matrigel was overlaid with cell culture medium (250 µl). Then cells were added in the wells (5 · 10⁴ cells per well) and cultured for 3–4 days to allow spheroid formation.

Cell viability. The effect of C-CPE on cell viability was assessed using MTT assay. Briefly, cells were grown as monolayer in a 96 well plate. Subsequently, cells were incubated for 24 h with C-CPE. MTT reagent (0.5 µg/ml in PBS) was added to each well and incubated for 4 h at 37 °C. The formed formazan crystals were lysed in 100 µl isopropyl containing 40 mM hydrochloric acid. The absorbance was measured at 560 nm in a microplate reader (Mithras LB940, Berthold Technologies, Germany).

Formation of C-CPE-Chromeo 488 and C-CPE-AuNP complex. For visualization the claudins in cells the C-CPE-Chromeo 488 complex as well as for tumor cell killing the C-CPE-AuNP complex were freshly prepared before usage. The C-CPE-Chromeo 488 complex was formed by mixing 2.5 µl Strep-Tactin[®] Chromeo[™] 488 as provided by the manufacturer (iba, Göttingen; Germany) with C-CPE in elution buffer. The mix was incubated overnight at 4 °C to allow a binding between C-CPE and Strep-Tactin[®] Chromeo[™] 488. Thereafter, cell culture medium was added achieving a working concentration of 5 µg/ml C-CPE.

For the C-CPE-AuNP complex, Strep-Tactin[®]-AuNP were produced by conjugation of Strep-Tactin (iba) with 25 nm AuNP (Aurion, Wageningen, Netherlands). To produce the C-CPE-AuNP complex, C-CPE in elution buffer and Strep-Tactin[®]-AuNP, as provided by the manufacturer, were mixed and incubated overnight at 4 °C.

Target gene	NCBI AccNo.	Primer sequence 5'-3'	Amplicon size (bp)
ACTB	NM_001101.4	Frw CCTTGCACATGCCGGAG Rev GCACAGAGCCCTCGCCTT	112
GAPDH	NM_001256799.2	Frw TTGAGGTCAATGAAGGGGTC Rev GAAGGTGAAGGTGGGAGTCA	117
CLDN-3	NM_001306.3	Frw CCAACCTGCATGGACTGTGA Rev TCGACGGGGTGGTCAAGTAT	80
CLDN-4	NM_001305.4	Frw GGCCTATGGATGAACCTGCGT Rev AGCCAGATGATGCTGATGA	129
CLDN-7	NM_001185022	Frw GGACAGTGGGTCCCGC Rev CACAAATCGACCCCTCCAGT	138

Table 3. List of primer sequences used for real-time PCR.

Protein	Antibody	Working concentration
CLDN-1	rabbit anti-human CLDN-1 (Thermo Fischer Scientific, 59–9000)	5 µg/ml
CLDN-3	Rabbit anti-mouse CLDN-3 (Thermo Fischer Scientific, 34–1700)	3 µg/ml
CLDN-4	Mouse anti-human CLDN-4 (Thermo Fischer Scientific, 34–1700)	3 µg/ml
CLDN-7	Rabbit anti-human CLDN-7 (Thermo Fischer Scientific, 32–9400)	2 µg/ml

Table 4. Antibodies used for immunofluorescence experiments.

Cell culture medium was added to achieve a working volume of 100 µl for each well of a µ-Plate 96. The volume of the C-CPE and Strep-Tactin®-AuNP solution in mixture were adjusted to a working concentrations of 5 µg/ml C-CPE and $2.5 \cdot 10^{10}$ AuNPs.

Monitoring of transepithelial electrical resistance (TEER). TEER measurement was performed by impedance spectroscopy using the cellZscope (nanoAnalytics, Muenster, Germany). For measurement, human or canine cells were seeded in inserts consisting of a transparent PET membrane with pore size of 0.4 µm (Cat. No: 353504; BD Falcon, Corning) in DMEM or M199 cell culture medium. Inserts with the cells were transferred into the cellZscope and placed in the cell culture incubator. TEER data were automatically registered every 3 h with the cellZscope software. Once cells reached a constant TEER, cells were treated with C-CPE diluted in cell culture medium and TEER was monitored every hour.

Real-time PCR. The level of mRNA expression of human claudin-3, -4 and -7 (CLDN-3, -4 and -7) was examined by quantitative real-time PCR. Briefly, the total RNA was isolated using the peqGold Total RNA kit (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) according to the manufacturer's protocol. The following cDNA synthesis was performed with the maximal first strand cDNA synthesis kit (ThermoScientific). Primer pairs for CLDN-1, CLDN-3, CLDN-4 and CLDN-7 (Table 3) were designed according to the mRNA sequences given in the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The amplicates were sequenced to confirm all genes. For real-time PCR 1 x Kapa SYBR FAST Universal mastermix (Sigma Aldrich) was used and PCR reaction (40 cycles followed by a melting stage) was performed in the real-time PCR cycler peqSTAR 96q (PEQLAB Biotechnologie GmbH). Gene expression was normalized to endogenous housekeeping genes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and beta-actin (ACTB), ratio of gene expression based on $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Visualization of claudins in cells. Expressed claudin-3, -4 and -7 in cells were visualized with immunofluorescence or the C-CPE-Chromeo 488 complex. For immunofluorescence, the cells were grown to monolayer on rat collagen type I coated cover slips. After washing with PBS, the cells were fixed with 4% formaldehyde and permeabilized with 0.3% TritonX-100 in PBS. After washing with PBS unspecific binding sites were blocked with 1% BSA in PBS for 30 min at 37 °C. Claudins were stained with primary antibodies (Table 4) diluted in PBS with 1% BSA overnight at 4 °C. Subsequently, the cells were washed with PBS and incubated with fluorescein conjugated anti-rabbit (Merck Millipore) or FITC conjugated anti-mouse secondary antibody (Merck Millipore, AQ303F) diluted 1:100 in PBS with 1% BSA (SigmaAldrich) for 1 h at 37 °C. For nuclear staining, DAPI (2 µM) was added during the staining with secondary antibody. For C-CPE-Chromeo 488 complex related claudin visualization, cells similarly cultured as for immunofluorescence, were stained with C-CPE-Chromeo 488 complex as described above. The cells were stained for 3 h in a cell culture incubator. Nuclei were stained with 1 µM Hoechst added to the cells for the last incubation hour. The cells were fixed with 4% formaldehyde, washed with PBS, and stored in PBS for further confocal microscopic analysis.

Gold nanoparticle-mediated (GNOME) laser perforation for tumor cell killing. For tumor cell killing confluent cells or spheroids were treated with the C-CPE-AuNP complex for 3 h in cell culture incubator to allow complex adhesion to the cells. Control groups were incubated with either non-functionalized AuNPs or C-CPE alone. The µ-96 plate with the cells was transferred to the laser perforator (Laser Zentrum Hannover,

Hannover, Germany) as described in Heinmann *et al.*³², and exposed to a 20 kHz pulsed laser (532 nm) with 60 mW (60 mJ/cm²) at 0.5 cm/s. After optical treatment, the cells were transferred back into the incubator for 30–60 min to allow not killed cells to reseal the membrane as it was shown that only permeabilized but not killed cells were able to reseal the membrane within 20 min^{42,57}. After optical treatment, the cells were transferred back into the incubator for 30–60 min. Propidium iodide (10 μM) and Hoechst 33258 (Sigma Aldrich) were added to the cells for 60 min. Under fluorescence microscope, dead cells were indicated by propidium iodide and Hoechst uptake, while health cells were only Hoechst positive. Apoptotic cells were indicated by annexin V ATTO 488 conjugate (1:40 in cell culture medium) staining.

Cell imaging. Immunofluorescence, C-CPE-Chromo 488 binding or nanobead endocytosis was imaged with Nikon Eclipse TE2000-E confocal laser scanning microscope (461 nm for DAPI/Hoechst, 488 for C-CPE/CLDN/CellBrite/annexin V and 535 nm for nanobeads), with a 60x water immersion objective and EZ-C1 3.80 software program (Nikon, Düsseldorf, Germany).

Propidium iodide (PI) uptake after cell killing was performed with a Ti-E inverted fluorescence microscope (Nikon, Duesseldorf, Germany). Images were taken with 10x objective and Nikon Software Nis-Elements 4.4 (346 nm for Hoechst 33258 and 535 nm for PI). All images were processed with ImageJ/Fiji for further quantitative evaluation.

Statistical analysis. The result are given as mean of at least three independent experiments for each treatment. The error bars represent S.E.M. Statistical comparison between groups was performed using the Student's paired two-sided t test.

References

- Carpin, L. B. *et al.* Immunoconjugated gold nanoshell-mediated photothermal ablation of trastuzumab-resistant breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* **125**, 27–34 (2011).
- Nahta, R., Yu, D., Hung, M.-C., Hortobagyi, G. N. & Esteva, F. J. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nature clinical practice. Oncology* **3**, 269–280 (2006).
- Slamon, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science (New York, N.Y.)* **235**, 177–182 (1987).
- Cobleigh, M. A. *et al.* Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* **17**, 2639–2648 (1999).
- Vogel, C. L. *et al.* Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* **20**, 719–726 (2002).
- Nahta, R. & Esteva, F. J. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast cancer research: BCR* **8**, 215 (2006).
- Valabrega, G., Montemurro, F. & Aglietta, M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* **18**, 977–984 (2007).
- Abadeer, N. S. & Murphy, C. J. Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **120**, 4691–4716 (2016).
- Ashiq, M. G. B., Saeed, M. A., Tahir, B. A., Ibrahim, N. & Nadeem, M. Breast cancer therapy by laser-induced Coulomb explosion of gold nanoparticles. *Chinese journal of cancer research Chung-kuo yen cheng yen chiu* **25**, 756–761 (2013).
- Huang, X. & El-Sayed, M. A. Gold nanoparticles. Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research* **1**, 13–28 (2010).
- Bartczak, D., Muskens, O. L., Millar, T. M., Sanchez-Elsner, T. & Kanaras, A. G. Laser-induced damage and recovery of plasmonically targeted human endothelial cells. *Nano letters* **11**, 1358–1363 (2011).
- Lo, C.-L. *et al.* The effect of PEG-5 K grafting level and particle size on tumor accumulation and cellular uptake. *International journal of pharmaceutics* **456**, 424–431 (2013).
- El-Sayed, I. H., Huang, X. & El-Sayed, M. A. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. *Nano letters* **5**, 829–834 (2005).
- Choi, C. H. J., Alabi, C. A., Webster, P. & Davis, M. E. Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 1235–1240 (2010).
- Ding, L., Lu, Z., Lu, Q. & Chen, Y.-H. The claudin family of proteins in human malignancy: a clinical perspective. *Cancer management and research* **5**, 367–375 (2013).
- Escudero-Esparza, A., Jiang, W. G. & Martin, T. A. The Claudin family and its role in cancer and metastasis. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* **16**, 1069–1083 (2011).
- Singh, A. B., Uppada, S. B. & Dhawan, P. Claudin proteins, outside-in signaling, and carcinogenesis. *Pflugers Archiv: European journal of physiology* **469**, 69–75 (2017).
- Shang, X., Lin, X., Alvarez, E., Manorek, G. & Howell, S. B. Tight Junction Proteins Claudin-3 and Claudin-4 Control Tumor Growth and Metastases. *Neoplasia* **14**, 974–IN22 (2012).
- Blanchard, A. A. *et al.* Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Archiv: an international journal of pathology* **454**, 647–656 (2009).
- Gyorffy, H. *et al.* Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Virchows Archiv: an international journal of pathology* **447**, 961–968 (2005).
- Chiba, H., Osanai, M., Murata, M., Kojima, T. & Sawada, N. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochimica et biophysica acta* **1778**, 588–600 (2008).
- Fujita, K. *et al.* Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS letters* **476**, 258–261 (2000).
- Katahira, J., Inoue, N., Horiguchi, Y., Matsuda, M. & Sugimoto, N. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for Clostridium perfringens enterotoxin. *The Journal of cell biology* **136**, 1239–1247 (1997).
- Sonoda, N. *et al.* Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *The Journal of cell biology* **147**, 195–204 (1999).
- Veshnyakova, A. *et al.* Mechanism of Clostridium perfringens enterotoxin interaction with claudin-3/-4 protein suggests structural modifications of the toxin to target specific claudins. *The Journal of biological chemistry* **287**, 1698–1708 (2012).
- Santin, A. D. *et al.* Treatment of chemotherapy-resistant human ovarian cancer xenografts in C.B-17/SCID mice by intraperitoneal administration of Clostridium perfringens enterotoxin. *Cancer research* **65**, 4334–4342 (2005).
- Kominsky, S. L. *et al.* Clostridium perfringens Enterotoxin Elicits Rapid and Specific Cytolysis of Breast Carcinoma Cells Mediated through Tight Junction Proteins Claudin 3 and 4. *The American Journal of Pathology* **164**, 1627–1633 (2004).

28. Kitadokoro, K. *et al.* Crystal structure of Clostridium perfringens enterotoxin displays features of beta-pore-forming toxins. *The Journal of biological chemistry* **286**, 19549–19555 (2011).
29. Black, J. D. *et al.* Clostridium perfringens enterotoxin (CPE) and CPE-binding domain (c-CPE) for the detection and treatment of gynecologic cancers. *Toxins* **2**, 1116–1125 (2015).
30. Kimura, J. *et al.* Clostridium perfringens enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. *The Journal of biological chemistry* **285**, 401–408 (2010).
31. Mitchell, L. A. & Koval, M. Specificity of interaction between clostridium perfringens enterotoxin and claudin-family tight junction proteins. *Toxins* **2**, 1595–1611 (2010).
32. Heinemann, D. *et al.* Gold nanoparticle mediated laser transfection for efficient siRNA mediated gene knock down. *PLoS one* **8**, e58604 (2013).
33. Kono, T. *et al.* Claudin-4 binder C-CPE 194 enhances effects of anticancer agents on pancreatic cancer cell lines via a MAPK pathway. *Pharmacology research & perspectives* **3**, e00196 (2015).
34. Cocco, E. *et al.* Clostridium perfringens enterotoxin carboxy-terminal fragment is a novel tumor-homing peptide for human ovarian cancer. *BMC cancer* **10**, 349 (2010).
35. Baumgart, J. *et al.* Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living GFSHR-17 and MTH53 a cells. *Optics express* **16**, 3021–3031 (2008).
36. Begandt, D. *et al.* Gold nanoparticle-mediated (GNOME) laser perforation: a new method for a high-throughput analysis of gap junction intercellular coupling. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **47**, 441–449 (2015).
37. Schmidt, T. G. M. & Skerra, A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature protocols* **2**, 1528–1535 (2007).
38. Doi, N., Tomita, M. & Hayashi, M. Absorption enhancement effect of acylcarnitines through changes in tight junction protein in Caco-2 cell monolayers. *Drug metabolism and pharmacokinetics* **26**, 162–170 (2011).
39. Hammer, S. C. *et al.* Claudin-1, -3, -4 and -7 gene expression analyses in canine prostate carcinoma and mammary tissue derived cell lines. *Neoplasia* **63**, 231–238 (2016).
40. Hammer, S. C. *et al.* Longitudinal Claudin Gene Expression Analyses in Canine Mammary Tissues and Thereof Derived Primary Cultures and Cell Lines. *International journal of molecular sciences* **17** (2016).
41. Kondoh, M., Takahashi, A., Fujii, M., Yagi, K. & Watanabe, Y. A novel strategy for a drug delivery system using a claudin modulator. *Biological & pharmaceutical bulletin* **29**, 1783–1789 (2006).
42. Schomaker, M. *et al.* Biophysical effects in off-resonant gold nanoparticle mediated (GNOME) laser transfection of cell lines, primary- and stem cells using fs laser pulses. *Journal of biophotonics* **8**, 646–658 (2015).
43. Gao, Z. *et al.* C terminus of Clostridium perfringens enterotoxin downregulates CLDN4 and sensitizes ovarian cancer cells to Taxol and Carboplatin. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 1065–1074 (2011).
44. Veshnyakova, A. *et al.* On the interaction of Clostridium perfringens enterotoxin with claudins. *Toxins* **2**, 1336–1356 (2010).
45. Oliveira, S. S. & Morgado-Diaz, J. A. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **64**, 17–28 (2007).
46. Pahlé, J. *et al.* Rapid eradication of colon carcinoma by Clostridium perfringens Enterotoxin suicidal gene therapy. *BMC cancer* **17**, 129 (2017).
47. Oliveira, S. S., de, Oliveira, I. M., de, Souza, Wde & Morgado-Diaz, J. A. Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS letters* **579**, 6179–6185 (2005).
48. Kulka, J. *et al.* Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas. *Pathology oncology research: POR* **15**, 59–64 (2009).
49. Hicks, D. A. *et al.* Claudin-4 activity in ovarian tumor cell apoptosis resistance and migration. *BMC cancer* **16**, 788 (2016).
50. Ono, Y. *et al.* Claudins-4 and -7 might be valuable markers to distinguish hepatocellular carcinoma from cholangiocarcinoma. *Virchows Archiv: an international journal of pathology* **469**, 417–426 (2016).
51. Kokai-Kun, J. F. & McClane, B. A. Deletion analysis of the Clostridium perfringens enterotoxin. *Infection and Immunity* **65**, 1014–1022 (1997).
52. van Itallie, C. M., Betts, L., Smedley, J. G. 3, McClane, B. A. & Anderson, J. M. Structure of the claudin-binding domain of Clostridium perfringens enterotoxin. *The Journal of biological chemistry* **283**, 268–274 (2008).
53. Hirsch, L. R. *et al.* Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 13549–13554 (2003).
54. Qu, X., Yao, C., Wang, J., Li, Z. & Zhang, Z. Anti-CD30-targeted gold nanoparticles for photothermal therapy of L-428 Hodgkin's cell. *International journal of nanomedicine* **7**, 6095–6103 (2012).
55. Rau, L.-R., Huang, W.-Y., Liaw, J.-W. & Tsai, S.-W. Photothermal effects of laser-activated surface plasmonic gold nanoparticles on the apoptosis and osteogenesis of osteoblast-like cells. *International journal of nanomedicine* **11**, 3461–3473 (2016).
56. Kalies, S. *et al.* Immobilization of gold nanoparticles on cell culture surfaces for safe and enhanced gold nanoparticle-mediated laser transfection. *Journal of biomedical optics* **19**, 70505 (2014).
57. Yao, S., Rana, S., Liu, D. & Wise, G. E. Electroporation optimization to deliver plasmid DNA into dental follicle cells. *Biotechnology journal* **4**, 1488–1496 (2009).
58. Li, J.-L. & Gu, M. Surface plasmonic gold nanorods for enhanced two-photon microscopic imaging and apoptosis induction of cancer cells. *Biomaterials* **31**, 9492–9498 (2010).
59. Tong, L. *et al.* Gold Nanorods Mediate Tumor Cell Death by Compromising Membrane Integrity. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **19**, 3136–3141 (2007).
60. Lukianova-Hleb, E. Y., Koneva, I. I., Oginsky, A. O., La Francesca, S. & Lapotko, D. O. Selective and self-guided micro-ablation of tissue with plasmonic nanobubbles. *The Journal of surgical research* **166**, e3–13 (2011).
61. Moser, F. *et al.* Cellular Uptake of Gold Nanoparticles and Their Behavior as Labels for Localization Microscopy. *Biophysical Journal* **110**, 947–953 (2016).
62. Yakunin, A. N., Avetisyan, Y. A. & Tuchin, V. V. Quantification of laser local hyperthermia induced by gold plasmonic nanoparticles. *Journal of biomedical optics* **20**(5), 051030, <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.5.051030> (2015).
63. Kim, J. B., O'Hare, M. J. & Stein, R. Models of breast cancer: is merging human and animal models the future? *Breast cancer research: BCR* **6**, 22–30 (2004).
64. Dreaden, E. C., Austin, L. A., Mackey, M. A. & El-Sayed, M. A. Size matters. Gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. *Therapeutic Delivery* **3**, 457–478 (2012).

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. B. Nitzsche, Charité, Universitätsmedizin Berlin for kindly providing the OE-33 and Kyse140 cells and Prof. R. Hass, Hannover Medical School Hannover for kindly providing the MDA-MB-231 cells. Prof. Dr. Alexander Heisterkamp and Dr. Maria Leilani Torres-Mapa, Institute of Quantum Optics, Leibniz University Hannover for proof reading. The project was partly supported by DFG Transregio TR73. The publication of this article was funded by the Open Access Fund of the Leibniz Universität Hannover.

