

**Die funktionelle Rolle von LRP1  
in der tPA-vermittelten  
Aktivierung von NMDA Rezeptoren**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von

**Anne Martin**

geboren  
in Wiesbaden

Mainz, im Mai 2008

Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Die Familie der LDL-Lipoproteinrezeptoren.....	1
1.1.1.	Struktur, Aufbau und Funktionen des Lipoprotein Receptor-related Protein 1 .....	3
1.1.2.	Die Rolle von LRP1 in der neuronalen Signalweiterleitung.....	4
1.1.3.	Interaktion mit signalvermittelnden Adapterproteinen .....	6
1.2.	Signaltransduktion über Glutamatrezeptoren .....	8
1.2.1.	Die Familie der ionotropen Glutamatrezeptoren .....	8
1.2.2.	Der N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor (NMDAR).....	10
1.2.2.1.	Mechanismus des Calciumeinstroms.....	11
1.2.2.2.	Aktivierung intrazellulärer Kinasen.....	11
1.3.	Serinproteasen als molekulare Neurotransmitter .....	12
1.3.1.	Struktur, Aufbau und Funktionen des Tissue-type Plasminogen Activators.....	13
1.3.2.	tPA als Neuromodulator .....	15
1.4.	Zielsetzung der Arbeit.....	17
<b>2.</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>19</b>
2.1.	Chemikalien und Reagenzien .....	19
2.2.	Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	21
<b>3.</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>24</b>
3.1.	Zellbiologische Methoden.....	24
3.1.1.	Zellkultur .....	24
3.1.1.1.	Kultivierung immortalisierter Zellen .....	24
3.1.1.2.	Präparation und Kultivierung primärer hippokampaler Neurone .....	25
3.1.2.	Transfektionen.....	27
3.1.2.1.	Plasmid-DNA .....	27
3.1.2.2.	RNA Interferenz.....	28
3.1.2.2.1.	small hairpin RNA (shRNA).....	29
3.1.2.2.2.	small interfering RNA (siRNA).....	29

---

<b>3.2.</b>	<b>Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.1.</b>	<b>Bakterientransformationen.....</b>	<b>31</b>
3.2.1.1.	Isolierung von Plasmid-DNA .....	31
3.2.1.2.	Expression und Aufreinigung von GST-Proteinen .....	31
<b>3.3.</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.1.</b>	<b>Stimulation der Zellen .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.2.</b>	<b>Zellyse und Proteinbestimmung .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3.3.</b>	<b>Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3.4.</b>	<b>Western Blot .....</b>	<b>35</b>
<b>3.3.5.</b>	<b>Immunologischer Nachweis von Zielproteinen .....</b>	<b>36</b>
<b>3.4.</b>	<b>Physiologische Methoden.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4.1.</b>	<b>Calcium Messung .....</b>	<b>37</b>
3.4.1.1.	Konfokale Lasermikroskopie .....	38
3.4.1.2.	Fluoreszenzmessung .....	38
<b>3.4.2.</b>	<b>Glutamat Messung .....</b>	<b>39</b>
<b>3.5.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>39</b>
<b>3.5.1.</b>	<b>Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....</b>	<b>39</b>
<b>3.5.2.</b>	<b>Analytische DNA Agarose Gelelektrophorese.....</b>	<b>40</b>
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1.</b>	<b>Spezifische Aktivierung der Erk1/2 Kinasen durch tPA in neuronalen Zellen.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.</b>	<b>Blockade der Erk1/2 Phosphorylierung durch RAP .....</b>	<b>43</b>
<b>4.3.</b>	<b>Identifizierung von LRP1 als Hauptrezeptor für die tPA-vermittelte Erk1/2 Aktivierung .....</b>	<b>45</b>
<b>4.4.</b>	<b>Beteiligung von NMDA Rezeptoren an der tPA-induzierten MAP Kinasen Aktivierung .....</b>	<b>46</b>
4.4.1.	Blockade durch MK-801, ein Kanalöffnungsblocker .....	46
4.4.2.	Blockade durch DL-AP5, ein kompetitiver Antagonist.....	47
<b>4.5.</b>	<b>Die Rolle von LRP1 und NMDA Rezeptoren im tPA-vermittelten <i>Calcium Signaling</i>.....</b>	<b>48</b>