Author Contributions

A.B.: conception of the experiments, experiments, writing of the manuscript. M.L.: Cloning and production of the C-CPE. B.L.S.M.: Cloning and production of the C-CPE. S.C.H.: Establishment of the canine cells, analysis of claudin expression in the canine cells. S.A.: Establishment of the canine cells, analysis of claudin expression in the canine cells. H.M.E.: Establishment of the canine cells, analysis of claudin expression in the canine cells. A.N.: experimental conception, writing of the manuscript, mentoring, funding.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

2.2 Manuskript 2

Parameter der Optoperforation-induzierten Tötung von Krebszellen mit Goldnanopartikel funktionalisierten C-terminalen *Clostridium perfringens* Enterotoxin

Parameters for Optoperforation induced Killing of Cancer Cells using Gold Nanoparticles Functionalized with the C-Terminal Fragment of Clostridium Perfringens Enterotoxin

Annegret Becker, Tina Lehrich, Stefan Kalies, Alexander Heisterkamp, Anaclet Ngezahayo

International Journal of Molecular Science

Volume 20, Issue 17, Article 4248 (2019), DOI:10.3390/ijms20174248

Published by MDPI, Basel, Switzerland. This publication is an open access article under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Copyright and Licensing

For all articles published in MDPI journals, copyright is retained by the authors. Articles are licensed under an open access Creative Commons CC BY 4.0 license, meaning that anyone may download and read the paper for free. In addition, the article may be reused and quoted provided that the original published version is cited. These conditions allow for maximum use and exposure of the work, while ensuring that the authors receive proper credit.



Article

Parameters for Optoperforation-Induced Killing of Cancer Cells Using Gold Nanoparticles Functionalized With the C-terminal Fragment of *Clostridium Perfringens* Enterotoxin

Annegret Becker¹, Tina Lehrich¹, Stefan Kalies^{2,3}, Alexander Heisterkamp^{2,3} and Anacleto Ngezahayo^{1,4,*} ¹ Department of Cell Physiology and Biophysics, Institute of Cell Biology and Biophysics, Leibniz University Hannover, 30419 Hannover, Germany² Institute of Quantum Optics, Leibniz University Hannover, 30167 Hannover, Germany³ Lower Saxony Centre for Biomedical Engineering, Implant Research and Development, 30625 Hannover, Germany⁴ Center for Systems Neurosciences (ZSN), Veterinary Medicine University Hannover, 30559 Hannover, Germany

* Correspondence: ngezahayo@cell.uni-hannover.de; Tel.: +49-511-762-4568

Received: 11 August 2019; Accepted: 28 August 2019; Published: 30 August 2019



Abstract: Recently, we used a recombinant produced C-terminus (D194-F319) of the *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE) to functionalize gold nanoparticles (AuNPs) for a subsequent specific killing of claudin expressing tumor cells using the gold nanoparticle-mediated laser perforation (GNOME-LP) technique. For a future in vivo application, it will be crucial to know the physical parameters and the biological mechanisms inducing cell death for a rational adaptation of the system to real time situation. Regarding the AuNP functionalization, we observed that a relationship of 2.5×10^{-11} AuNP/mL to 20 $\mu\text{g/mL}$ C-CPE maximized the killing efficiency. Regarding physical parameters, a laser fluence up to 30 mJ/cm² increased the killing efficiency. Independent from the applied laser fluence, the maximal killing efficiency was achieved at a scanning velocity of 5 mm/s. In 3D matrigel culture system, the GNOME-LP/C-CPE-AuNP completely destroyed spheroids composed of Caco-2 cells and reduced OE-33 cell spheroid formation. At the biology level, GNOME-LP/C-CPE-AuNP-treated cells bound annexin V and showed reduced mitochondria activity. However, an increased caspase-3/7 activity in the cells was not found. Similarly, DNA analysis revealed no apoptosis-related DNA ladder. The results suggest that the GNOME-LP/C-CPE-AuNP treatment induced necrotic than apoptotic reaction in tumor cells.

Keywords: C-CPE; gold nanoparticle; GNOME-LP; apoptosis; necrosis

1. Introduction

The gold nanoparticle-mediated (GNOME) laser perforation (GNOME-LP) technology was developed to achieve a gentle cell permeabilization allowing the entry of small molecule into cells while maintaining a maximal survival [1,2]. In this context, the GNOME-LP technique was used for an accurate and high-throughput analysis of gap junction coupling [3] and for an efficient knock down of genes using specific siRNAs or morpholinos [2].

In a previous work, we showed that a recombinant produced C-terminus (D194-F319) of the *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE) could be used to functionalize gold nanoparticles (AuNPs) for a subsequently optoperforation-induced killing of tumor cells expressing the CPE receptors,

claudin-3, -4, and -7 using GNOME-LP [4]. The advantage of using the C-CPE polypeptide is the binding ability to claudins without causing cytotoxicity as compared to the full-length CPE [5]. Moreover, C-CPE-functionalized AuNPs (C-CPE-AuNPs) allowed specific targeting of cells and increased the killing efficiency [4]. In order to kill tumor cells, the applied laser fluence was increased while the scanning velocity was reduced in comparison to the experiments, in which a maximal cell survival was the objective. The mechanisms of cell killing are still a matter of speculation, hindering a rational optimization of the technique in terms of maximal ablation of tumor cells with minimal action on non-tumor tissue.

GNOME-LP affects cells by combined laser-induced heating due to the plasmon resonance, which can lead to formation of plasmonic bubble [2,6]. The presumable cause of cell death may be related to induced necrosis or apoptosis in the cells. Apoptosis, also called programmed cell death, is a cellular reaction related to specific proteases called caspases that cleave cellular structure proteins, nuclear proteins, and DNA [6]. The resulting DNA fragments are integer multiples approximately 200 bp in size. Separated in gel electrophoresis, these DNA fragments produce a characteristic ladder pattern [7–10]. Apoptotic reactions also involve mitochondrial damage resulting in breakdown of the mitochondrial membrane potential (MMP) and ATP depletion [11]. The MMP breakdown results in reduction of mitochondrial staining using MitoTracker, allowing an analysis of apoptosis using fluorescence microscopy [12,13]. Moreover, the ATP depletion suppress the activity of ATPase enzymes such as flippases, which are responsible for the backhaul of lipids like phosphatidylserine lipids in the inner membrane leaflet, allowing the maintenance of a polarized cell membrane with respect to lipid composition of the leaflets [14]. An increased presence of phosphatidylserine lipids in outer leaflet as a result of induction of apoptosis can be demonstrated using annexin V staining and represents another marker of a cell undergoing apoptosis [15,16]. In tissues, apoptosis is a cellular dismantling with a relatively stable plasma membrane. The cells undergoing apoptosis are finally cleared by macrophages before lysis and release of intracellular molecules, thereby avoiding induction of an immune response [17]. In contrast, necrosis is unregulated or an accidental cell death, mostly induced by exogenous stress and correlated with cell lysis with release of intracellular material in the tissue. The release of intracellular material acts as chemoattractant and activates an inflammatory reaction [18]. In tumors, necrosis may allow release of tumor neoantigens that could act like microbial pathogens-associated molecular patterns (PAMPs) or damage-associated molecular patterns (DAMPs) and activate immune-specific responses [19–23]. Such tumor neoantigens are expressed by tumor cells. However, they are maintained in the cells and rarely presented to the immune cells due to loss of HLA class I by tumor cells [24–26]. By inducing necrosis in tumor, it may be possible to increase the presence of these tumor antigens in the extracellular space within the tumor. The immune cells recruited by necrosis will find the liberated tumor neoantigens in an accessible environment, rendering possible an induction of immunological response to the tumor cells [20].

Related to our recent study demonstrating optoperforation-mediated killing of tumor cells with C-CPE-AuNPs, the present report analyzed the physical parameters and the biological mechanisms inducing the cell death with the objective to determine the range of adaptation for future in vivo application for clinical therapeutic intervention.

2. Results

In a recent report, we showed that C-CPE -functionalized AuNPs in combination with GNOME-LP efficiently killed tumor cells expressing CLDN-3, -4, and -7, documented by the uptake of membrane impermeable molecule such as propidium iodide [4]. In the present report, we analyzed further physical parameters that might affect the efficiency of the GNOME-LP-induced cell killing. Moreover, we determined whether apoptotic mechanisms are involved in the cell death.

Using Caco-2 cells, we analyzed whether changing the concentration of the C-CPE during functionalizing of the AuNPs could change the GNOME-LP-induced cell killing efficiency. AuNPs (2.5×10^{10} particle/mL) functionalized with 5 μ g/mL C-CPE in combination with GNOME-LP at a laser

fluence of 30 mJ/cm² with scanning velocity of 5 mm/s revealed a cell survival of 40% (Figure 1A). Increasing the concentration of the C-CPE during the functionalization process to 12 µg/mL, 20 µg/mL, and 50 µg/mL reduced the cell survival to 12%, 8%, and 13%, respectively (Figure 1A), showing an increased cell killing efficiency compared to a concentration of 5 µg/mL C-CPE.

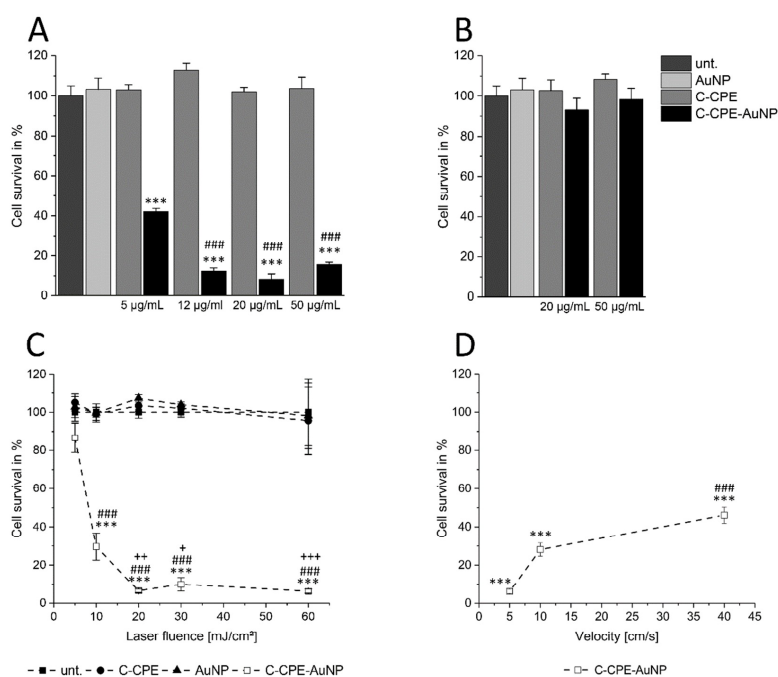


Figure 1. Increased C-CPE concentration for AuNP functionalization increased the efficiency of gold nanoparticle-mediated laser perforation (GNOME-LP)-induced cell killing of Caco-2 cells. (A) The survival of Caco-2 cells evaluated by propidium iodide uptake in cells treated with GNOME-LP (30 mJ/cm² at 5 mm/s) in presence of C-CPE, AuNPs, and C-CPE functionalized AuNPs (C-CPE-AuNPs). The increase of C-CPE concentration during functionalization process reduced the cell survival. The results were analyzed with Student's *t* test. * Significant difference to the AuNP control group: *** $p < 0.001$. # Significant difference to 5 µg/mL C-CPE functionalized AuNPs: ### $p < 0.001$. (B) GNOME-LP cell killing with lower laser fluence (5 mJ/cm² at 5 mm/s) in combination with AuNPs functionalized with 20 µg/mL and 50 µg/mL C-CPE did not affect the cell survival. (C) Killing efficiency of AuNP functionalized with 20 µg/mL C-CPE and GNOME-LP (30 mJ/cm²) applied at indicated scanning velocity. The results were analyzed with Student's *t* test. * Significant difference to the AuNP control group: *** $p < 0.001$. # Significant difference to velocity of 5 mm/s: ### $p < 0.001$. (D) GNOME-LP with different laser fluence (5–60 mJ/m²; 0.5 s/cm) in combination with 20 µg/mL C-CPE functionalized AuNPs. The results were analyzed with Student's *t* test. * Significant difference to the AuNP control group: *** $p < 0.001$. # Significant difference to laser energy of 5 mJ/cm²: ### $p < 0.001$. + Significant difference to the laser fluence of 10 mJ/cm²: + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$. All graphs represent the mean \pm SEM of cell survival relative to untreated cells (unt.).

Next, GNOME-LP was performed using a laser fluence of 5 mJ/cm² as well as 20 µg/mL and 50 µg/mL C-CPE for AuNP functionalization to evaluate whether the increased C-CPE concentration could allow further reduction of the laser fluence for efficient cell killing. The reduced laser

fluence did not affect cell survival for both C-CPE concentrations used for AuNP functionalization (Figure 1B). Taken together, the increased C-CPE concentration from 20 $\mu\text{g/mL}$ to 50 $\mu\text{g/mL}$ for AuNP functionalization did not increase the efficiency of cell killing using GNOME-LP at a fluence of 5 mJ/cm^2 . After we observed that 20 $\mu\text{g/mL}$ C-CPE coupled to Strep-Tactin Chromeo conjugate also saturated the binding of C-CPE onto the cells (Figure S1) and that 2.5×10^{10} AuNPs/mL were the more effective for cell killing (Figure S2), we chose to use 20 $\mu\text{g/mL}$ C-CPE.

For functionalization of the AuNPs (2.5×10^{10} AuNPs/mL), in order to analyze the influence of other parameters on the efficiency of cell killing in this context, we analyzed how changes in laser fluence or scanning velocity affected the cell killing efficiency. Using a constant velocity of 5 mm/s we found that a laser fluence of 5 mJ/cm^2 reduced the cell survival to 89% compared to the AuNP control group. Application of laser fluence to 10 mJ/cm^2 correlated with a reduction of the cell survival to 29%. With a laser fluence of 20 mJ/cm^2 we observed a cell survival of only 8%, which could not be further reduced by increased laser fluence to 30 mJ/cm^2 or 60 mJ/cm^2 (Figure 1 C), suggesting that a laser fluence of at least 20 mJ/cm^2 was necessary for a maximal cell killing. Considering the scanning velocity, GNOME-LP at a laser fluence of 30 J/cm^2 was applied at 5 mm/s, 10 mm/s, and 40 mm/s. The respective cell survival of 8%, 28%, and 46% (Figure 1D) indicated that a scanning velocity of 5 mm/s had the most effect on cell survival. Eventually, we applied GNOME-LP with a laser fluence of 30 mJ/cm^2 at 5 mm/s in combination with functionalized AuNPs using 20 $\mu\text{g/mL}$ C-CPE for further experiments.

Since tumors are 3D structures, we analyzed whether increasing the C-CPE concentration during the functionalization of the AuNPs increased the GNOME-LP-affected spheroid structure composed of Caco-2 or OE-33 cells (Figure 2). The spheroids were incubated for 3 h with the C-CPE-AuNPs before GNOME-LP with 60 mJ/cm^2 and 5 mm/s. We compared images of the spheroids taken at a same position before and after three-time GNOME-LP treatments. The presence of the C-CPE-AuNPs reduced the number of intact Caco-2 spheroids compared to the spheroids incubated with non-functionalized AuNPs or untreated spheroids (Figure 2C). The OE-33 spheroids treated with the C-CPE-AuNPs showed almost intact spheroid structure after GNOME-LP but displayed 50% reduced spheroid area (Figure 2D). To assess the cell viability of the cells in Caco-2 or OE-33 spheroids after GNOME-LP treatment, the spheroids were stained with propidium iodide and calcein AM. In living cells, the non-fluorescent cell-permeant dye calcein AM is converted to green-fluorescent calcein. Z-stack images of the spheroids after GNOME-LP in the presence of the C-CPE-AuNPs showed large peripheral propidium iodide-positive cells (red) without green fluorescence surrounding a central core with calcein (green) positive cells without propidium iodide (Figure 2A,B). Compared to the OE-33 spheroids, Caco-2 spheroids showed a smaller core with calcein positive cells without propidium iodide. Confocal images 24 h after the GNOME-LP application showed further destruction of Caco-2 spheroids with less calcein-positive cells. OE-33 spheroids showed less propidium iodide positive cells in the peripheral regions (Figure S3). Further cultivation of Caco-2 spheroids and OE-33 spheroids until 72 h after GNOME-LP showed that in Caco-2 spheroids, the cells were not able to regrow and contained almost only propidium iodide positive cells and very low calcein-stained cells, indicating reduced cell survival (Figure S3).

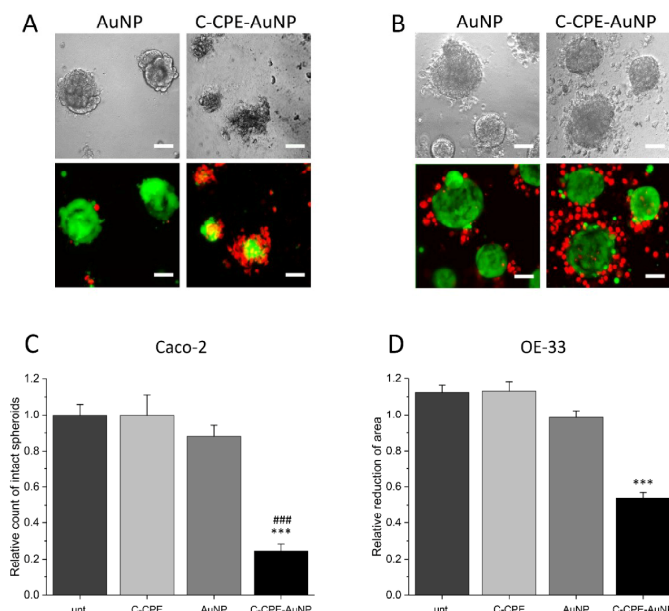


Figure 2. Caco-2 and OE-33 spheroids after three-time application of GNOME-LP. (A,B) Confocal images of Caco-2 (A) and OE-33 (B) spheroids treated with GNOME-LP in the presence of AuNPs or C-CPE-AuNPs. C-CPE-AuNPs destroyed Caco-2 spheroid structure and reduced cell survival as shown by the large amount of propidium iodide (red)-positive cells and the reduced amount of calcein-positive cells. For OE-33 spheroids, treatment with GNOME-LP in the presence of C-CPE-AuNPs induced cell death (propidium iodide-positive cells) in the peripheral regions. The cells in the core were still calcein-positive and propidium iodide-negative, indicating that they were still alive. Scale bar, 50 μm . (C) Quantification of intact Caco-2 spheroids indicating reduced intact spheroids after GNOME-LP with C-CPE-AuNPs. Graphs represent the mean \pm SEM of intact spheroids count relative to spheroids before GNOME-LP application. The results were analyzed with Student's *t* test. * Significant difference to untreated spheroids; *** $p < 0.001$ and ### $p < 0.001$ significant difference to the AuNPs treated spheroids. (D) Quantitative evaluation of OE-33 spheroid area showing that GNOME-LP applied in the presence of C-CPE-AuNPs reduced the spheroid area compared to the spheroid treated in absence of C-CPE-AuNPs. Graphs represent the mean \pm SEM of the spheroid area reduction relative to spheroid area before laser irradiation. The results were analyzed with Student's *t* test. * Significant difference to the spheroid area before laser irradiation; *** $p < 0.001$.

Caspase-3/-7 Independent Cell Death

The cell death can be achieved by apoptotic or necrotic reactions. Apoptosis is a cellular controlled reaction characterized by physiological changes like disruption of the mitochondria or inversion of the membrane exposing the phosphatidylserine lipids in the external leaflet of the cell membranes. These physiological changes are orchestrated by activation of specific proteases called caspases. To analyze whether the GNOME-LP-induced cell death was related to apoptotic reaction, we stained the mitochondria using MitoTracker™ Orange and the phosphatidylserine lipids with Atto-labeled annexin V 3 h and 24 h after GNOME-LP treatment at 10 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm², and 60 J/cm². MitoTracker labels mitochondria, with a mitochondrial membrane potential (MMP) below -60 mV [27]. An increased apoptosis correlates with disruption of the MMP, which results in a reduction of MitoTracker staining. Annexin V binds to the phosphatidylserine lipids, which are exposed

during apoptotic cell death. The results showed a reduced mitochondrial staining in cells treated with GNOME-LP in the presence of C-CPE-functionalized AuNPs in comparison to non-functionalized AuNPs (Figure 3A). It is remarkable that the different laser fluence seemed to equally affect the mitochondria and the reduced mitochondria labeling lasted until 24 h after GNOME-LP. For the phosphatidylserine lipids, GNOME-LP of cells in the presence of functionalized AuNPs showed an increased annexin V staining (Figure 3B) compared to GNOME-LP of cells with non-functionalized AuNPs (Figure 2B). The quantification of the annexin V staining revealed that the fluorescence intensity of annexin V staining is increased at an applied laser fluence of 60 mJ/cm² compared to the other applied laser fluences of 10 J/cm², 20 J/cm², and 30 J/cm² (Figure 3C), suggesting a fluence-dependent increase in the possibility of annexin V to reach the phosphatidylserine lipids.

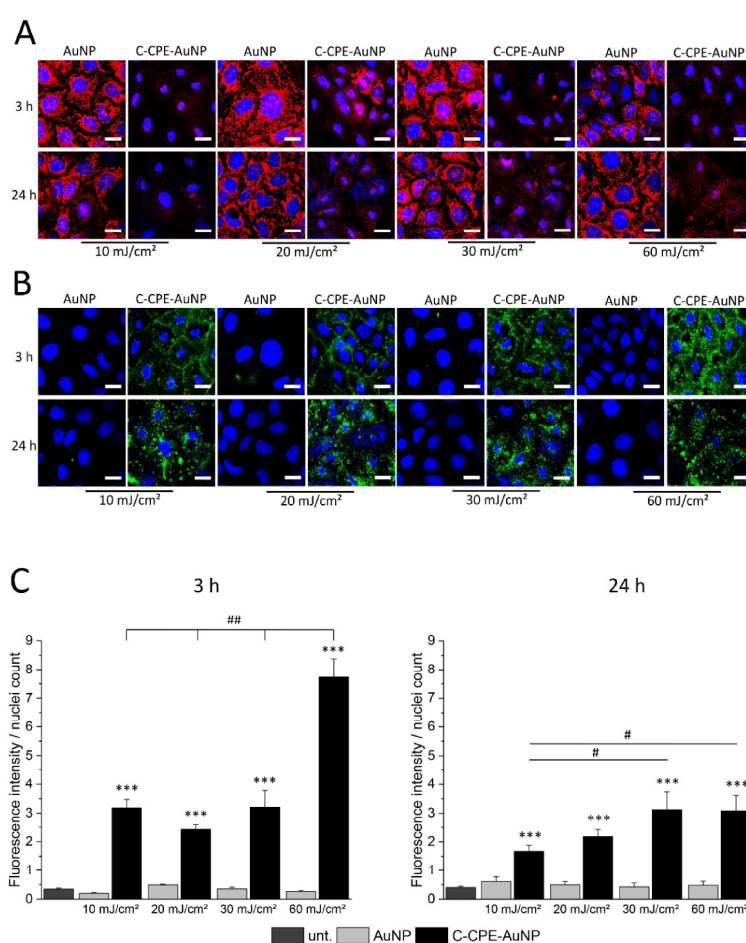


Figure 3. GNOME-LP in presence of C-CPE-AuNPs affected the annexin V and MitoTracker staining of the cells. (A) Independent of the applied laser fluence, 3 h and 24 h after GNOME-LP treatment in the presence of C-CPE-AuNPs reduced MitoTrackerTM Orange mitochondria labeling (red) and (B) induced

annexin V Atto488 staining of cells (green). Remark the shrinkage of the nuclei (blue) in cells treated with GNOME-LP in presence of C-CPE-AuNPs. Nuclei were stained with Hoechst. Scale bar, 20 μm . (C) Quantification of the experiments showing the increased annexin V Atto488 staining of GNOME-LP-treated cells in the presence of C-CPE-AuNPs 3 h and 24 h after GNOME-LP treatment. The graphs represent the mean \pm SEM of annexin V Atto488 fluorescence intensity relative to number of the nuclei. The results were analyzed with Student's *t* test. * Significant difference to the untreated control group: *** $p < 0.001$. # Significant difference to other laser fluencies: ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$.

Apoptotic reactions are induced by activation of caspases that digest different structure proteins and induce DNA degradation in specific DNA lengths that can be separated in gel electrophoresis, where they form characteristic ladder pattern [28]. Within the cascade family, caspase 3 and 7 are known as executioner caspases. These caspases induce DNA digestion and when they are activated, the cell cannot be rescued anymore. We analyzed whether these caspases were activated by GNOME-LP application and whether the inhibition of these caspases could protect the cells from GNOME-LP treatment in presence of C-CPE functionalized AuNPs. As shown in Figure 4A and Figure S3–S5, application of GNOME-LP in the presence of C-CPE-AuNPs did not increase the caspase activity. We found a tendency towards reduction. Moreover, the presence of 20 μM carbobenzyloxy-valyl-alanyl-aspartyl-(O-methyl)-fluoromethylketone (Z-VAD-FMK), a broad spectrum caspase inhibitor, reduced the activity of caspase 3 and 7 but did not antagonize the reduction of cell survival observed in cells treated with GNOME-LP in the presence of C-CPE-AuNPs (Figure 4B, Figures S4 and S5). Additionally, the analysis of the DNA of cells at any time after application of GNOME-LP in combination with C-CPE-AuNPs as shown for 3 h and 24 h revealed no DNA ladder pattern, which is commonly associated with the activation of Caspase 3/7. The DNA smear (Figure 4C) combined with the observation that the caspase inhibitor Z-VAD-FMK could not stop the action of GNOME-LP and C-CPE-AuNPs on the cells (Figure 4B) suggest that the cell death is not induced by apoptotic reaction. It is more likely that the cell death was related to induction of necrosis.

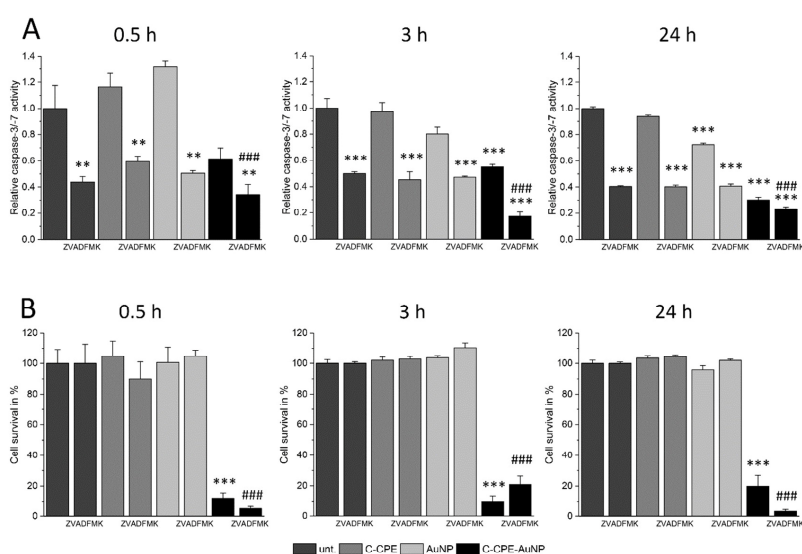


Figure 4. Cont.

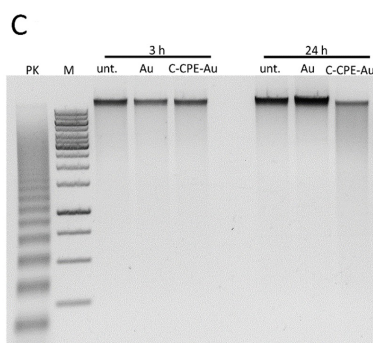


Figure 4. The caspase inhibition did not antagonize the cell death induced by GNOME-LP applied in presence of C-CPE-AuNPs. (A) Application of GNOME-LP (5 mm/s; 30 mJ/cm²) in the presence or absence of C-CPE-AuNPs did not increase the activity of caspase-3/-7. The presence of the caspase inhibitor Z-VAD-FMK (20 μ M) was able to reduce the activity of caspase-3/-7. The graphs represent the mean \pm SEM of caspase-3/-7 activity relative to untreated cells without Z-VAD-FMK as control reference. The results were analyzed with Student's *t* test. * Significant difference to the control reference: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. # Significant difference to the control reference with Z-VAD-FMK: ### $p < 0.001$. (B) Applied in presence of C-CPE-AuNPs, GNOME-LP reduced the cell survival 0.5 h, 3 h, or 24 h after GNOME-LP application. The presence of Z-VAD-FMK (20 μ M) was not able to protect the cells. The graphs represent the mean \pm SEM of cell survival relative to untreated cells. The data were compared by Student's *t* test. * Significant difference to the control reference: *** $p < 0.001$. # Significant difference to untreated cells with Z-VAD-FMK: ### $p < 0.001$. (C) Analysis of the DNA by gel electrophoresis showing that application of GNOME-LP in the presence of C-CPE-AuNPs did not induce DNA laddering; 100 ng DNA of each probe was applied to 1% agarose gel. Positive control (PK) DNA of U937 cells treated with 4 μ g/mL camptothecin for 3 h (provided by the DNA ladder kit), 1 kbp marker (M), and DNA isolated from Caco-2 cells after 3 h and 24 h of laser irradiation.

In summary, the results confirm our previous finding showing that C-CPE can efficiently be used to functionalize AuNPs following optically induced elimination of tumor cells expressing claudins. Moreover, we showed that increasing the C-CPE concentration to 20 μ g/mL for the functionalization of AuNPs producing C-CPE-AuNPs increased the killing effect while reducing the applied laser fluence. Note that all improvements of GNOME-LP-induced cell killing could not allow us to increase the applied velocity. For 3D cultivated tumor cells, C-CPE-AuNPs induced cell death to a different extent depending on the cell type. At the biological level, the killing effect correlated with reduced mitochondria activity and increased annexin V staining. However, the cell death caused by GNOME-LP applied in the presence of C-CPE-AuNPs induced no increased caspase activity, and inhibition of caspases with Z-VAD-FMK did not antagonize the killing effect.

3. Discussion

In a previous report, we showed that a combination of GNOME-LP- and C-CPE-functionalized AuNPs could specifically be used to kill claudin-expressing tumor cells [4]. In order to prepare future applicability of the technique in therapeutic intervention, it is necessary to understand the physical and cellular mechanisms that lead to cell disruption. For that, we analyzed how a maximal cell ablation in the shortest time could be achieved with the technique. Different parameters such as the functionalization of AuNPs in combination with purely physical parameters, like the laser fluence and the velocity of GNOME-LP application, were tested. With respect to the functionalization of the AuNPs, it can be assumed that the efficiency is related to the sum of particles attached to the cells, which is

controlled by the available claudin proteins in the cells, and the C-CPE-AuNPs complex. Binding studies with different C-CPE concentrations applied to the cells indicated an elevated C-CPE binding with increasing concentration up to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure S1). With a molecular weight of 15–20 kDa for C-CPE, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ would correlate with a molar concentration of about 10^{-6} M. This is in agreement with the observation that the cells used in this report surely expressed claudin-3, -4, and -7 [4], which were shown to have a very low K_d of 1.2×10^{-8} M, 9.1×10^{-9} M, and 1.1×10^{-8} M, respectively [29,30]. The complex formation is determined by the interaction of the N-terminal Strep-tag II of C-CPE and the Strep-Tactin conjugated to AuNPs (C-CPE-AuNP complex). We produced the used AuNP-C-CPE complexes by adding Strep-tagged C-CPE to a solution of citrate-stabilized AuNP-Strep-Tactin complex (see materials and methods). The fabrication of AuNP-Strep-Tactin complexes was performed by Aurion (Aurion, Wageningen, Netherlands) by conjugating Strep-Tactin (IBA, Göttingen, Germany) to AuNPs (Aurion) according to the method described by Fens [31]. The method allows the production of non-flocculated AuNPs covered by a single layer of Strep-Tactin molecules [32]. Due to the high affinity between the Strep-tag (on C-CPE) and the Strep-Tactin (on the AuNP), C-CPE binds very well on the AuNP-Strep-Tactin complex [33], resulting in stable AuNP-C-CPE complex. If we assume a size of about 50 kDa for Strep-Tactin, we can estimate that each nanoparticle was able to react with 5000 Strep-Tactin molecules. We can, therefore, assume that with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ C-CPE, we generated a quantity of C-CPE-AuNPs complex, allowing us to target all cells used in the present reports, which expressed claudin-3, -4, and -7 with the highest affinity for CPE. For cells that might express low-affinity claudins, such as claudin-8 with $K_d \approx 10^{-6}$ M or claudin-14 with $K_d \approx 2.8 \times 10^{-6}$ M [29,30] as well as for future clinical investigations in which tumors containing different cells should be expected, further adjustment of dosage could be necessary.

With respect to the physical parameters, we found that with laser fluence between 5 mJ/cm^2 and 60 mJ/cm^2 , the killing efficiency increased, achieving a steady maximum at 20–30 mJ/cm^2 (Figure 1C). The optimized C-CPE functionalization of AuNPs did not change the relationship between the laser fluence and the killing efficiency (Figure 1C; [4]). However, the AuNP functionalization increased the absolute killing efficiency observed for the different fluencies. Moreover, it was striking that independently of the applied laser fluence and for the functionalization process, the killing was maximal at a scanning velocity of 5 mm/s [4]. An application velocity of 5 mm/s and a laser fluence of 30 mJ/cm^2 reduced the survival to 8%. The increase of velocity to 10 mm/s or 40 mm/s allowed a survival of 30% and 45%, respectively (Figure 1D). The importance of the scanning velocity may be related to the overlap degree (OD) of the laser pulses as given by $\text{OD} = (1 - V_s/(f \times d)) \times 100$, with V_s representing the scanning velocity in mm/s , f the pulse repetition rate in kHz , and d the diameter of the laser pulse in μm [34]. In our experiments, the scanning velocity of 5 mm/s , 10 mm/s , or 40 mm/s corresponded to OD of, respectively, 99.7%, 99.4%, and 97.5%. However, the killing efficiency was not linearly related to OD. Changes of OD from 99.7% to 97.5% correlated with an exponential reduction of killing efficiency from over 90% to the asymptotic value of less than 70% (Figure 1D). The reduction of the OD as a consequence of the increased scanning velocity may reduce the number of laser pulses per particle. Dependent on the density of particles on the cell surface, less particles might interact with the laser with higher velocities. Consequently, the accumulated extent of membrane damage might decrease with higher velocities, while the damage related to a single particle remained the same. This could also partly explain why we could increase the efficiency of killing with a scanning velocity of 40 mm/s by repetition of the scanning (Figure S2B).

The non-linear relationship between the killing efficiency and the OD (Figure 1D) was also observed between the killing efficiency and the laser fluence (Figure 1C). The killing efficiency increased exponentially with increasing fluence to achieve an asymptotic value at a fluence of 20–30 mJ/cm^2 (Figure 1C).

Taken together, the results show that to achieve a good cell ablation in a reasonable time, increasing the laser power will not be enough. The pulse repetition rate and the pulse diameter should be adjusted to achieve both a laser fluence of 20–30 mJ/cm^2 and an OD of more than 99.7%.

At the biological level, cell death is related to different mechanisms like apoptosis or necrosis. Apoptosis is a cellular reaction related to activation of caspase cascades that cleave different cellular proteins culminating in disruption of the plasma membrane, mitochondria, and chromatin integrity [35]. These processes, which constitute the hallmark of apoptosis, can be demonstrated by staining the phosphatidylserine lipids of the membrane with annexin V and mitochondria with MitoTracker as well as DNA ladder analysis. Furthermore, the apoptosis can be inhibited by pharmacological inhibition of apoptosis [36].

In our experiments, we observed that application of GNOME-LP in combination with C-CPE-functionalized AuNPs induced an increase of annexin V staining (Figure 2B), while reducing the staining of the mitochondria (Figure 2A) suggesting that annexin was able to reach the phosphatidylserine lipids and that mitochondria were disrupted. The increased annexin V staining was reduced 24 h after optoperforation (60 mJ/cm²). It is possible that this reduction was related to the strongly reduced number of cells that were found at this time point (Figure 3C). In addition, nuclei staining showed nuclei shrinkage of GNOME-LP-treated cells in the presence of the C-CPE-AuNPs. The results can be interpreted as evidence for apoptosis. However, this assumption was not confirmed by the analysis of caspase 3/7 activity, which was not increased upon GNOME-LP application (Figures 4A and S5). Moreover, the caspase inhibitor could not prevent the GNOME-LP/C-CPE-AuNPs-induced cell death (Figure 4B). To explain these contradictory results, we postulate that induced permeabilization of the cell membrane allowed propidium iodide as well as annexin V uptake (Figure S4). The strong permeabilization of the cell membrane caused mitochondria disruption, including loss of their membrane potential, which led to the low mitochondria staining (Figure 3A). Additionally, DNA ladder analysis 24 h after laser exposure revealed a slight smear rather than a DNA ladder pattern in gel electrophoresis (Figure 4C). The results suggest that the combination of GNOME-LP/C-CPE-AuNPs might have killed the cells by induction of necrotic reactions.

In 3D system, the killing efficiency was reduced (Figure 2) compared to cells cultivated in 2D system. Even after three times application of GNOME-LP the killing efficiency for cells cultivated in 3D was reduced compared to 2D cultivation. It is possible that the penetration of the laser in the spheroids was an issue. Usage of near-infrared laser with adapted AuNPs would probably ameliorate the results. Moreover, we found that the type of cell forming the spheroids played a role (Figure 3), since we observed differences between spheroids that formed Caco-2 and OE-33-cells. The reason for the differences is not clear; it could be related to the difference in origin of the cells. Nevertheless, the data show that optoperforation in combination with C-CPE-functionalized AuNPs is applicable to 3D structures and, thus, could constitute an alternative tool for tumor treatment.

In contrast to apoptotic reactions, necrotic reactions strongly activate immunological reaction in tissues [37]. With respect to tumor treatment, this could be an advantage. Necrotic reaction in tumor could enable the attraction of immunological cells into the tumors, which will attack and destroy the tumor, thus increasing the treatment efficiency. Methods to recruit immunological cells are discussed in tumor therapy. Some reports show that manipulating the tumor environment could induce immune cells to attack the tumor [19,21–23]. Other reports show that tumor cells express neoantigens, but these antigens are not present on the surface of the tumor cells due to loss of HLA class I by tumor cells [24–26]. By inducing the necrosis, it may be possible to liberate these tumor antigens in the tumor interstitial spaces. The immune cells recruited by the necrosis could target the locally liberated tumor neoantigens and mount an immunological response to the tumor cells.

4. Materials and Methods

4.1. C-terminal Fragment of *Clostridium Perfringens* Enterotoxin (C-CPE)

The C-CPE_{194–319} protein with an N-terminal Strep-tag II was prepared as previously described [4] and stored at 4 °C in the presence of 0.02% sodium azide as preservative.

4.2. Cell Culture

Human tumor cell lines Caco-2 (DSMZ, Braunschweig, Germany) and OE-33, (provided by Dr. Bianca Nitzsche, Charité - Universitätsmedizin Berlin) were grown in tissue-treated petri dishes at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Caco-2 cells were cultured in DMEM Ham's F12 (FG 4815, Biochrom, Berlin, Germany) medium and OE-33 cell were cultured in RPMI (FG 1215, Biochrom) medium. Both culture media were supplemented with 10% fetal calf serum (Biochrom), 100 units/mL penicillin (Biochrom), and 100 µg/mL streptomycin (Biochrom).

For spheroid formation, Caco-2 cells and OE-33 cells were grown in growth factor reduced Matrigel (354230, Corning) as previously described [4]. In brief, 60 µL of Matrigel was added to the growth surface of µ-Plate 96 well (ibidi, Martinsried, Germany) and placed in cell culture incubator for 30 min to allow gel formation. The Matrigel was overlaid with cell culture medium and 5×10^4 cells were added. The cells were cultured for 3–4 days to allow spheroid formation.