---

4.6.	Die Bedeutung von Glutamat in der tPA-vermittelten Signaltransduktion .....	51
4.7.	PSD-95 als funktionelles Bindeglied zwischen LRP1 und dem NMDA Rezeptor .....	52
4.7.1.	Überexpression von PSD-95 und einzelnen PDZ-Domänen .....	53
4.7.2.	<i>Knock-down</i> von Adapterproteinen PSD-95, SHC1 und FE65.....	55
4.8.	Identifizierung der distalen NPxY Dömane der intrazellulären LRP1 $\beta$ -Kette als Vermittlerin der tPA-induzierten Signaltransduktionskaskade .....	56
5.	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>58</b>
5.1.	Die Beteiligung von LRP1 und dem NMDA Rezeptor in der tPA-induzierten Signaltransduktion .....	61
5.1.1.	Aktivierung der MAP Kinasenkaskade .....	61
5.1.2.	Induktion des Calciumeinstroms .....	62
5.2.	Charakterisierung der Brücke zwischen LRP1 und dem NMDA Rezeptor .....	64
5.3.	Das komplexe Zusammenspiel von LRP1 und dem NMDA Rezeptor – Kann ein Lipoproteinrezeptor einen Calciumkanal öffnen? .....	67
5.4.	Die Bedeutung des Einsatzes von tPA unter physiologischen und pathophysiologischen Gesichtspunkten .....	69
6.	<b>AUSBLICK</b> .....	<b>71</b>
7.	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>72</b>
8.	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>73</b>
9.	<b>ANHANG</b> .....	<b>87</b>
9.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	89

<b>9.2.</b>	<b>Vektorkarten.....</b>	<b>91</b>
<b>9.3.</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>92</b>
<b>9.4.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>93</b>
<b>9.5.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>94</b>
<b>9.6.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>95</b>

# 1. Einleitung

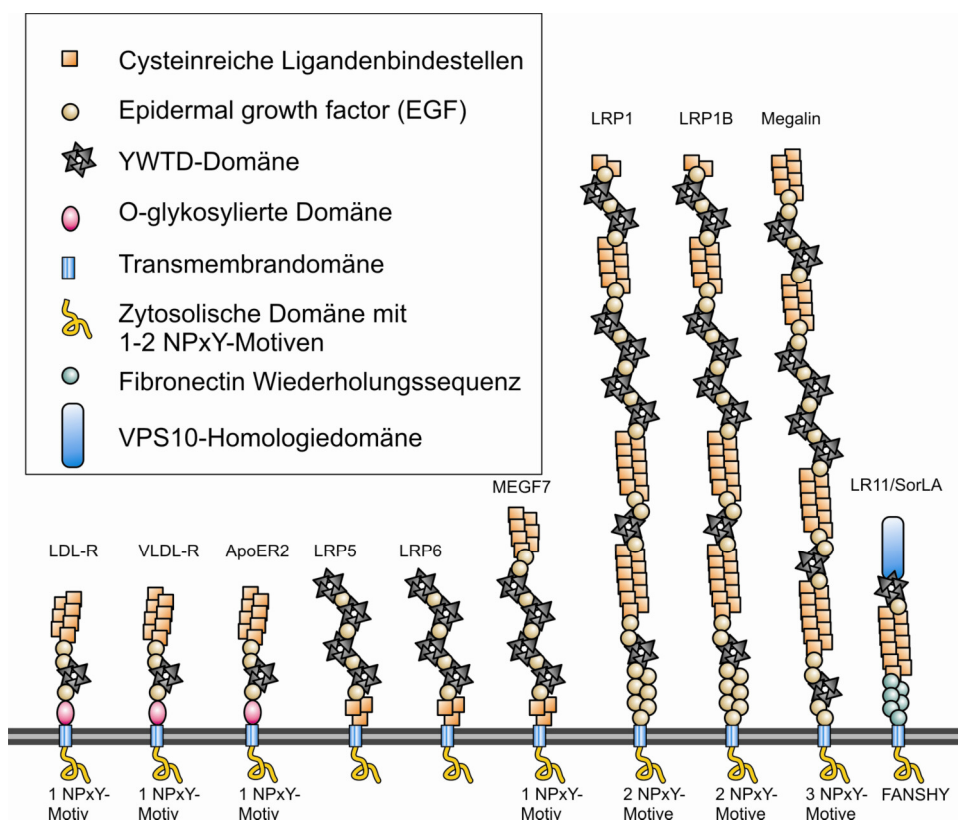
## 1.1. Die Familie der LDL-Lipoproteinrezeptoren