4.3. Gold Nanoparticle-Mediated Laser Perforation (GNOME-LP)

GNOME-LP was performed as previously described [4] using laser HLX-G-F020-10103 (Horus Laser S.A.S, Limoges, France). The laser had the following characteristics: Pulse repetition rate 2.25 kHz, maximal power 100 mW, pulse diameter 80 µm [2]. To generate the C-CPE-AuNP complex, we used AuNP (Ø: 25 nm; Aurion) conjugated with Strep-Tactin (IBA). The conjugation of Strep-Tactin to the AuNPs was performed by Aurion according to the method described by [31]. The procedure was developed to allow a production of non-clustered AuNP-Strep-Tactin complexes with a single protein layer [32]. To produce the C-CPE-AuNP complexes used in the experiments, C-CPE and AuNPs were mixed and incubated overnight at 4 °C to allow the binding of Strep-tag II (on C-CPE) and the Strep-Tactin (on the AuNPs). Cell culture medium was added to achieve the reported C-CPE concentration (Figure 1A) and a constant AuNP-Strep-Tactin concentration of 2.4×10^{10} AuNP-Strep-Tactin/mL.

For GNOME-LP, Caco-2 cells pre-incubated with the C-CPE-AuNP complex were exposed to the pulsed laser with 30 mW (30 mJ/cm²) at 5 mm/s. After optical treatment, propidium iodide (10 µM) and Hoechst 33258 (1 µM) were added to the cells for 30 min. Imaging of propidium iodide (excited at 535) and Hoechst (excited at 346 nm) uptake was performed with a Nikon Ti-E inverted fluorescence microscope (Nikon, Düsseldorf, Germany) using 4× objective and Nikon Software Nis-Elements 4.4 (Nikon, Düsseldorf, Germany). Dead cells were indicated by propidium iodide and Hoechst uptake, while healthy cells were only Hoechst positive. Propidium iodide and Hoechst positive cells were counted using ImageJ/Fiji. The cell survival is indicated by the differences between the number of cells stained by Hoechst and the number of the cells that were stained by both Hoechst and propidium iodide.

GNOME-LP of Caco-2 spheroids and OE-33 spheroids were pre-incubated with the C-CPE-AuNPs. Transmission images of the spheroids were taken in the same plane and at the same position before and after GNOME-LP (60 mJ/cm²; 5 mm/s) using 10× objective of the Ti-E inverted fluorescence microscope (Nikon). The spheroids were evaluated by comparing the intact spheroids or the spheroid area before and after GNOME-LP treatment using ImageJ/Fiji.

4.4. Activity of Caspase-3/-7

The activity of caspase-3/-7 in Caco-2 cells was measured by using the Caspase-Glo[®] 3/7 Assay (Promega, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's protocol. In brief, 100 µL Caspase-Glo[®] 3/7 reagent was added to each well containing GNOME-LP-treated cells in 100 µL cell culture medium. Contents were mixed using plate shaker at 160 rpm for 30 s and incubated at room temperature for 1 h. Luminescence of each sample was measured in Mithras LB 940 plate reader (Berthold, Bad Wildbad, Germany). For caspase inhibition cells were treated with 20 µM Z-VAD-FMK (Promega, Mannheim, Germany), a caspase family inhibitor, 30 min prior GNOME-LP.

4.5. DNA Ladder

For detection of DNA ladder, the Apoptotic DNA Ladder Kit (11835246001, Sigma-Aldrich, Taufkirch, Germany) was used according to the manufacturer's protocol. The purified DNA (100 ng) was separated in 1% agarose gel stained with GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA).

4.6. Detection of Cell Death

Phosphatidylserine lipids of GNOME-LP-treated Caco-2 cells were stained with annexin V Atto488 conjugate (ALX-209-258-T100, Enzo Life Science) diluted in cell culture medium (1:40) for 15 min at room temperature. Mitochondria of GNOME-LP-treated Caco-2 cells were stained with 50 ng MitoTracker™ Orange (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in cell culture medium for 30 min in cell incubator. Cell nuclei were stained with Hoechst (1 µM). For evaluating cell death in 3D matrix, spheroids were stained with propidium iodide (10 µM) and calcein AM (1:1000) diluted in serum-free cell culture medium for 30 min in cell culture incubator.

Fluorescence images were captured on Nikon Eclipse TE2000-E confocal laser scanning microscope (488 nm for annexin V Atto488 or calcein AM, 535 nm for MitoTracker™ Orange, 461 nm for Hoechst, Nikon, Düsseldorf, Germany) using 60× water immersion objective and EZ-C1 3.80 software program (Nikon, Düsseldorf, Germany). The grade of phosphatidylserine lipids exposure was estimated by normalization of the annexin V Atto488 fluorescence intensity to the nuclei count. Fluorescence images were processed with the ImageJ/Fiji software.

4.7. Statistical Analysis

Data are presented as mean ± SEM. Statistical comparison between groups was performed using the Student's paired two-sided *t* test. *p* < 0.05 was considered to be significant.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/20/17/4248/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, A.B. and A.N.; methodology, A.B. and A.N.; investigation, A.B. and T.L.; resources, A.N.; data curation, A.B. and A.N.; writing—original draft preparation, A.B., S.K., A.H., and A.N.; writing—review and editing, A.B. and A.N.; visualization, A.B.; supervision, A.N.; funding acquisition, A.N.

Funding: The research was partly supported by the DFG project NG 4/10-1 and the BMBF project TRANS-LARA. The publication of this article was funded by the Open Access Fund of the Leibniz Universität Hannover.

Acknowledgments: The authors thank Heidemarie Bliedung for the C-CPE production and technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

AuNP	Gold nanoparticle
Caco-2	Human colon adenocarcinoma cell line
C-CPE	C-terminus of <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin
GNOME-LP	Gold nanoparticle-mediated laser perforation
OE-33	Human esophageal adenocarcinoma cell line
PI	Propidium iodide
SEM	Standard error of the mean
Z-VAD-FMK	carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone, inhibitor of the caspase family

References

1. Krawinkel, J.; Torres-Mapa, M.L.; Werelius, K.; Heisterkamp, A.; Rüttermann, S.; Romanos, G.E.; Gerhardt-Szép, S. Gold Nanoparticle-Mediated Delivery of Molecules into Primary Human Gingival Fibroblasts Using ns-Laser Pulses: A Pilot Study. *Materials (Basel)* **2016**, *9*, 397. [CrossRef] [PubMed]

2. Heinemann, D.; Schomaker, M.; Kalies, S.; Schieck, M.; Carlson, R.; Murua Escobar, H.; Ripken, T.; Meyer, H.; Heisterkamp, A. Gold nanoparticle mediated laser transfection for efficient siRNA mediated gene knock down. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Begandt, D.; Bader, A.; Antonopoulos, G.C.; Schomaker, M.; Kalies, S.; Meyer, H.; Ripken, T.; Ngezahayo, A. Gold nanoparticle-mediated (GNOME) laser perforation: A new method for a high-throughput analysis of gap junction intercellular coupling. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2015**, *47*, 441–449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Becker, A.; Leskau, M.; Schlingmann-Molina, B.L.; Hohmeier, S.C.; Alnajjar, S.; Murua Escobar, H.; Ngezahayo, A. Functionalization of gold-nanoparticles by the Clostridium perfringens enterotoxin C-terminus for tumor cell ablation using the gold nanoparticle-mediated laser perforation technique. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Black, J.D.; Lopez, S.; Cocco, E.; Schwab, C.L.; English, D.P.; Santin, A.D. Clostridium perfringens enterotoxin (CPE) and CPE-binding domain (c-CPE) for the detection and treatment of gynecologic cancers. *Toxins (Basel)* **2015**, *7*, 1116–1125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Mirzayans, R.; Andraiss, B.; Kumar, P.; Murray, D. The Growing Complexity of Cancer Cell Response to DNA-Damaging Agents: Caspase 3 Mediates Cell Death or Survival? *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 708. [[CrossRef](#)]
7. Ioannou, Y.A.; Chen, F.W. Quantitation of DNA fragmentation in apoptosis. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 992–993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Majtnerová, P.; Roušar, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Mol. Biol. Rep.* **2018**, *45*, 1469–1478. [[CrossRef](#)]
9. Vermeulen, K.; van Bockstaele, D.R.; Berneman, Z.N. Apoptosis: Mechanisms and relevance in cancer. *Ann. Hematol.* **2005**, *84*, 627–639. [[CrossRef](#)]
10. Zimmermann, K.C.; Bonzon, C.; Green, D.R. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* **2001**, *92*, 57–70. [[CrossRef](#)]
11. Maléth, J.; Hegyi, P.; Rakonczay, Z.; Venglovecz, V. Breakdown of bioenergetics evoked by mitochondrial damage in acute pancreatitis: Mechanisms and consequences. *Pancreatology* **2015**, *15*, S18–S22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Poot, M.; Gibson, L.L.; Singer, V.L. Detection of apoptosis in live cells by MitoTracker? Red CMXRos and SYTO dye flow cytometry. *Cytometry* **1997**, *27*, 358–364. [[CrossRef](#)]
13. Krysko, D.V.; Roels, F.; Leybaert, L.; D'Herde, K. Mitochondrial transmembrane potential changes support the concept of mitochondrial heterogeneity during apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.* **2001**, *49*, 1277–1284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hankins, H.M.; Baldrige, R.D.; Xu, P.; Graham, T.R. Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution. *Traffic* **2015**, *16*, 35–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Martin, S.J.; Reutelingsperger, C.P.; McGahon, A.J.; Rader, J.A.; van Schie, R.C.; LaFace, D.M.; Green, D.R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **1995**, *182*, 1545–1556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Demchenko, A.P. Beyond annexin V: Fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology* **2013**, *65*, 157–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Campisi, L.; Cummings, R.J.; Blander, J.M. Death-defining immune responses after apoptosis. *Am. J. Transplant.* **2014**, *14*, 1488–1498. [[CrossRef](#)]
18. Sachet, M.; Liang, Y.Y.; Oehler, R. The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis* **2017**, *22*, 1189–1204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ji, T.; Zhao, Y.; Ding, Y.; Nie, G. Using functional nanomaterials to target and regulate the tumor microenvironment: Diagnostic and therapeutic applications. *Adv. Mater. Weinheim.* **2013**, *25*, 3508–3525. [[CrossRef](#)]
20. Demaria, S.; Pikarsky, E.; Karin, M.; Coussens, L.M.; Chen, Y.-C.; El-Omar, E.M.; Trinchieri, G.; Dubinett, S.M.; Mao, J.T.; Szabo, E.; et al. Cancer and inflammation: Promise for biologic therapy. *J. Immunother.* **2010**, *33*, 335–351. [[CrossRef](#)]
21. Shi, Y.; Lammers, T. Combining Nanomedicine and Immunotherapy. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 1543–1554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Surendran, S.P.; Moon, M.J.; Park, R.; Jeong, Y.Y. Bioactive Nanoparticles for Cancer Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Li, Y.; Liu, J.; Gao, L.; Liu, Y.; Meng, F.; Li, X.; Qin, F.X.-F. Targeting the tumor microenvironment to overcome immune checkpoint blockade therapy resistance. *Immunol. Lett.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Capietto, A.-H.; Jhunjhunwala, S.; Delamarre, L. Characterizing neoantigens for personalized cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **2017**, *46*, 58–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ren, L.; Leisegang, M.; Deng, B.; Matsuda, T.; Kiyotani, K.; Kato, T.; Harada, M.; Park, J.-H.; Saloura, V.; Seiwert, T.; et al. Identification of neoantigen-specific T cells and their targets: Implications for immunotherapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncimmunology* **2019**, *8*, e1568813. [[CrossRef](#)]
26. Schrörs, B.; Lübcke, S.; Lennerz, V.; Fatho, M.; Bicker, A.; Wölfel, C.; Derigs, P.; Hankeln, T.; Schadendorf, D.; Paschen, A.; et al. HLA class I loss in metachronous metastases prevents continuous T cell recognition of mutated neoantigens in a human melanoma model. *Oncotarget* **2017**, *8*, 28312–28327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Pendergrass, W.; Wolf, N.; Poot, M. Efficacy of MitoTracker GreenTM and CMXrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytom. Part A* **2004**, *61*, 162–169. [[CrossRef](#)]
28. Rahbar Saadat, Y.; Saeidi, N.; Zununi Vahed, S.; Barzegari, A.; Barar, J. An update to DNA ladder assay for apoptosis detection. *Bioimpacts* **2015**, *5*, 25–28. [[CrossRef](#)]
29. Fujita, K.; Katahira, J.; Horiguchi, Y.; Sonoda, N.; Furuse, M.; Tsukita, S. Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Lett.* **2000**, *476*, 258–261. [[CrossRef](#)]
30. Sonoda, N.; Furuse, M.; Sasaki, H.; Yonemura, S.; Katahira, J.; Horiguchi, Y.; Tsukita, S. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 195–204. [[CrossRef](#)]
31. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspension. *Nat. Phys. Sci.* **1973**, *241*, 20–22. [[CrossRef](#)]
32. Van de Plas, P.; Willems, S.; Leunissen, J. Gold nanoparticle conjugation adsorption or covalent binding? *Aurion Newsl.* **2018**, *6*, 1.
33. Schmidt, T.G.M.; Skerra, A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1528–1535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bartolo, P.; Vasco, J.; Silva, B.; Galo, C. Laser micromachining for mould manufacturing: I. The influence of operating parameters. *Assembly Autom.* **2006**, *26*, 227–234. [[CrossRef](#)]
35. Tait, S.W.G.; Green, D.R. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 621–632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Slee, E.A.; Zhu, H.; Chow, S.C.; MacFarlane, M.; Nicholson, D.W.; Cohen, G.M. Benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochem. J.* **1996**, *315*, 21–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Nikolettou, V.; Markaki, M.; Palikaras, K.; Tavernarakis, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1833*, 3448–3459. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3 Diskussion und Ausblick

Der Einsatz von Chemotherapeutika oder Zytostatika in der konventionellen Krebstherapie ist häufig mit schweren Nebenwirkungen verbunden. Daher wird nach neuen oder alternativen Therapieansätzen gesucht. Die pathologische Überexpression von Claudin-3 und -4 in bestimmten malignen Neoplasmen macht sie zu potenziellen Krebsmarkern. An diese Marker kann das C-terminale Fragment von *Clostridium perfringens* Enterotoxin (C-CPE) binden. Im ersten Projektabschnitt dieser Arbeit wurde daher untersucht, inwiefern das aus 194 bis 319 Aminosäuren bestehende rekombinante C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ spezifisch Krebszellen, die ein Claudin-3, -4 und -7 Expressionsmuster aufweisen, detektieren kann. Im nächsten Schritt wurde die Anwendbarkeit und Effizienz der Goldnanopartikel-vermittelte Laserperforation (GNOME-LP) mit C-CPE funktionalisierten AuNP (C-CPE-AuNP) für die Tötung von Krebszellen analysiert. Der zweite Projektabschnitt diente der Aufklärung von physikalischen Parametern der GNOME-LP von mit C-CPE-AuNP behandelten Zellen und der biologischen Mechanismen, die den Zelltod induzieren.

3.1 Claudin-Expression in verschiedenen Krebszellen und C-CPE-Bindung

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Kombination aus C-CPE-AuNP und der GNOME-LP-Technik eine spezifische Optoperforation von Claudin-3, -4 und -7 exprimierenden Krebszellen ermöglicht. Hierfür wurde das C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ über seinen N-terminalen Strep-tag II an Strep-Tactin konjugierte 25 nm große Goldnanopartikel gekoppelt (Figure 1 in Manuskript 1). Das Strep-tag II ist ein acht Aminosäure langes Peptid, das spezifisch an die Strep-Tactin-Moleküle bindet (Schmidt & Skerra 2007). Dadurch kann sich ein stabiler C-CPE-AuNP-Komplex bilden. Die Laseraktivierung der AuNP induzierte eine dauerhafte Schädigung der Zellmembran und führte zum Zelltod.

Die Fehlregulierung von Claudinen kann mit der Entstehung von vielen verschiedenen Krebsarten korrelieren (Osanaï et al. 2017; Ouban & Ahmed 2010; Oliveira & Morgado-Díaz 2007). Abhängig von der Krebsart, aber auch innerhalb einer Krebsart, können bestimmte Claudine herab oder hoch reguliert sein (Singh et al. 2017). Besonders die Expression von Claudin-3 und -4 kann in Brust-, Darm- und Ösophaguskrebs hochreguliert sein (Lanigan et al. 2009; Escudero-Esparza et al. 2011). Die Expressionsanalysen von Claudin-3, -4 und -7 von humanen Krebszelllinien aus Dickdarm (Caco-2), Brust (MCF-7 und MDA-MB-321), Ösophagus (OE-33 und Kyse140) und Gebärmutterhals (Hela) auf mRNA- und Proteinebene zeigten, dass diese Krebszellen in Claudin-positive und Claudin-negative Gruppen klassifiziert werden konnten (Figure 2a und 2b in Manuskript 1). Dabei umfasste die

Gruppe der Claudin-positiven Krebszellen Caco-2, MCF-7 und OE-33 und die Gruppe der Claudin-negativen Krebszellen MDA-MB-321, Kyse140 und Hela (Figure 2a und 2b in Manuskript 1). Bei Krebszellen aus dem Brustgewebe von Hunden konnten in den TiHoDMglCarc1305 eine Claudin-3 und -4 Proteinexpression festgestellt werden, während die Krebszellen TiHoDMglCarc1406.1 und die TiHoDMglRef53A Zellen aus gesundem Brustgewebe weder Claudin-3 und -4 noch Claudin-7 aufwiesen (Figure 2c in Manuskript 1). Diese Ergebnisse bestätigen vorherige quantitative Genexpressionsanalysen der Hundezellen, deren Ergebnisse ausschließlich eine Claudin-3 und -4 Expression in den TiHoDMglCarc1305 Krebszellen zeigten (Hammer & Nagel et al. 2016; Hammer & Becker et al. 2016). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Claudin-positiven humanen Caco-2, MCF-7 und OE-33 Krebszellen sowie die Hundekrebszellen TiHoDMglCarc1305 als geeignete Kandidaten verwendet werden konnten, um zu untersuchen, inwiefern diese Krebszellen gezielt mit der Kombination aus den C-CPE-AuNP und der GNOME-LP Technik getötet werden können.

Die natürlichen Rezeptoren vom CPE sind unter anderem Claudin-3, -4 und -7 (Saitoh et al. 2015). Die erhöhte Expression von Claudin-3, -4 und -7 in verschiedenen Krebsarten ermöglicht es, CPE als alternativen Therapieansatz zur Krebsbehandlung zu verwenden (Shrestha et al. 2016). Bisherige Studien konnten zeigen, dass die Bindung vom zytotoxischen CPE zum Zelltod von Krebszellen führt (Michl et al. 2001; Kominsky et al. 2004; Santin et al. 2005). Die Anwendung von CPE in *in vivo* Studien zeigte, dass dessen systemische Applikation in Mäusen, neben der Tötung von Krebszellen in Xenotransplantaten, auch zu schädlichen Nebenwirkungen führt (Kominsky et al. 2004). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die nicht-zytotoxische C-terminale Domäne (Aminosäuren von Asparaginsäure 194 bis Phenylalanin 319) von CPE verwendet, um die AuNP zu funktionalisieren. Das daraus resultierende C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ Polypeptid ist weiterhin in der Lage an seine Rezeptoren zu binden (Uchida et al. 2010). Es ist allgemein bekannt, dass die Bindung von C-CPE an seine Rezeptoren die Barrierefunktion von Zellverbänden beeinträchtigen kann (Takahashi et al. 2005). Daher wurde die Funktionalität vom rekombinant hergestellten C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ mit der sogenannten transepithelialen elektrischen Widerstandsmessung (TEER) überprüft. Der TEER liefert Informationen über die Barrierefunktion von Zellverbänden (Srinivasan et al. 2015). Das Expressionsmuster von spezifischen Claudinen bestimmt, ob Zellverbände eine für Ionen permeable oder kaum-permeable parazelluläre Barriere ausbilden (Krause et al. 2008). So wiesen postkonfluente Caco-2 Zellen einen TEER von bis zu 1.000 Ω cm² auf, der auf eine für Ionen kaum permeable parazelluläre Barriere schließen lässt. Abhängig von der eingesetzten C-CPE-Konzentration reduzierte die Zugabe von C-CPE kontinuierlich den TEER von postkonfluenten Caco-2 sowie von MCF-7, OE33 und TiHoDMglCarc1305 Zellen (Figure 3, Table 1 in Manuskript 1). Der MTT-Test zur Bestimmung der Zellviabilität zeigte, dass C-CPE unabhängig von der eingesetzten Konzentration nicht die Viabilität der

Zellen beeinflusste (Figure 3b in Manuskript 1). Daraus lässt sich schließen, dass das C-CPE die Barrierefunktion modulieren kann und keine zytotoxischen Effekte hervorruft. Daher könnte die Verwendung von C-CPE zur AuNP-Funktionalisierung weniger Nebenwirkungen verursachen als das komplette CPE-Protein. Zusätzlich konnte über die Kopplung von C-CPE über seinen N-terminalen Strep-tag II an das Strep-Tactin Chromeo 488 Konjugat die spezifische Bindung an Claudin-exprimierende Caco-2, MCF-7, OE-33 und TiHoDMglCarc1305 Zellen gezeigt werden (Figure 3b und 3c in Manuskript 1). Die Ergebnisse der TEER-Messung und die Visualisierung der C-CPE-Bindung lassen vermuten, dass der Strep-tag sowie die Kopplung an andere Komponenten die Funktionalität und Bindungskapazität vom C-CPE nicht verändern. Für die Funktionalisierung der AuNP wurden 5 µg/ml C-CPE eingesetzt. Diese Konzentration liegt in dem Bereich (4-10 µg/ml), der in *in vitro* und *in vivo* Studien für Zellen verwendet wurde, die natürlicherweise die C-CPE-Rezeptoren exprimieren (Cocco et al. 2015; Kono et al. 2015).

3.2 Optoperforation von Krebszellen mit C-CPE funktionalisierten AuNP

Die GNOME-LP Technik ist eine rapide und zellfreundliche Hochdurchsatzmethode zur Optoperforation von Zellen. Mit dieser Technik können Zellen schonend transient permeabilisiert werden, um somit eine Aufnahme von kleinen Molekülen wie siRNAs oder Fluoreszenzfarbstoffen in die Zelle zu erlauben (Heinemann et al. 2013). Die schonende Zellpermeabilisierung wird durch die Interaktion von Laserpulsen und Goldnanopartikeln, die zufällig auf den Zellen adhäreren, erreicht. Dabei wird die Laserleistung für den jeweiligen Zelltyp so angepasst, dass die Zellmembran transient permeabilisiert wird (Heinemann et al. 2013; Schomaker & Killian et al. 2015; Kalies et al. 2014). Das Überleben der GNOME-LP behandelten Zellen ist abhängig von der Geschwindigkeit, mit der sich die entstandenen Poren in der Membran wieder schließen. Patch-Clamp Analysen weisen darauf hin, dass die Rekonstruktion der Zellmembran sich aus zwei Komponenten zusammensetzt: (i) Die durch die GNOME-LP induzierten Poren in der Membran schließen sich innerhalb von ca. 10 s nach der GNOME-LP Applikation. (ii) Innerhalb von ca. 20 min reorganisiert sich die Lipiddoppelschicht in dem Bereich der ehemaligen Pore, um wieder eine komplett intakte Membran auszubilden. Während des Reparaturprozesses können wahrscheinlich weiterhin kleine Moleküle, wie z.B. Calcium-Ionen, aus dem externen Milieu in die Zellen gelangen (Schomaker & Killian et al. 2015). Verzögert sich der Reparaturprozess und damit das Schließen der Poren, sinken die Überlebenschancen der Zellen rapide. Durch eine Erhöhung der Laserfluenz kann das Zellüberleben deutlich reduziert werden (Li & Gu 2010; Tong et al. 2007; Lukianova-Hleb et al. 2011). Die Laserfluenz in mJ/cm^2 kann durch Einstellen der Laserleistung (P) in mW, der Pulsrepetitionsrate (f) in kHz und der Spotfläche

des Laserpulses (A) in cm^2 justiert werden (Formel (1)). Bei der GNOME-LP Technik ist die Pulsrepetitionsrate vom Laser (532 nm) mit 20 kHz und die Spotfläche des Laserpulses mit $80 \mu\text{m}$ konstant. Daher wurde in dieser Arbeit die Laserfluenz mit der Laserleistung reguliert.

$$\text{Laserfluenz} = \frac{P}{f * A} \quad \text{Formel (1)}$$

Für die GNOME-LP vermittelte Zelltötung mit den C-CPE funktionalisierten AuNP wurde das nicht-membranpermeable Propidiumiodid als Indikator für den Zelltod verwendet (Figure 4a in Manuskript 1). Der Farbstoff wurde 30 min nach der Applikation der GNOME-LP zu den Zellen gegeben, sodass der eventuell stattfindende Reparaturprozess der Zellmembran bereits abgeschlossen gewesen sein sollte. Um zu überprüfen inwiefern ein GNOME-LP induzierter Zelltod herbeigeführt werden kann, wurden mit nicht funktionalisierten 200 nm großen AuNP behandelte Zellen mit einer maximalen Laserfluenz von $60 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ und einer Scangeschwindigkeit von $5 \text{ mm}/\text{s}$ bestrahlt. Dabei reduzierte die GNOME-LP von Zellen deren Überleben um ca. 65 %, unabhängig vom Expressionscharakter der Caco-2 Zellen (Claudin-positiv) und der Hela Zellen (Claudin-negativ) (Abbildung 3-1).

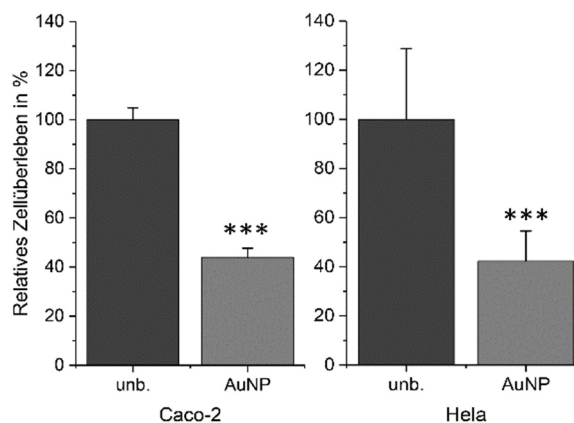


Abbildung 3-1: GNOME-LP mit 200 nm großen AuNP. Optoperforation von Caco-2 und Hela Zellen mit $60 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ bei $5 \text{ mm}/\text{s}$ prä-inkubiert mit 200 nm AuNP. Die GNOME-LP reduzierte das Überleben beider Krebszelllinien. Graphen repräsentieren den Mittelwert des Zellüberlebens relativ zu unbehandelten (unb.) Zellen \pm Standardfehler. Ergebnisse mit gepaarten zweiseitigen Student t-test analysiert. *Signifikanter Unterschied zu unbehandelten Zellen: *** $p < 0,001$.

Die Ergebnisse implizierten, dass eine Laserfluenz von $60 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ bei $5 \text{ mm}/\text{s}$ ein effizientes Töten von Zellen ermöglicht. Daher wurde die GNOME-LP mit diesen Einstellungen sowie mit den C-CPE funktionalisierten AuNP durchgeführt. Die Verwendung von C-CPE-AuNP verringerte das Zellüberleben der Claudin-positiven Caco-2, MCF-7 und OE-33 sowie TiHoDMglCarc1305 auf ca. 30 % (Fi-

gure 4 und 5a in Manuskript 1). Die Laserbehandlung der Claudin-negativen Zellen Hela, TiHo-Carc1406.1 und TiHoDMglRef53A beeinträchtigte währenddessen nicht deren Überleben (Figure 5a in Manuskript 1). Das Töten von Krebszellen war damit effizienter und wesentlich spezifischer verglichen zu der GNOME-LP mit nicht-funktionalisierten AuNP. Die erhöhte Effizienz der Zelltötung könnte teils damit erklärt werden, dass das Absorptionsmaximum der 25 nm (\emptyset) AuNP bei 530 nm liegt (Abbildung 3-2).

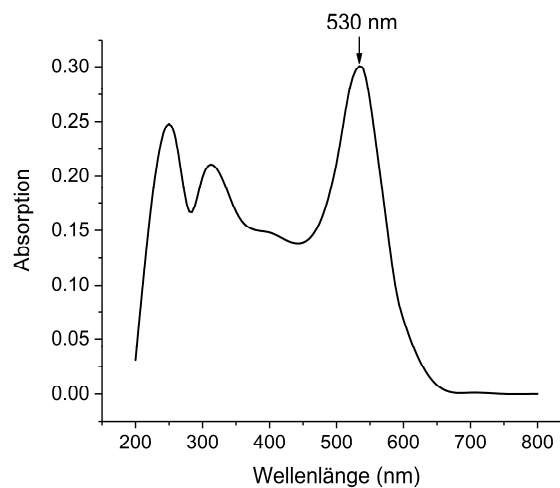


Abbildung 3-2: UV-Vis-Spektrum von Strep-Tactin konjugierten 25 nm großen AuNP. Die AuNP zeigen eine starke Absorption bei einer Wellenlänge von 530 nm. Die Konjugation mit Strep-Tactin könnte mit den zwei Absorptionsspitzen im Bereich von 250 bis 300 nm assoziiert sein. Die Messung des UV-Vis-Spektrums wurde mit dem Spektralphotometer NanoDrop 2000c durchgeführt.

Das Absorptionsmaximum entspricht nahezu der Wellenlänge vom Laser mit 532 nm. Entspricht die Wellenlänge des Lasers dem Absorptionsmaximum der AuNP können SPR-Effekte auftreten, die wiederum zu lokalisierten thermischen Effekten führen können (Singh et al. 2018). Diese Effekte könnten zu einer schwerwiegenderen Schädigung der Zellmembran geführt haben als bei der GNOME-LP mit den größeren AuNP. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die Größe der Goldnanopartikel, die das Absorptionsspektrum beeinflussen. Mit zunehmender Größe ($\emptyset \geq 100$ nm) verschiebt sich das Absorptionsmaximum in Richtung 600 nm (Jain et al. 2012). In Bezug auf die *in vivo* Anwendbarkeit für die Vernichtung von Tumorzellen sind AuNP mit einer Größe von unter 100 nm (\emptyset) eventuell geeigneter, da sie besser in das Tumorgewebe eindringen können (Dreaden et al. 2012). Die erhöhte Spezifität der GNOME-LP induzierten Zelltötung von ausschließlich Claudin-positiven Krebszellen wird wesentlich durch das C-CPE hervorgerufen, das für eine enge Bindung der AuNP an die Zellen sorgt. Indessen wurden die Claudin-positiven OE-33 Zellen weniger von der GNOME-LP mit den C-CPE-AuNP angegriffen. Schomaker & Killian et al. (2015) zeigten, dass die

Zellgröße und der Zelltyp die Effizienz der Membranpermeabilisierung durch die GNOME-LP beeinflussen. Daher könnte die kleinere Zellgröße der OE-33 verglichen zu den Caco-2 oder MCF-7 Zellen die Tötungseffizienz reduziert haben (Figure 5d und 5e in Manuskript 1). Auch die Claudin-negativen Krebszellen MDA-MB-231 und Kyse140 konnten mit der GNOME-LP in Kombination mit den C-CPE-AuNP getötet werden (Figure 5a in Manuskript 1). Verglichen mit den C-CPE-AuNP hatten die nicht-funktionalisierten AuNP einen ähnlichen, reduzierenden Effekt auf das Zellüberleben. Anhand von fluoreszierenden Nanobeads (\varnothing 40 nm) konnte im Vergleich zu den Caco-2 und Hela Zellen eine vermehrte Aufnahme der Nanobeads in die MDA-MB-231 Zellen beobachtet werden (Figure 5b in Manuskript 1). Daher wurde das Töten der Krebszellen MDA-MB-231 und Kyse140 vermutlich durch eine erhöhte Endozytose der AuNP sowie C-CPE-AuNP verursacht. Die Tötungseffizienz war jedoch deutlich geringer als bei den Claudin-positiven Zellen. Die C-CPE funktionalisierten AuNP töteten überwiegend mehr als 70 % der Claudin-positiven Zellen (Figure 5a in Manuskript 1). Das Töten von Tumorzellen konnte auch mit optischen Methoden unter Verwendung von AuNP (\varnothing 35-50 nm) funktionalisiert mit Antikörpern oder Proteinen gegen EGF- oder Transferrin-Rezeptoren gezeigt werden (El-Sayed et al. 2005; Choi et al. 2010; Yao et al. 2017).

Die Verwendung von C-CPE repräsentiert eine einfache Ergänzung oder Alternative zur AuNP-Funktionalisierung, um Tumore zu bekämpfen. Ob die C-CPE-AuNP auch in der Tumorbekämpfung eingesetzt werden könnten, wurde anhand eines 3D-Zellkultursystems untersucht. Die Adenokarzinomazellen OE-33 und MCF-7 sind hierfür geeignete Tumormodelle, da sie häufig als Xenotransplante verwendet werden (Kimura et al. 2010; Dreaden et al. 2012). Daher wurden diese Zellen für das 3D-Zellkultursystem in Matrigel kultiviert. In der Matrigelmatrix entwickelten sich die Zellen zu Sphäroidstrukturen, die somit modellhaft kleine Tumore darstellten. In den Sphäroiden konnte das C-CPE weiterhin an die Claudine der Zellen binden (Figure 6a in Manuskript 1). Die Applikation der GNOME-LP in Kombination mit den C-CPE-AuNP reduzierte die Sphäroidfläche bestehend aus den MCF-7 oder OE-33 Zellen um 20 % (Figure 6c in Manuskript 1). Die Aufnahmen der Sphäroide vor und nach der Laserbestrahlung zeigten deutlich zerstörte Sphäroidgrenzen mit vermutlich getöteten Zellen (Figure 6d in Manuskript 1). Verglichen zu den einschichtig gewachsenen Zellen, war der Tötungseffekt deutlich reduzierter. Vermutlich hervorgerufen durch die unspezifische Retention der AuNP in der Matrigelmatrix. Dies könnte auch unter *in vivo* Bedingungen im Gewebe vorkommen. Wie bei den einschichtig gewachsenen Zellen, hatten die C-CPE funktionalisierten AuNP einen stärker reduzierenden Effekt auf die Sphäroidfläche als die nicht-funktionalisierten AuNP (Figure 6c in Manuskript 1).

Ein weiterer Grund für den reduzierten Tötungseffekt könnte sein, dass das Matrigel zu einem Verlust der Laserenergie führt. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich das Expressionsmuster von Claudin-3, -4 und -7 von Zellen in 3D im Vergleich zu Zellen in 2D ändert. Eine reduzierte Expression führt zu einer verringerten C-CPE-Bindung. Verglichen zu den Zellen in 2D-Kultur konnte indessen keine reduzierte C-CPE-Bindung an die OE-33 oder MCF-7 Zellen in der Matrigelmatrix festgestellt werden (Figure 3c und 6a in Manuskript 1). Der mögliche Energieverlust durch das Matrigel konnte durch eine mehrfache Laserbestrahlung kompensiert werden. Die dreifache Laserbestrahlung erhöhte die Tötungseffizienz (Figure 6c in Manuskript 1). Zusätzlich hatte die GNOME-LP mit den C-CPE-AuNP einen Langzeiteffekt auf die OE-33 Sphäroide. An den Sphäroidgrenzen konnten Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff konjugiertem Annexin V markiert werden (Figure 6e in Manuskript 1). Annexin V ist ein Mitglied der Annexinfamilie, die natürlicherweise in eukaryotischen Zellen an Phospholipide der Membran binden und somit die Membranorganisation regulieren können (Gerke & Moss 2002). Ein frühes Zeichen für Apoptose sind externalisierte Phosphatidylserine der Zellmembran, an die das Annexin V Konjugat binden kann (Hankins et al. 2015; Crowley et al. 2016). Daher kann angenommen werden, dass der Langzeiteffekt durch eine kontinuierliche Apoptose gekennzeichnet ist und somit vermutlich auch Zellen, die nicht direkt durch die GNOME-LP mit C-CPE-AuNP zerstört wurden, irreversibel beschädigt wurden.

Schließlich zeigen die Ergebnisse, dass das C-CPE zur Funktionalisierung von Goldnanopartikel eingesetzt werden kann, um spezifisch und effizient ein breites Spektrum von Claudin-positiven Tumorzellen mit optischen Systemen, wie der GNOME-LP, zu töten (Figure 1 und Table 1 in Manuskript 1). Die Methode kann überdies genutzt werden, wenn Zellen in Matrigel proliferieren und könnte somit eine Möglichkeit sein, Tumore innerhalb eines Gewebes während therapeutischen Maßnahmen zu behandeln. Zusätzlich könnte das C-CPE über die Kopplung an Fluoreszenzfarbstoffe zur Detektion von Tumoren eingesetzt werden.

3.3 Parameter der Optoperforation von Krebszellen mit C-CPE-AuNP

Für eine zukünftige therapeutische Anwendung der C-CPE-AuNP für die Optoperforation ist es notwendig die physikalischen und die zellulären Mechanismen, die zur Schädigung der Krebszellen führen, zu verstehen. Das Verstehen der Parameter kann dazu beitragen die Krebszellablation mit der GNOME-LP Technik effizienter zu gestalten und somit eine schnelle maximale Ablation von Krebszellen zu erreichen. Hierfür wurden die verschiedenen Parameter wie die Funktionalisierung der AuNP zusammen mit physikalischen Parametern wie der Laserfluenz und Scangeschwindigkeit analysiert.

Die Effizienz der Ablation von Krebszellen korreliert vermutlich unter anderem mit der Summe von gebundenen AuNP an die Krebszellen, die wiederum von verfügbaren Claudinen in den Zellen und C-CPE-AuNP Komplexen kontrolliert wird. Daher wurden Bindungsstudien mit verschiedenen Konzentrationen an C-CPE durchgeführt. Mit der Kopplung von C-CPE über seinen Strep-tag II mit einem Strep-Tactin Chromeo 546 Konjugat, konnte über die Messung der Fluoreszenzintensität eine steigende C-CPE-Bindung an die Caco-2 Zellen mit einer steigenden Konzentration von bis zu 20 µg/ml C-CPE ermittelt werden (Figure S1 in Manuskript 2). Demnach sind vermutlich entsprechend viele Claudine in den Zellen verfügbar, an die 20 µg/ml C-CPE binden kann. Bei dieser Konzentration und einem Molekulargewicht vom C-CPE zwischen 15 bis 20 kDa, liegt damit der K_d -Wert bei ungefähr 1×10^{-6} M. Dies stimmt mit den Beobachtungen überein, dass die Caco-2 Zellen Claudin-3, -4 und -7 exprimieren, an die C-CPE mit einer hohen Affinität bindet. In einem optimierten System, bestehend aus Claudin-3, -4 oder -7 transfizierten Zellen, wurde für Claudin-3, -4 und -7 ein jeweiliger K_d -Wert von 2×10^{-8} M, $9,1 \times 10^{-9}$ M und $1,1 \times 10^{-8}$ M berechnet (Sonoda et al. 1999; Fujita et al. 2000). Die niedrigeren K_d -Werte könnten durch eine höhere Expressionsrate der jeweiligen transfizierten Claudine entstanden sein. Die erhöhte C-CPE-Konzentration von 20 µg/ml ermöglicht die vermutlich reduzierte Sensitivität der nativen Zellen gegenüber C-CPE verglichen zu Claudin-3/-4 transfizierten Zellen zu kompensieren. In Bezug auf die verfügbaren C-CPE-AuNP Komplexe, wird deren Ausbildung durch die Bindung des N-terminalen Strep-tag II von C-CPE an die Strep-Tactin konjugierten AuNP bestimmt. Laut Herstellerinformation wurden für die Komplexbildung ungefähr 45 µg Strep-Tactin-Moleküle pro 1×10^{11} AuNP vermengt. Das Strep-Tactin ist eine modifizierte Form des 52 kDa großen Streptavidins (Schmidt & Skerra 2007; Fan et al. 2019). Angenommen Strep-Tactin ist ungefähr mit 50 kDa ähnlich groß wie Streptavidin, könnten schätzungsweise 5.000 Strep-Tactin-Moleküle an jedes AuNP binden. Für die GNOME-LP Versuche wurden 20 µg/ml C-CPE und $2,5 \times 10^{10}$ AuNP vermengt, sodass ca. $2,4 \times 10^4$ C-CPE Moleküle pro AuNP binden können. Damit sind ausreichend C-CPE Moleküle vorhanden, um an die Strep-Tactin konjugierten AuNP binden zu können. Schließlich konnte somit eine Menge an C-CPE-AuNP Komplexen generiert werden, die es erlaubte spezifisch über 90 % der Claudin-3, -4 und -7 exprimierenden Zellen zu eliminieren.

Die Betrachtung der physikalischen Parameter ergab eine steigende Tötungseffizienz bei einer applizierten Laserfluenz zwischen 5 mJ/cm^2 und 60 mJ/cm^2 . Die maximale Effizienz mit über 90 % getöteten Zellen wurde bei $20\text{-}30 \text{ mJ/cm}^2$ erreicht (Figure 1C in Manuskript 2). Die optimierte Funktionalisierung der AuNP mit C-CPE änderte aber nicht die Korrelation zwischen Laserfluenz und Tötungseffizienz. Jedoch steigerte die höhere C-CPE Konzentration für die AuNP-Funktionalisierung die absolute Tötungseffizienz, die für die unterschiedlichen Laserfluenzen beobachtet wurden. So

lag die Tötungseffizienz mit 5 µg/ml C-CPE funktionalisierte AuNP bei ca. 70 % und 60 mJ/cm² (Figure 4b in Manuskript 1) während die Tötungseffizienz mit 20 µg/ml C-CPE funktionalisierte AuNP und 60 mJ/cm² bei über 90 % lag (Figure 1C in Manuskript 2). Überdies war auffallend, dass unabhängig vom Funktionalisierungsprozess der AuNP und der Laserfluenz, die maximale Tötungseffizienz bei einer Scangeschwindigkeit von 5 mm/s erreicht wurde (Manuskript 1 und 2). Bei einer Laserfluenz von 30 mJ/cm² und einer Scangeschwindigkeit von 5 mm/s reduzierte sich das Zellüberleben auf 8 %. Die Erhöhung der Scangeschwindigkeit auf 10 mm/s oder 40 mm/s induzierte jeweils ein Zellüberleben von 30 % und 45 % (Figure 1D in Manuskript 2). Die Bedeutung der Scangeschwindigkeit hängt vermutlich mit dem Überlappungsgrad der aufeinanderfolgenden Laserpulsen (OD) zusammen (Bartolo et al. 2006). Der Zusammenhang ist in folgender Formel (2 und in Abbildung 3-3 dargestellt:

$$OD = 1 - \frac{V_s}{f \times d} \times 100 \quad \text{Formel (2)}$$

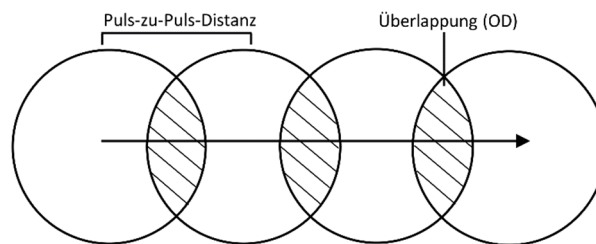


Abbildung 3-3: Illustration der Überlappung von aufeinanderfolgenden Laserpulsen (adaptiert von Cardoso et al. (2017)).

Der OD ergibt sich aus der Scangeschwindigkeit (V_s) in mm/s, der Pulsrepetitionsrate (f) in kHz und dem Durchmesser des Laserpulses (d) in µm. Bei einer Scangeschwindigkeit von 5, 10 und 40 mm/s und der konstanten Pulsrepetitionsrate mit 20 kHz sowie konstanten Pulsdurchmesser von 80 µm ergeben sich ODs von jeweils 99,7 %, 99,4 % und 97,5 %. Die Tötungseffizienz verhält sich nicht linear zum Überlappungsgrad. Die Änderung des Überlappungsgrads von 99,7 % zu 97,5 % korreliert mit einer exponentiell reduzierten Tötungseffizienz von über 90 % auf 70 % (Figure 1D in Manuskript 2). Die Reduzierung des Überlappungsgrads als Folge der erhöhten Scangeschwindigkeit reduziert eventuell die Anzahl an Laserpulsen pro AuNP. Abhängig von der AuNP-Dichte auf der Zelloberfläche interagieren vermutlich weniger AuNP mit dem Laser bei steigender Scangeschwindigkeit. Folglich könnte sich mit einer höheren Scangeschwindigkeit das Ausmaß der Zellmembranschädigung verringern, während die Schädigung pro bestrahlten AuNP gleich bleibt. Dieser Zusammenhang erklärt teilweise, dass eine mehrmalige Laserbehandlung der Zellen mit einer Laserfluenz

von 30 mJ/cm^2 bei einer Scangeschwindigkeit von 40 mm/s notwendig ist, um eine ähnlich hohe Tötungseffizienz wie mit 30 mJ/cm^2 bei 5 mm/s zu erreichen (Figure S2 in Manuskript 2). Zusätzlich konnte durch die Erhöhung der Laserleistung die Laserfluenz erhöht werden. Jedoch zeigte sich auch hier eine nicht-lineare Korrelation zwischen Tötungseffizienz und der Laserfluenz. Die Tötungseffizienz erhöhte sich von 11% bei 5 mJ/cm^2 auf einen konstanten Wert von über 90% ab 20 mJ/cm^2 (Figure 1C in Manuskript 2). Eine weitere Erhöhung der Laserfluenz auf 60 mJ/cm^2 führte nicht zu einer höheren Tötungseffizienz als bei 20 mJ/cm^2 (Figure 1C in Manuskript 2). Aus diesem Grund führt eine Erhöhung der Laserleistung nicht zwingend zu einer effizienteren Ablation von Krebszellen. Die Laserrepetitionsrate und der Laserdurchmesser müssen so eingestellt werden, dass sowohl eine Laserfluenz von $20\text{-}30 \text{ mJ/cm}^2$ als auch eine OD von $99,7 \%$ erreicht wird. Daher wurden alle weiteren Experimente mit diesen Lasereinstellungen durchgeführt.

Bezüglich der biologischen Ebene kann die AuNP-vermittelte Optoperforation von Zellen entweder zu apoptotischen oder nekrotischen Zellen führen (Melamed et al. 2015; Pérez-Hernández et al. 2015; Abadeer & Murphy 2016). Bei der Apoptose wird eine Reihe von verschiedenen Caspasen aktiviert, die viele zelluläre Proteine spalten. Die Aktivität der Caspasen mündet schließlich in einer veränderten Plasmamembranstruktur sowie in einer beeinträchtigen Mitochondrienaktivität und Chromatinintegrität (Tait & Green 2010). Diese morphologischen Veränderungen der Zellen während der Apoptose können unter anderem mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht werden. Ein frühes Zeichen der Apoptose ist die Externalisierung von Phosphatidylserinen von der inneren zur äußeren Zellmembranschicht (Hankins et al. 2015), die mit Fluoreszenzfarbstoff konjugiertem Annexin V markiert werden kann. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker können Mitochondrien in lebenden Zellen markiert werden. Die Anreicherung vom MitoTracker ist dabei abhängig vom Membranpotential der Mitochondrien (Chazotte 2011).

Die Optoperforation von mit C-CPE-AuNP behandelten Darmkrebszellen induzierte unabhängig von der verwendeten Laserfluenz eine erhöhte Annexin V Markierung der Zellmembran, während die Mitochondrien eine verringerte Markierung mit MitoTracker aufwiesen (Figure 3A und 3B in Manuskript 2). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Optoperforation die Phosphatidylserine der Membran freilegte und die Aktivität der Mitochondrien beeinträchtigte. Bei den Zellen bestrahlt mit 60 mJ/cm^2 war die Markierung der Phosphatidylserine mit Annexin V stärker verglichen zu den mit niedrigeren Laserfluenzen behandelten Zellen (Figure 3C in Manuskript 2). Vermutlich verursachte die Behandlung mit 60 mJ/cm^2 eine stärkere Schädigung der Membran einhergehend mit mehr freigelegten Phosphatidylserinen. Aber 24 h nach der Optoperforation mit 60 mJ/cm^2 verrin-

gerte sich die Markierung mit Annexin V. Möglicherweise hervorgerufen durch den Verlust von toten Zellen und damit einhergehend einer reduzierten Anzahl von Annexin V positiven Zellen (Figure 3C in Manuskript 2). Außerdem wurden nach der Optoperforation bei allen Laserfluenzen kleinere Zellkerne beobachtet, die auf eine Kondensation von Chromatiden schließen lässt (Toné et al. 2007).

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse auf einen Apoptose-assoziierten Zelltod schließen. Jedoch ergab eine Lumineszenz-basierte Aktivitätsanalyse von Caspase-3 und -7 nach 0,5 h, 3 h und 24 h keine erhöhte, sondern eine tendenziell stetig abnehmende Aktivität der beiden Proteasen (Figure 4A und 5S in Manuskript 2). Die unspezifische Inhibierung der Caspasen mit dem Wirkstoff Z-VAD-FMK reduzierte unabhängig von der Behandlung die Aktivität von Caspase-3/-7, aber konnte nicht das reduzierte Zellüberleben verhindern, wenn Zellen in Anwesenheit von C-CPE-AuNP optoperforiert wurden (Figure 4B und 5S in Manuskript 2). Somit konnte keine für die Apoptose typisch erhöhte Aktivität von Caspase-3/-4 festgestellt werden. Die durch die Optoperforation verursachte reduzierte Aktivität der Mitochondrien von mit C-CPE-AuNP behandelten Zellen verringerte vermutlich die Verfügbarkeit des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP). Die reduzierte Verfügbarkeit von intrazellulärem ATP könnte somit die Aktivierung der initialen Caspasen, die Apoptose einleiten, verhindern (Bröker et al. 2005; Tsujimoto 1997). Die nachgeschaltete Aktivierung der Effektor-Caspase-3/-7 wäre damit unterbunden. Dies könnte im Ansatz die nicht erhöhte Aktivität der Caspase-3/-7 in Zellen nach der Optoperforation erklären und wäre ein Hinweis auf einen nekrotisch-assoziierten Zelltod.

Weitere Analysen zeigten, dass die Optoperforation mit C-CPE-AuNPs eine gleichzeitige Aufnahme von Propidiumiodid und Annexin V in die Zellen induzierte (Figure S4 in Manuskript 2). Dies konnte auch 24 h nach der Optoperforation beobachtet werden. Vermutlich führte die Optoperforation von mit C-CPE-AuNP behandelten Zellen zu einer irreversiblen Permeabilisierung der Membran, die eine Aufnahme von Annexin V und Propidiumiodid erlaubte, sowie die Mitochondrien schädigte. Begleitet wurde dies vom Verlust ihres Membranpotentials, der wiederum zu einer schwachen Färbung der Mitochondrien führte. Die simultane Aufnahme von Annexin V und Propidiumiodid wird häufig als Merkmal der Nekrose beschrieben (Crowley et al. 2016). Inwiefern es sich um einen nekrotischen Zelltod handelte, wurde mit der Analyse der DNA 3 h und 24 h nach der Laserbestrahlung mittels Gelelektrophorese überprüft (Figure 4C in Manuskript 2). Hierbei zeigte sich ein leichter DNA-Schlier 24 h nach der Bestrahlung. Ein DNA-Schliermuster kann durch nekrotische Zellen erzeugt werden, während apoptotische Zellen eine typische DNA-Leiterstruktur ausbilden (Kasibhatla

et al. 2006). Das DNA-Schliermuster und die simultane Aufnahme von Annexin V und Propidiumiodid in den Zellen sprechen eher für eine Nekrose als eine Apoptose (Crowley et al. 2016; Kasibhatla et al. 2006). Demzufolge reduziert womöglich die Optoperforation in Anwesenheit von C-CPE-AuNP das Zellüberleben, indem es nekrotische Reaktionen in den Zellen induziert.

Für eine zukünftige Tumorbehandlung wurde untersucht, ob die erhöhte C-CPE-Konzentration (20 µg/ml) für die AuNP-Funktionalisierung in dem 3D-Kulturmodell, bestehend aus Matrigel und Sphäroiden aus Caco-2 und OE-33 Krebszellen, effizienter die Sphäroidstruktur durch ein reduziertes Zellüberleben beeinträchtigt als mit 5 µg/ml C-CPE funktionalisierten AuNP. Analog zu der Optoperforation mit 5 µg/ml C-CPE funktionalisierten AuNP, wurden die Sphäroide dreimal einer Laserbehandlung mit 60 mJ/cm² bei einer Scangeschwindigkeit von 5 mm/s unterzogen. Die höhere Laserfluenz sowie die höhere C-CPE-Konzentration reduzierten die OE-33 Sphäroidfläche um die Hälfte (Figure 2D in Manuskript 2). Die Optoperforation mit 5 µg/ml C-CPE funktionalisierten AuNP reduzierte die Sphäroidfläche auf ca. 70 % (Figure 6c in Manuskript 1). Damit induziert die vermehrte Verfügbarkeit von C-CPE-AuNP eine effizientere Schädigung der Sphäroidstruktur. Verglichen zu den OE-33 Sphäroiden zerstörte die Optoperforation von Caco-2 Sphäroiden in Anwesenheit von C-CPE-AuNP komplett die Struktur von 80 % der Sphäroide (Figure 2C in Manuskript 2). Demnach scheint die Optoperforation in Kombination mit den C-CPE-AuNP je nach Zelltyp unterschiedlich effizient zu sein. Dies könnte mit der unterschiedlichen Beschaffenheit der OE-33 und Caco-2 Sphäroiden zusammenhängen. Vermutlich können die C-CPE-AuNP tiefer in die Caco-2 Sphäroide eindringen als in die OE-33 Sphäroide, sodass auch im Zentrum der Sphäroide mehr Zellen durch die Laserbestrahlung getötet werden. Die Färbung der Sphäroide mit Propidiumiodid als Indikator für tote Zellen und Calcein AM als Indikator für lebende Zellen, zeigte ein deutlich kleineres Caco-2 Sphäroidzentrum mit lebenden Zellen als bei den OE-33 Sphäroiden (Figure 2A und 2B in Manuskript 2). Eine längere Kultivierung der Sphäroide bis zu 72 h nach der Optoperforation zeigte einen fortlaufenden Zusammenfall der Caco-2 Sphäroide mit mehr toten als lebenden Zellen (Figure S3 in Manuskript 2). Bei den OE-33 Sphäroiden konnte kein langfristiger Tötungseffekt beobachtet werden. Die reduzierte Sphäroidfläche direkt nach der Optoperforation war das Resultat von getöteten Zellen. Tote Zellen waren, aber nicht nach 24 h oder 48 h zu detektieren. Die OE-33 Sphäroide erschienen weiterhin intakt (Figure S3 in Manuskript 2). Damit liegt die Vermutung nahe, dass die im Sphäroidzentrum liegenden Zellen nicht von der Laserbestrahlung beschädigt wurden und somit weiterhin proliferieren konnten.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse, dass AuNP mit C-CPE funktionalisiert werden können, um eine anschließende spezifische und effiziente Optoperforation-induzierte Tötung von Krebszellen durchführen zu können. Die erhöhte C-CPE-Konzentration zur Funktionalisierung der AuNP ermöglicht es mit einer reduzierten Laserfluenz die Effizienz der Zelltötung zu erhöhen. Die Scangeschwindigkeit des Lasers beeinflusst maßgeblich die Tötungseffizienz der Krebszellen. Die reduzierte Aktivität der Mitochondrien, externalisierte Phosphatidylserine und reduzierte Caspase-3/-7 Aktivität weisen auf einen nekrotischen Zelltod hin. Diese identifizierten physikalischen und biologischen Parameter könnten daher dazu beitragen, eine effiziente optische Ablation von Krebszellen mittels C-CPE-AuNP auch unter *in vivo* Bedingungen zu erreichen.

3.4 Ausblick

Basierend auf den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die Optoperforation mit C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ funktionalisierten AuNP in Kombination mit der GNOME-LP eine geeignete Methode darstellt, um spezifisch und effizient Krebszellen zu töten, welche ein Claudin-3, -4 und -7 Expressionsmuster aufweisen.

Für eine zukünftige *in vivo* Anwendung könnte die Verwendung von Laserpulsen mit einer Wellenlänge von 650-900 nm im Nahinfrarotbereich (NIR) die Zelltötung in Tumorgewebe verbessern (Dreaden et al. 2012). Hierbei hat sich gezeigt, dass besonders bei Goldstäbchen im Bereich von NIR-Frequenzen SPR-Effekte auftreten und effizient Lichtenergie in Hitze umwandeln (Tong et al. 2007). Außerdem ist im NIR-Bereich die Lichtstreuung und -absorption im Gewebe minimal (Bucharskaya et al. 2016). Somit ermöglichen NIR-Laserpulse eine tiefere Gewebebehandlung (Boulais et al. 2012). Beispielsweise könnte die parallele Applikation von NIR-Laserpulsen und den C-CPE-AuNP bei kutanen Tumoren angewendet werden. Daneben ermöglicht eine endoskopisch geführte Laserablation die Bekämpfung von mit C-CPE-AuNP vorbehandelten chemoresistenten Tumorarten mit einer abnormalen erhöhten Claudin-3 oder -4 Expression, ohne gravierende Nebeneffekte zu erzeugen. Anhand von 3D-Kultursystemen könnte die Tötungseffizienz mit NIR-Laserpulsen und C-CPE-AuNP analysiert werden.

Außerdem könnte es notwendig sein, die C-CPE-Dosierung für zukünftige klinische Versuche anzupassen, da maligne Tumore häufig aus verschiedenen Zellarten bestehen. Die verschiedenen Krebszellarten weisen vermutlich ein unterschiedliches Claudinexpressionsmuster auf. So könnten statt Claudin-3, -4 und -7, die eine hohe C-CPE-Affinität haben, andere Claudine exprimiert werden, die eine geringe oder keine C-CPE-Affinität aufzeigen. Krebszellen die z.B. Claudin-8 oder -14 exprimieren, haben mit einer K_d von ungefähr 1×10^{-6} und $2,3 \times 10^{-6}$ M (Sonoda et al. 1999; Fujita et al.

2000) eine geringere Affinität zum C-CPE. Für das spezifische Targeting von Krebszellen, welche Claudine exprimieren, die keine natürlichen C-CPE-Rezeptoren darstellen, könnte das C-CPE Polypeptid durch Einfügen von Mutationen so modifiziert werden, dass es anschließend mit hoher Affinität an diese bindet (Mitchell & Koval 2010). Beispielsweise bindet eine von Protze et al. (2015) erstellte C-CPE-Mutante spezifisch an Claudin-5. Eine Mutation von C-CPE, die an der Stelle 313 die Aminosäure Alanin statt Serin erzeugt, erhöht die Bindungseigenschaften zu Claudin-4 im Vergleich zum Wildtyp C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ (Takahashi et al. 2012). Die erhöhte Bindungseigenschaft von C-CPE-Mutanten könnte wiederum eine reduzierte Dosierung von C-CPE zur AuNP-Funktionalisierung ermöglichen ohne den Tötungseffekt der Optoperforation zu reduzieren.

Inwiefern die Optoperforation auch unter *in vivo* Bedingungen Nekrose in Tumorgewebe hervorruft, bedarf weiterer Untersuchungen. Nekrose aktiviert im Gegensatz zur Apoptose *in vivo* eine immunologische Reaktion im Gewebe. Methoden zur Rekrutierung von immunologischen Zellen zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen könnten die Behandlungseffizienz erhöhen (Schumacher & Schreiber 2015). Tumorzellen exprimieren Neoantigen (Capietto et al. 2017). Tumorzellen können zudem eine verringerte Expression oder den Verlust von humanen Leukozyten-Antigenen der Klasse I (HLA-1) aufweisen, die zu einer stark reduzierten Repräsentation der Neoantigene führen kann (Mizukami et al. 2008). Damit ist das Tumorumfeld immunogenetisch stillgelegt. Durch die Optoperforation-induzierte Nekrose werden die in Tumorzellen enthaltenen Neoantigene aus dem Tumorgewebe freigesetzt. Diese können als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) oder DAMPs agieren und somit das körpereigene Immunsystem aktivieren (Demaria et al. 2010). Das sonst stille immunogene Tumorumfeld wird so in ein aktives immunogenes Tumorumfeld umgewandelt (Shi & Lammers 2019). Durch den Einsatz von C-CPE-AuNP könnte spezifisch eine verstärkte Immunantwort am Tumorgewebe erfolgen und somit die Tumorbehandlung unterstützt werden.

4 Literaturverzeichnis

- Abadeer NS & Murphy CJ. (2016). Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **120**(9), 4691–716.
- Agarwal R, D'Souza T, Morin PJ. (2005). Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res* **65**(16), 7378–85.
- Aranda V, Nolan ME, Muthuswamy SK. (2008). Par complex in cancer: a regulator of normal cell polarity joins the dark side. *Oncogene* **27**(55), 6878–87.
- Bartolo P, Vasco J, Silva B, Galo C. (2006). Laser micromachining for mould manufacturing: I. The influence of operating parameters. *Assembly Automation* **26**(3), 227–34.
- Baumgart J, Humbert L, Boulais É, Lachaine R, Lebrun J-J, Meunier M. (2012). Off-resonance plasmonic enhanced femtosecond laser optoporation and transfection of cancer cells. *Biomaterials* **33**(7), 2345–50.
- Baumgartner HK, Rudolph MC, Ramanathan P, Burns V, Webb P, Bitler BG, Stein T, Kobayashi K, Neville MC. (2017). Developmental Expression of Claudins in the Mammary Gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **22**(2), 141–57.
- Boulais E, Lachaine R, Meunier M. (2012). Plasma mediated off-resonance plasmonic enhanced ultrafast laser-induced nanocavitation. *Nano Lett* **12**(9), 4763–9.
- Bröker LE, Kruyt FAE, Giaccone G. (2005). Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* **11**(9), 3155–62.
- Bucharskaya A, Maslyakova G, Terentyuk G, Yakunin A, Avetisyan Y, Bibikova O, Tuchina E, Khlebtsov B, Khlebtsov N, Tuchin V. (2016). Towards Effective Photothermal/Photodynamic Treatment Using Plasmonic Gold Nanoparticles. *Int J Mol Sci* **17**(8).
- Campbell CI, Thompson DE, Siwicky MD, Moorehead RA. (2011). Murine mammary tumor cells with a claudin-low genotype. *Cancer Cell Int* **11**, 28.
- Capietto A-H, Jhunjhunwala S, Delamarre L. (2017). Characterizing neoantigens for personalized cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* **46**, 58–65.
- Casagrande F, Cocco E, Bellone S, Richter CE, Bellone M, Todeschini P, Siegel E, Varughese J, Arin-Silasi D, Azodi M, Rutherford TJ, Pecorelli S, Schwartz PE, Santin AD. (2011). Eradication of chemotherapy-resistant CD44+ human ovarian cancer stem cells in mice by intraperitoneal administration of Clostridium perfringens enterotoxin. *Cancer* **117**(24), 5519–28.
- Chakrabarti G & McClane BA. (2005). The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of CaCo-2 cell death pathways by Clostridium perfringens enterotoxin. *Cell Microbiol* **7**(1), 129–46.

- Chanda N, Kattumuri V, Shukla R, Zambre A, Katti K, Upendran A, Kulkarni RR, Kan P, Fent GM, Casteel SW, Smith CJ, Boote E, Robertson JD, Cutler C, Lever JR, Katti KV, Kannan R. (2010). Bombesin functionalized gold nanoparticles show in vitro and in vivo cancer receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(19), 8760–5.
- Cardoso JT, Garcia-Girón A, Romano JM, Huerta-Murillo D, Jagdheesh R, Walker M, Dimov SS, Ocaña JL. (2017). Influence of ambient conditions on the evolution of wettability properties of an IR-, ns-laser textured aluminium alloy. *RSC Adv.* **7**(63), 39617–27.
- Chazotte B. (2011). Labeling mitochondria with MitoTracker dyes. *Cold Spring Harb Protoc* **2011**(8), 990–2.
- Chen Q, Kang J, Fu C. (2018). The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. *Sig Transduct Target Ther* **3**(1), 1–11.
- Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. (2008). Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta* **1778**(3), 588–600.
- Choi CHJ, Alabi CA, Webster P, Davis ME. (2010). Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(3), 1235–40.
- Cocco E, Shapiro EM, Gasparrini S, Lopez S, Schwab CL, Bellone S, Bortolomai I, Sumi NJ, Bonazzoli E, Nicoletti R, Deng Y, Saltzman WM, Zeiss CJ, Centritto F, Black JD, Silasi D-A, Ratner E, Azodi M, Rutherford TJ, Schwartz PE, Pecorelli S, Santin AD. (2015). Clostridium perfringens enterotoxin C-terminal domain labeled to fluorescent dyes for in vivo visualization of micrometastatic chemotherapy-resistant ovarian cancer. *Int J Cancer* **137**(11), 2618–29.
- Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* **2016**(11).
- Demaria S, Pikarsky E, Karin M, Coussens LM, Chen Y-C, El-Omar EM, Trinchieri G, Dubinett SM, Mao JT, Szabo E, Krieg A, Weiner GJ, Fox BA, Coukos G, Wang E, Abraham RT, Carbone M, Lotze MT. (2010). Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. *J Immunother* **33**(4), 335–51.
- Dias K, Dvorkin-Gheva A, Hallett RM, Wu Y, Hassell J, Pond GR, Levine M, Whelan T, Bane AL. (2017). Claudin-Low Breast Cancer; Clinical & Pathological Characteristics. *PLoS ONE* **12**(1), e0168669.
- Dreaden EC, Austin LA, Mackey MA, El-Sayed MA. (2012). Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. *Ther Deliv* **3**(4), 457–78.
- D'Souza T, Agarwal R, Morin PJ. (2005). Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* **280**(28), 26233–40.
- D'Souza T, Indig FE, Morin PJ. (2007). Phosphorylation of claudin-4 by PKCepsilon regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *Exp Cell Res* **313**(15), 3364–75.
- Ebihara C, Kondoh M, Hasuiki N, Harada M, Mizuguchi H, Horiguchi Y, Fujii M, Watanabe Y. (2006). Preparation of a claudin-targeting molecule using a C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. *J Pharmacol Exp Ther* **316**(1), 255–60.

- El-Sayed IH, Huang X, El-Sayed MA. (2005). Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. *Nano Lett* **5**(5), 829–34.
- Escudero-Esparza A, Jiang WG, Martin TA. (2011). The Claudin family and its role in cancer and metastasis. *Front Biosci* **16**, 1069–83.
- Fan X, Wang J, Zhang X, Yang Z, Zhang J-C, Zhao L, Peng H-L, Lei J, Wang H-W. (2019). Single particle cryo-EM reconstruction of 52 kDa streptavidin at 3.2 Angstrom resolution. *Nat Commun* **10**(1), 1–11.
- Findley MK & Koval M. (2009). Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life* **61**(4), 431–7.
- Förster C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol* **130**(1), 55–70.
- Freedman JC, Shrestha A, McClane BA. (2016). Clostridium perfringens Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications. *Toxins (Basel)* **8**(3).
- Fujibe M, Chiba H, Kojima T, Soma T, Wada T, Yamashita T, Sawada N. (2004). Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions. *Exp Cell Res* **295**(1), 36–47.
- 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**(3), 258–61.
- Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. (1998). A Single Gene Product, Claudin-1 or -2, Reconstitutes Tight Junction Strands and Recruits Occludin in Fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* **143**(2), 391–401.
- Gao Z & McClane BA. (2012). Use of Clostridium perfringens Enterotoxin and the Enterotoxin Receptor-Binding Domain (C-CPE) for Cancer Treatment: Opportunities and Challenges. *J Toxicol* **2012**, 981626.
- Gao Z, Xu X, McClane B, Zeng Q, Litkouhi B, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC, Garner EIO. (2011). C terminus of Clostridium perfringens enterotoxin downregulates CLDN4 and sensitizes ovarian cancer cells to Taxol and Carboplatin. *Clin Cancer Res* **17**(5), 1065–74.
- Gerke V & Moss SE. (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* **82**(2), 331–71.
- Guillemot L, Paschoud S, Pulimeno P, Foglia A, Citi S. (2008). The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochim Biophys Acta* **1778**(3), 601–13.
- Günzel D & Fromm M. (2012). Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol* **2**(3), 1819–52.
- Günzel D & Yu ASL. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* **93**(2), 525–69.

- Hagen SJ. (2017). Non-canonical functions of claudin proteins: Beyond the regulation of cell-cell adhesions. *Tissue Barriers* **5**(2), e1327839.
- Hammer SC, Nagel S, Junginger J, Hewicker-Trautwein M, Wagner S, Heisterkamp A, Ngezahayo A, Nolte I, Murua Escobar H. (2016). Claudin-1, -3, -4 and -7 gene expression analyses in canine prostate carcinoma and mammary tissue derived cell lines. *Neoplasma* **63**(2), 231–8.
- Hammer SC, Becker A, Rateitschak K, Mohr A, Lüder Ripoli F, Hennecke S, Junginger J, Hewicker-Trautwein M, Brenig B, Ngezahayo A, Nolte I, Murua Escobar H. (2016). Longitudinal Claudin Gene Expression Analyses in Canine Mammary Tissues and Thereof Derived Primary Cultures and Cell Lines. *Int J Mol Sci* **17**(10).
- Hankins HM, Baldrige RD, Xu P, Graham TR. (2015). Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution. *Traffic* **16**(1), 35–47.
- Hanna PC, Mietzner TA, Schoolnik GK, McClane BA. (1991). Localization of the receptor-binding region of Clostridium perfringens enterotoxin utilizing cloned toxin fragments and synthetic peptides. The 30 C-terminal amino acids define a functional binding region. *J Biol Chem* **266**(17), 11037–43.
- Hashimoto Y, Yagi K, Kondoh M. (2017). Roles of the first-generation claudin binder, Clostridium perfringens enterotoxin, in the diagnosis and claudin-targeted treatment of epithelium-derived cancers. *Pflugers Arch* **469**(1), 45–53.
- Heinemann D, Schomaker M, Kalies S, Schieck M, Carlson R, Murua Escobar H, Ripken T, Meyer H, Heisterkamp A. (2013). Gold nanoparticle mediated laser transfection for efficient siRNA mediated gene knock down. *PLoS ONE* **8**(3), e58604.
- Hicks DA, Galimanis CE, Webb PG, Spillman MA, Behbakht K, Neville MC, Baumgartner HK. (2016). Claudin-4 activity in ovarian tumor cell apoptosis resistance and migration. *BMC Cancer* **16**(1), 788.
- Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, Sershen SR, Rivera B, Price RE, Hazle JD, Halas NJ, West JL. (2003). Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23), 13549–54.
- Hofmann M, Guschel M, Bernd A, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, Tandi C, Wiig H, Kippenberger S. (2006). Lowering of tumor interstitial fluid pressure reduces tumor cell proliferation in a xenograft tumor model. *Neoplasia* **8**(2), 89–95.
- Huang Y-H, Bao Y, Peng W, Goldberg M, Love K, Bumcrot DA, Cole G, Langer R, Anderson DG, Sawicki JA. (2009). Claudin-3 gene silencing with siRNA suppresses ovarian tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(9), 3426–30.
- Hwang T-L, Lee L-Y, Wang C-C, Liang Y, Huang S-F, Wu C-M. (2010). Claudin-4 expression is associated with tumor invasion, MMP-2 and MMP-9 expression in gastric cancer. *Exp Ther Med* **1**(5), 789–97.
- Jain S, Hirst DG, O'Sullivan JM. (2012). Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *Br J Radiol* **85**(1010), 101–13.

- Kalies S, Heinemann D, Schomaker M, Gentemann L, Meyer H, Ripken T. (2014). Immobilization of gold nanoparticles on cell culture surfaces for safe and enhanced gold nanoparticle-mediated laser transfection. *J Biomed Opt* **19**(7), 70505.
- Kasibhatla S, Amarante-Mendes GP, Finucane D, Brunner T, Bossy-Wetzel E, Green DR. (2006). Analysis of DNA fragmentation using agarose gel electrophoresis. *CSH Protoc* **2006**(1).
- Katahira J, Sugiyama H, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N. (1997). Clostridium perfringens enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo. *J Biol Chem* **272**(42), 26652–8.
- Kimura J, Abe H, Kamitani S, Toshima H, Fukui A, Miyake M, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Yamamoto S, Horiguchi Y. (2010). Clostridium perfringens enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. *J Biol Chem* **285**(1), 401–8.
- Kitaichi T, Yasui K, Gen Y, Dohi O, Iwai N, Tomie A, Yamada N, Terasaki K, Umemura A, Nishikawa T, Yamaguchi K, Moriguchi M, Sumida Y, Mitsuyoshi H, Naito Y, Zen Y, Itoh Y. (2017). Loss of PAR-3 protein expression is associated with invasion, lymph node metastasis, and poor survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* **62**, 134–40.
- Kokai-Kun JF, Songer JG, Czczulin JR, Chen F, McClane BA. (1994). Comparison of Western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of Clostridium perfringens. *J Clin Microbiol* **32**(10), 2533–9.
- Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P, Sukumar S. (2004). Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol* **164**(5), 1627–33.
- Kondoh M, Masuyama A, Takahashi A, Asano N, Mizuguchi H, Koizumi N, Fujii M, Hayakawa T, Horiguchi Y, Watanbe Y. (2005). A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Mol Pharmacol* **67**(3), 749–56.
- Kono H & Rock KL. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* **8**(4), 279–89.
- Kono T, Kondoh M, Kyuno D, Ito T, Kimura Y, Imamura M, Kohno T, Konno T, Furuhashi T, Sawada N, Hirata K, Kojima T. (2015). Claudin-4 binder C-CPE 194 enhances effects of anticancer agents on pancreatic cancer cell lines via a MAPK pathway. *Pharmacol Res Perspect* **3**(6), e00196.
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. (2008). Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* **1778**(3), 631–45.
- Krug SM, Günzel D, Conrad MP, Lee I-FM, Amasheh S, Fromm M, Yu ASL. (2012). Charge-selective claudin channels. *Ann N Y Acad Sci* **1257**, 20–8.
- Kyuno D, Kojima T, Ito T, Yamaguchi H, Tsujiwaki M, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Hirata K, Sawada N. (2011). Protein kinase C α inhibitor enhances the sensitivity of human pancreatic cancer HPAC cells to Clostridium perfringens enterotoxin via claudin-4. *Cell Tissue Res* **346**(3), 369–81.

- La Martín de Fuente L, Malander S, Hartman L, Jönsson J-M, Ebbesson A, Nilbert M, Måsbäck A, Hedenfalk I. (2018). Claudin-4 Expression is Associated With Survival in Ovarian Cancer But Not With Chemotherapy Response. *Int J Gynecol Pathol* **37**(2), 101–9.
- Lanigan F, McKiernan E, Brennan DJ, Hegarty S, Millikan RC, McBryan J, Jirstrom K, Landberg G, Martin F, Duffy MJ, Gallagher WM. (2009). Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer. *Int J Cancer* **124**(9), 2088–97.
- Li J, Chigurupati S, Agarwal R, Mughal MR, Mattson MP, Becker KG, Wood WH, Zhang Y, Morin PJ. (2009). Possible angiogenic roles for claudin-4 in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* **8**(19), 1806–14.
- Li J, Miyamoto K, Sayeed S, McClane BA. (2010). Organization of the cpe locus in CPE-positive clostridium perfringens type C and D isolates. *PLoS ONE* **5**(6), e10932.
- Li J-L & Gu M. (2010). Surface plasmonic gold nanorods for enhanced two-photon microscopic imaging and apoptosis induction of cancer cells. *Biomaterials* **31**(36), 9492–8.
- Li J, Zhuo M, Pei L, Yu ASL. (2013). Conserved aromatic residue confers cation selectivity in claudin-2 and claudin-10b. *J Biol Chem* **288**(31), 22790–7.
- Li J, Li Y-X, Chen M-H, Li J, Du J, Shen B, Xia X-M. (2015). Changes in the phosphorylation of claudins during the course of experimental colitis. *Int J Clin Exp Pathol* **8**(10), 12225–33.
- Li X-M, Wang H, Zhu L-L, Zhao R-Z, Ji H-L. (2015). Genes Regulating Epithelial Polarity Are Critical Suppressors of Esophageal Oncogenesis. *J Cancer* **6**(8), 694–700.
- Li X, Che Z, Mazhar K, Price TJ, Qin Z. (2017). Ultrafast Near-Infrared Light-triggered Intracellular Uncaging to Probe Cell Signaling. *Adv Funct Mater* **27**(11).
- Lioni M, Brafford P, Andl C, Rustgi A, El-Deiry W, Herlyn M, Smalley KSM. (2007). Dysregulation of claudin-7 leads to loss of E-cadherin expression and the increased invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells. *Am J Pathol* **170**(2), 709–21.
- Liu F, Koval M, Ranganathan S, Fanayan S, Hancock WS, Lundberg EK, Beavis RC, Lane L, Duek P, McQuade L, Kelleher NL, Baker MS. (2016). Systems Proteomics View of the Endogenous Human Claudin Protein Family. *J Proteome Res* **15**(2), 339–59.
- Llanco LA, Nakano V, Moraes CTPd, Piazza RMF, Avila-Campos MJ. (2017). Adhesion and invasion of Clostridium perfringens type A into epithelial cells. *Braz J Microbiol* **48**(4), 764–8.
- Lukianova-Hleb EY, Koneva II, Oginsky AO, La Francesca S, Lapotko DO. (2011). Selective and self-guided micro-ablation of tissue with plasmonic nanobubbles. *J Surg Res* **166**(1), e3-13.
- Maeda T, Murata M, Chiba H, Takasawa A, Tanaka S, Kojima T, Masumori N, Tsukamoto T, Sawada N. (2012). Claudin-4-targeted therapy using Clostridium perfringens enterotoxin for prostate cancer. *Prostate* **72**(4), 351–60.
- Martinez MM, Reif RD, Pappas D. (2010). Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Anal. Methods* **2**(8), 996.

- Melamed JR, Edelstein RS, Day ES. (2015). Elucidating the fundamental mechanisms of cell death triggered by photothermal therapy. *ACS Nano* **9**(1), 6–11.
- Michl P, Buchholz M, Rolke M, Kunsch S, Löhr M, McClane B, Tsukita S, Leder G, Adler G, Gress TM. (2001). Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Gastroenterology* **121**(3), 678–84.
- Minai L, Hamra M, Yelin D. (2018). Plasmonic targeting of cancer cells in a three-dimensional natural hydrogel. *Nanoscale* **10**(37), 17807–13.
- Mitchell LA & Koval M. (2010). Specificity of interaction between *clostridium perfringens* enterotoxin and claudin-family tight junction proteins. *Toxins (Basel)* **2**(7), 1595–611.
- Mizukami Y, Kono K, Maruyama T, Watanabe M, Kawaguchi Y, Kamimura K, Fujii H. (2008). Downregulation of HLA Class I molecules in the tumour is associated with a poor prognosis in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* **99**(9), 1462–7.
- Montgomery E, Mamelak AJ, Gibson M, Maitra A, Sheikh S, Amr SS, Yang S, Brock M, Forastiere A, Zhang S, Murphy KM, Berg KD. (2006). Overexpression of claudin proteins in esophageal adenocarcinoma and its precursor lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **14**(1), 24–30.
- Oliveira SS & Morgado-Díaz JA. (2007). Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cell Mol Life Sci* **64**(1), 17–28.
- Osanai M, Takasawa A, Murata M, Sawada N. (2017). Claudins in cancer: bench to bedside. *Pflugers Arch* **469**(1), 55–67.
- Ouban A & Ahmed AA. (2010). Claudins in human cancer: a review. *Histol Histopathol* **25**(1), 83–90.
- Overgaard CE, Daugherty BL, Mitchell LA, Koval M. (2011). Claudins: control of barrier function and regulation in response to oxidant stress. *Antioxid Redox Signal* **15**(5), 1179–93.
- Patra CR, Bhattacharya R, Wang E, Katarya A, Lau JS, Dutta S, Muders M, Wang S, Buhrow SA, Safgren SL, Yaszemski MJ, Reid JM, Ames MM, Mukherjee P, Mukhopadhyay D. (2008). Targeted delivery of gemcitabine to pancreatic adenocarcinoma using cetuximab as a targeting agent. *Cancer Res* **68**(6), 1970–8.
- Pérez-Hernández M, Del Pino P, Mitchell SG, Moros M, Stepien G, Pelaz B, Parak WJ, Gálvez EM, Pardo J, La Fuente JM de. (2015). Dissecting the molecular mechanism of apoptosis during photothermal therapy using gold nanoprisms. *ACS Nano* **9**(1), 52–61.
- Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* **12**(5), R68.
- Protze J, Eichner M, Piontek A, Dinter S, Rossa J, Blecharz KG, Vajkoczy P, Piontek J, Krause G. (2015). Directed structural modification of *Clostridium perfringens* enterotoxin to enhance binding to claudin-5. *Cell Mol Life Sci* **72**(7), 1417–32.
- Qin Z & Bischof JC. (2012). Thermophysical and biological responses of gold nanoparticle laser heating. *Chem. Soc. Rev.* **41**(3), 1191–217.

- Rangel LBA, Agarwal R, D'Souza T, Pizer ES, Alò PL, Lancaster WD, Gregoire L, Schwartz DR, Cho KR, Morin PJ. (2003). Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res* **9**(7), 2567–75.
- Rau L-R, Huang W-Y, Liaw J-W, Tsai S-W. (2016). Photothermal effects of laser-activated surface plasmonic gold nanoparticles on the apoptosis and osteogenesis of osteoblast-like cells. *Int J Nanomedicine* **11**, 3461–73.
- Robertson SL, Smedley JG, Singh U, Chakrabarti G, van Itallie CM, Anderson JM, McClane BA. (2007). Compositional and stoichiometric analysis of Clostridium perfringens enterotoxin complexes in Caco-2 cells and claudin 4 fibroblast transfectants. *Cell Microbiol* **9**(11), 2734–55.
- Robertson SL, Smedley JG, McClane BA. (2010). Identification of a claudin-4 residue important for mediating the host cell binding and action of Clostridium perfringens enterotoxin. *Infect Immun* **78**(1), 505–17.
- Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Matsuhisa K, Takahashi A, Suzuki H, Kakamu Y, Watari A, Yagi K. (2010). A claudin-targeting molecule as an inhibitor of tumor metastasis. *J Pharmacol Exp Ther* **334**(2), 576–82.
- Saha S, Xiong X, Chakraborty PK, Shameer K, Arvizo RR, Kudgus RA, Dwivedi SKD, Hossen MN, Gillies EM, Robertson JD, Dudley JT, Urrutia RA, Postier RG, Bhattacharya R, Mukherjee P. (2016). Gold Nanoparticle Reprograms Pancreatic Tumor Microenvironment and Inhibits Tumor Growth. *ACS Nano* **10**(12), 10636–51.
- Saitoh Y, Suzuki H, Tani K, Nishikawa K, Irie K, Ogura Y, Tamura A, Tsukita S, Fujiyoshi Y. (2015). Tight junctions. Structural insight into tight junction disassembly by Clostridium perfringens enterotoxin. *Science* **347**(6223), 775–8.
- Salvador E, Burek M, Förster CY. (2016). Tight Junctions and the Tumor Microenvironment. *Curr Pathobiol Rep* **4**, 135–45.
- Santin AD, Cané S, Bellone S, Palmieri M, Siegel ER, Thomas M, Roman JJ, Burnett A, Cannon MJ, Pecorelli S. (2005). Treatment of chemotherapy-resistant human ovarian cancer xenografts in C.B-17/SCID mice by intraperitoneal administration of Clostridium perfringens enterotoxin. *Cancer Res* **65**(10), 4334–42.
- Schmidt TGM & Skerra A. (2007). The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *nprot* **2**(6), 1528–35.
- Schomaker M, Killian D, Willenbrock S, Heinemann D, Kalies S, Ngezahayo A, Nolte I, Ripken T, Junghanß C, Meyer H, Murua Escobar H, Heisterkamp A. (2015). Biophysical effects in off-resonant gold nanoparticle mediated (GNOME) laser transfection of cell lines, primary- and stem cells using fs laser pulses. *J Biophotonics* **8**(8), 646–58.
- Schomaker M, Heinemann D, Kalies S, Willenbrock S, Wagner S, Nolte I, Ripken T, Murua Escobar H, Meyer H, Heisterkamp A. (2015). Characterization of nanoparticle mediated laser transfection by femtosecond laser pulses for applications in molecular medicine. *J Nanobiotechnology* **13**, 10.

- Schumacher TN & Schreiber RD. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* **348**(6230), 69–74.
- Segawa K, Kurata S, Yanagihashi Y, Brummelkamp TR, Matsuda F, Nagata S. (2014). Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science* **344**(6188), 1164–8.
- Shi Y & Lammers T. (2019). Combining Nanomedicine and Immunotherapy. *Acc Chem Res* **52**(6), 1543–54.
- Shinoda T, Shinya N, Ito K, Ohsawa N, Terada T, Hirata K, Kawano Y, Yamamoto M, Kimura-Someya T, Yokoyama S, Shirouzu M. (2016). Structural basis for disruption of claudin assembly in tight junctions by an enterotoxin. *Sci Rep* **6**, 33632.
- Shrestha A & McClane BA. (2013). Human claudin-8 and -14 are receptors capable of conveying the cytotoxic effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *MBio* **4**(1).
- Shrestha A, Uzal FA, McClane BA. (2016). The interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with receptor claudins. *Anaerobe* **41**, 18–26.
- Singh U, Mitic LL, Wieckowski EU, Anderson JM, McClane BA. (2001). Comparative biochemical and immunocytochemical studies reveal differences in the effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin on polarized CaCo-2 cells versus Vero cells. *J Biol Chem* **276**(36), 33402–12.
- Singh P, Pandit S, Mokkalapati VRSS, Garg A, Ravikumar V, Mijakovic I. (2018). Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *Int J Mol Sci* **19**(7).
- Singh AB, Uppada SB, Dhawan P. (2017). Claudin proteins, outside-in signaling, and carcinogenesis. *Pflugers Arch* **469**(1), 69–75.
- Smedley JG, Uzal FA, McClane BA. (2007). Identification of a prepore large-complex stage in the mechanism of action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect Immun* **75**(5), 2381–90.
- Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S. (1999). *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *The Journal of Cell Biology* **147**(1), 195–204.
- Soundararajan R, Fradette JJ, Konen JM, Moulder S, Zhang X, Gibbons DL, Varadarajan N, Wistuba II, Tripathy D, Bernatchez C, Byers LA, Chang JT, Contreras A, Lim B, Parra ER, Roarty EB, Wang J, Yang F, Barton M, Rosen JM, Mani SA. (2019). Targeting the Interplay between Epithelial-to-Mesenchymal-Transition and the Immune System for Effective Immunotherapy. *Cancers (Basel)* **11**(5).
- Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. (2015). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom* **20**(2), 107–26.
- Stern JM, Stanfield J, Lotan Y, Park S, Hsieh J-T, Cadeddu JA. (2007). Efficacy of laser-activated gold nanoshells in ablating prostate cancer cells in vitro. *J Endourol* **21**(8), 939–43.

- Subbaiah VK, Kranjec C, Thomas M, Banks L. (2011). PDZ domains: the building blocks regulating tumorigenesis. *Biochem J* **439**(2), 195–205.
- Suzuki H, Tani K, Fujiyoshi Y. (2017). Crystal structures of claudins: insights into their intermolecular interactions. *Ann N Y Acad Sci* **1397**(1), 25–34.
- Tabariès S, Dupuy F, Dong Z, Monast A, Annis MG, Spicer J, Ferri LE, Omeroglu A, Basik M, Amir E, Clemons M, Siegel PM. (2012). Claudin-2 promotes breast cancer liver metastasis by facilitating tumor cell interactions with hepatocytes. *Mol Cell Biol* **32**(15), 2979–91.
- Tabariès S & Siegel PM. (2017). The role of claudins in cancer metastasis. *Oncogene* **36**(9), 1176–90.
- Tait SWG & Green DR. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(9), 621–32.
- Takahashi A, Kondoh M, Masuyama A, Fujii M, Mizuguchi H, Horiguchi Y, Watanabe Y. (2005). Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin in its interaction with claudin-4. *J Control Release* **108**(1), 56–62.
- Takahashi A, Komiya E, Kakutani H, Yoshida T, Fujii M, Horiguchi Y, Mizuguchi H, Tsutsumi Y, Tsunoda S-i, Koizumi N, Isoda K, Yagi K, Watanabe Y, Kondoh M. (2008). Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem Pharmacol* **75**(8), 1639–48.
- Takahashi A, Saito Y, Kondoh M, Matsushita K, Krug SM, Suzuki H, Tsujino H, Li X, Aoyama H, Matsuhisa K, Uno T, Fromm M, Hamakubo T, Yagi K. (2012). Creation and biochemical analysis of a broad-specific claudin binder. *Biomaterials* **33**(12), 3464–74.
- Takala H, Saarnio J, Wiik H, Soini Y. (2007). Claudins 1, 3, 4, 5 and 7 in esophageal cancer: loss of claudin 3 and 4 expression is associated with metastatic behavior. *APMIS* **115**(7), 838–47.
- Takehara M, Nishimura T, Mima S, Hoshino T, Mizushima T. (2009). Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells. *Biol Pharm Bull* **32**(5), 825–31.
- Thompson PD, Tipney H, Brass A, Noyes H, Kemp S, Naessens J, Tassabehji M. (2010). Claudin 13, a member of the claudin family regulated in mouse stress induced erythropoiesis. *PLoS ONE* **5**(9).
- Tokés A-M, Kulka J, Paku S, Szik A, Páska C, Novák PK, Szilák L, Kiss A, Bögi K, Schaff Z. (2005). Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res* **7**(2), R296-305.
- Toné S, Sugimoto K, Tanda K, Suda T, Uehira K, Kanouchi H, Samejima K, Minatogawa Y, Earnshaw WC. (2007). Three distinct stages of apoptotic nuclear condensation revealed by time-lapse imaging, biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis. *Exp Cell Res* **313**(16), 3635–44.
- Tong L, Zhao Y, Huff TB, Hansen MN, Wei A, Cheng J-X. (2007). Gold Nanorods Mediate Tumor Cell Death by Compromising Membrane Integrity. *Adv Mater Weinheim* **19**, 3136–41.

- Tsujimoto Y. (1997). Apoptosis and necrosis: intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death Differ* **4**(6), 429–34.
- Tulchinsky E, Demidov O, Kriajevska M, Barlev NA, Imyanitov E. (2019). EMT: A mechanism for escape from EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1871**(1), 29–39.
- Uchida H, Kondoh M, Hanada T, Takahashi A, Hamakubo T, Yagi K. (2010). A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide. *Biochem Pharmacol* **79**(10), 1437–44.
- Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* **126**(4), 741–54.
- Usami Y, Chiba H, Nakayama F, Ueda J, Matsuda Y, Sawada N, Komori T, Ito A, Yokozaki H. (2006). Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hum Pathol* **37**(5), 569–77.
- Uzal FA, Vidal JE, McClane BA, Gurjar AA. (2010). Clostridium Perfringens Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases. *Open Toxicology J* **2**, 24–42.
- van de Broek B, Devoogdt N, D'Hollander A, Gijs H-L, Jans K, Lagae L, Muylldermans S, Maes G, Borghs G. (2011). Specific cell targeting with nanobody conjugated branched gold nanoparticles for photothermal therapy. *ACS Nano* **5**(6), 4319–28.
- van Itallie CM & Anderson JM. (2014). Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin Cell Dev Biol* **36**, 157–65.
- van Itallie CM, Betts L, Smedley JG, McClane BA, Anderson JM. (2008). Structure of the claudin-binding domain of Clostridium perfringens enterotoxin. *J Biol Chem* **283**(1), 268–74.
- van Roy F. (2014). Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer* **14**(2), 121–34.
- Vermeulen K, van Bockstaele DR, Berneman ZN. (2005). Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Annals of Hematology* **84**(10), 627–39.
- Veshnyakova A, Piontek J, Protze J, Waziri N, Heise I, Krause G. (2012). Mechanism of Clostridium perfringens enterotoxin interaction with claudin-3/-4 protein suggests structural modifications of the toxin to target specific claudins. *J Biol Chem* **287**(3), 1698–708.
- Vines JB, Yoon J-H, Ryu N-E, Lim D-J, Park H. (2019). Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *Front Chem* **7**, 167.
- Wang YI, Abaci HE, Shuler ML. (2017). Microfluidic blood-brain barrier model provides in vivo-like barrier properties for drug permeability screening. *Biotechnol Bioeng* **114**(1), 184–94.
- Wieckowski EU, Wnek AP, McClane BA. (1994). Evidence that an approximately 50-kDa mammalian plasma membrane protein with receptor-like properties mediates the amphiphilicity of specifically bound Clostridium perfringens enterotoxin. *J Biol Chem* **269**(14), 10838–48.

- Will C, Fromm M, Müller D. (2008). Claudin tight junction proteins: novel aspects in paracellular transport. *Perit Dial Int* **28**(6), 577–84.
- Winkler L, Gehring C, Wenzel A, Müller SL, Piehl C, Krause G, Blasig IE, Piontek J. (2009). Molecular determinants of the interaction between *Clostridium perfringens* enterotoxin fragments and claudin-3. *J Biol Chem* **284**(28), 18863–72.
- Yao C, Rudnitski F, Hüttmann G, Zhang Z, Rahmzadeh R. (2017). Important factors for cell-membrane permeabilization by gold nanoparticles activated by nanosecond-laser irradiation. *Int J Nanomedicine* **12**, 5659–72.
- Yao Q, Cao S, Li C, Mengesha A, Low P, Kong B, Dai S, Wei M. (2010). Turn a diarrhoea toxin into a receptor-mediated therapy for a plethora of CLDN-4-overexpressing cancers. *Biochem Biophys Res Commun* **398**(3), 413–9.
- Yuan X, Lin X, Manorek G, Kanatani I, Cheung LH, Rosenblum MG, Howell SB. (2009). Recombinant CPE fused to tumor necrosis factor targets human ovarian cancer cells expressing the claudin-3 and claudin-4 receptors. *Mol Cancer Ther* **8**(7), 1906–15.
- Zhou P, Li B, Liu F, Zhang M, Wang Q, Liu Y, Yao Y, Li D. (2017). The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: implication for treatment resistance in pancreatic cancer. *Mol Cancer* **16**(1), 52.

Curriculum Vitae

Name: Annegret Becker

Geburtstag: 04.10.1986

Geburtsort: Jena

Berufstätigkeit

2015-2019 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Zellbiologie und Biophysik
Abteilung Zellphysiologie und Biophysik an der Leibniz Universität Hannover

2014 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Zellbiologie und Biophysik
Abteilung Zellphysiologie und Biophysik an der Leibniz Universität Hannover

Ausbildung

2014-2019 Promotion am Institut für Zellbiologie und Biophysik
Abteilung Zellphysiologie und Biophysik an der Leibniz Universität Hannover

2011-2014 Masterstudium der Pflanzenbiologie an der Leibniz Universität Hannover

Schwerpunkte: Molekularbiologie und Proteomik

Thema der Masterarbeit: Barrierefunktion von humanem zerebralem Endothel
im Vergleich zu humanem Darmepithel

2008-2011 Bachelorstudium der Pflanzenbiologie an der Leibniz Universität Hannover

Thema Bachelorarbeit: Etablierung der transepithelialen elektrischen
Widerstandsmessung

2008 Abitur am Gymnasium Brecht-Schule, Hamburg

Publikationsliste

- Becker A**, Lehrich T, Kalies S, Heisterkamp A, Ngezahayo A. (2019). Parameters for Optoperforation-Induced Killing of Cancer Cells Using Gold Nanoparticles Functionalized With the C-terminal Fragment of Clostridium Perfringens Enterotoxin. *Int J Mol Sci*, 20(17), 4248.
- Becker A**, Leskau M, Schlingmann-Molina BL, Hohmeier SC, Alnajjar S, Murua Escobar H, Ngezahayo A. (2018). Functionalization of gold-nanoparticles by the Clostridium perfringens enterotoxin C-terminus for tumor cell ablation using the gold nanoparticle-mediated laser perforation technique. *Sci Rep*, 8(1), 14963.
- Hammer SC, **Becker A**, Rateitschak K, Mohr A, Lüder Ripoli F, Hennecke S, Junginger J, Hewicker-Trautwein M, Brenig B, Ngezahayo A, Nolte I, Murua Escobar H. (2016). Longitudinal Claudin Gene Expression Analyses in Canine Mammary Tissues and Thereof Derived Primary Cultures and Cell Lines. *Int J Mol Sci*, 17(10).
- Blödown A, Begandt D, Bader A, **Becker A**, Burghard A, Kühne D, Kral A, Ngezahayo A. (2016). ATP-sensitive K⁺ channels (Kir6.1/SUR1) regulate gap junctional coupling in cochlear-supporting cells. *Pflugers Arch*, 468(7), 1215-1222.
- Becker A**, Bader A, Klett A, Hertrampf I. (2015). How Chemicals influence Cell Proliferation. Straightforward Cell Culture Monitoring using CASY TT. Omni Life Science GmbH & Co. KG, Application Note

Konferenzbeiträge

- Dierks A, Bader A, **Becker A**, Ngezahayo A. (2018). Regulation of Gap Junction Coupling in Large Intestine Epithelial Cells by Adenosine Signaling. Poster, Annual Meeting of the Europhysiology, London, GBR
- Becker A**, Hammer SC, Hertrampf I, Leskau M, Schlingmann-Molina BL, Murua Escobar H, Ngezahayo A. (2016). Targeting of claudin proteins for tumor cell killing. Poster, Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco (CA), USA
- Becker A**, Hertrampf I, Müller J, Ngezahayo A (2016). Decreased function of tight junctions enhances the gap junction coupling in intestinal epithelial cells. Poster, Annual Meeting of the Deutsche Physiologische Gesellschaft, Lübeck, Germany
- Becker A**, Hertrampf I, Müller J, Ngezahayo A. (2015). Reduction of tight junction integrity enhances gap junction coupling in intestinal epithelial cells. Poster, Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego (CA), USA

Danke an...

Alle Personen, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit begleitet, motiviert und unterstützt haben.

Meinen Doktorvater Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo für das spannende und herausfordernde Thema, sowie das in mich gesetzte Vertrauen und die fachliche Betreuung. Danke für die stets offene Tür, den Freiraum, die Unterstützung, Anregungen und wissenschaftlichen Diskussionen. Ich habe viel gelernt!

Korreferenten Prof. Dr. Alexander Heisterkamp für die freundliche und schnelle Zusage zur Begutachtung und Evaluierung meiner Dissertation sowie Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Übernahme des Prüfungsvorsitzenden.

Meine aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe. Ihr habt mich während meiner Promotion, jeder auf seine Weise, sehr unterstützt. Mit Euch wurde es nie langweilig. Die interessanten Gespräche und hitzigen Diskussionen während der Mittagspausen werden in Erinnerung bleiben. Heidi und Helma für Eure riesige Unterstützung im Labor (Ansetzen von Puffern, Praktikumsbetreuung, Bestellungen) und die Versorgung mit Kuchen und anderen Leckereien für des leibliche Wohl. Ebenfalls vielen lieben Dank Heidi für die unermüdliche Produktion des C-CPEs. Frederike für das „gute Zureden“ und für die kritische Durchsicht dieser Arbeit. Anne, unser „Großraumbüro“ und die damit verbundenen Unterhaltungen bleiben unvergessen. Auch außerhalb des Labors möchte ich dich nicht mehr missen. Almke für das Fachsimpel und den Austausch über neue TV-Serien. Patrik und Nadine für Euer offenes Ohr und fachlichen Beiträge bei dem alltäglichen „Arbeitswahnsinn“, sowie die spaßigen und abenteuerlichen Kongressreisen. Inken, Stephanie und Tina für Euren wertvollen Beitrag im Labor.

An die Yogagruppe für die fried- und liebevolle Atmosphäre jeden Donnerstagabend. Ihr habt mir neue Energie gegeben. Eure Gesellschaft war von unschätzbarem Wert.

Meinen Freunden für die zahlreichen Unternehmungen und den Zuspruch. Durch Euch konnte ich den Kopf freibekommen und neue Kraft tanken. Ihr standet an den wichtigen Kreuzungen.

Meine Eltern, meinem Bruder und Partner, die immer an mich geglaubt und bedingungslos unterstützt haben. Ihr seid der Wind unter meinen Flügeln.