Lipoproteinrezeptoren sind membrangebundene Oberflächenrezeptoren, die spezifische, extrazelluläre Liganden erkennen, binden und über Endozytose in die Zelle aufnehmen können.

Die LDL (*low density lipoprotein*) Rezeptor Genfamilie der Säugetiere umfasst sieben strukturverwandte Oberflächenproteine, welche diverse biologische Funktionen in verschiedenen Zelltypen und Organen erfüllen (Abb. 1). Der zuerst identifizierte und somit namensgebende Rezeptor dieser Familie ist der LDL Rezeptor, der vorwiegend in der Leber für die Regulation der Cholesterinhomöostase durch rezeptorvermittelte Endozytose von cholesterinreichen Lipoproteinpartikeln (LDL-Partikel) verantwortlich ist und somit eine zentrale Rolle im Lipidstoffwechsel einnimmt (Brown and Goldstein 1986). Ursprünglich wurde diese Funktion auch den anderen Mitgliedern dieser evolutionär konservierten Genfamilie zugeschrieben, jedoch ist mittlerweile klar, dass deren Funktionen sich nicht nur auf die Endozytose von Lipoproteinen beschränken (May and Herz 2003). Für ApoER2 und den VLDL Rezeptor ist bekannt, dass sie nicht in der Leber exprimiert werden (Herz and Bock 2002), sondern hauptsächlich in Neuronen als Signalrezeptoren für Reelin die neuronale Migration während der embryonalen Entwicklung des Gehirns regulieren und daher für die Embryogenese von immenser Bedeutung sind (Novak et al. 1996; Tissir and Goffinet 2003). LRP1, das strukturverwandte LRP1b und Megalin (LRP2) stellen die größten Proteine der Familie dar. LRP1 wurde ursprünglich nur als Endozytoserezeptor für Chylomikronen angesehen (Rohlmann et al. 1998), LRP1b wurde als letztes entdeckt und scheint in vivo als Tumorsuppressorgen zu fungieren (Liu et al. 2000). Megalin, der strukturgrößte Rezeptor der Familie, ist im Wesentlichen als Endozytose- und Transportrezeptor in der Niere bekannt (Nykjaer et al. 1999), aber Megalin-defekte Mäuse weisen auch auf eine wichtige Funktion dieses Rezeptors in der Entwicklung des Vorderhirns hin (Willnow et al. 1996a). Über MEGF7, ebenso bekannt als LRP4, ist bis dato noch nicht viel bekannt, aber er könnte ähnlich ApoER2 und VLDL an zellulären Signalwegen beteiligt sein (Herz and Bock 2002). Eine Zusammenstellung der verschiedenen biologischen Funktionen dieser Kernrezeptoren findet sich im Anhang, Tabelle 9. Alle sieben Kernrezeptoren weisen fünf Strukturmerkmale in unterschiedlicher Anzahl, aber festgelegter Reihenfolge auf, die sie als zentrale Kernproteine dieser Genfamilie charakterisieren:

Zum einen sind dies cysteinreiche Wiederholungssequenzen in den Ligandenbindungsdomänen, gefolgt von propellerähnlichen  $\beta$ -Faltblattstrukturen

aus YWTD-Domänen (Jeon et al. 2001), die von cysteinreichen EGF-ähnlichen Wiederholungssequenzen flankiert werden. Weiterhin sind sie gekennzeichnet durch eine einzelne Transmembrandomäne, an die sich intrazellulär ein zytoplasmatischer C-Terminus mit bis zu drei NPxY Motiven anschließt. Dabei stehen N, P und Y für die entsprechenden Aminosäuren Asparagin, Prolin und Tyrosin; das x kann durch eine beliebige Aminosäure ersetzt werden (Krieger and Herz 1994; Willnow 1999a; Herz et al. 2000). Jenes Tyrosin ist von zentraler Bedeutung für die Einleitung von Signaltransduktionswegen, da es von Kinasen phosphoryliert und anschließend von intrazellulären Adapterproteinen gebunden werden kann (Barnes et al. 2001; Boucher et al. 2002; Loukinova et al. 2002).



**Abb. 1: Die Familie der LDL Rezeptoren** (verändert aus Herz und Bock, Annu. Rev. Biochem., 2002)

Neben den sieben Kernproteinen gibt es noch weitere Proteine, die zwar strukturelle Ähnlichkeiten, aber nicht alle fünf Strukturmerkmale auf einmal aufweisen und deshalb per Definition aus der Kerngruppe der LDL Rezeptorfamilie ausgeschlossen werden. Man kann sie jedoch als „entfernte Verwandte“ betrachten. Zu ihnen gehören LRP5, LRP6 und LR11 (auch als SorLA bekannt). Erstere fungieren als Co-Rezeptoren im kanonischen *Wnt-Signaling*, welches in der Embryonalentwicklung von Bedeutung ist (Pinson et al. 2000; Tamai et al. 2000). SorLA hingegen enthält eine zusätzliche VPS10 Domäne, die als Andockstation von dem Liganden *head activator* erkannt und gebunden wird,



wodurch in neuronalen und neuroendokrinen Vorläuferzellen der Eintritt in die Mitose und Proliferation induziert wird (Lintzel et al. 2002; Bohm et al. 2006).

### 1.1.1. Struktur, Aufbau und Funktionen des Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1)

LRP1 wurde als zweites Mitglied der LDL-Rezeptor Genfamilie identifiziert (Herz et al. 1988) und wird von einer Vielzahl an Zelltypen exprimiert (Moestrup et al. 1992). Am höchsten ist die Expressionsrate jedoch in der Leber und im Gehirn (Herz et al. 1988; Bu et al. 1994b).

Nach seiner Synthese im Endoplasmatischen Reticulum (ER) wird dieses Typ I transmembrane Glykoprotein mit einer Größe von 600kDa im trans-Golgi Netzwerk von der Protease Furin in zwei Untereinheiten geschnitten (Abb. 2). Die 515 kDa große, extrazelluläre  $\alpha$ -Kette und die 85kDa große  $\beta$ -Kette bleiben jedoch an der Zellmembran nicht-kovalent miteinander assoziiert (Herz et al. 1990; Willnow et al. 1996b). Die  $\alpha$ -Kette enthält vier Ligandenbindungsdomänen, welche als Andockstellen für mehr als 40 verschiedene Liganden (s. Anhang Tabelle 8) dienen können und so die funktionelle Vielfalt des Rezeptors ausmachen (Moestrup et al. 1993; Willnow et al. 1994; Lillis et al. 2005). In vitro Versuche ergaben jedoch, dass die meisten Liganden an die Domänen II und IV binden (Neels et al. 1999; Strickland and Ranganathan 2003). Einige der wichtigsten LRP1 Liganden sind aktiviertes  $\alpha_2$ -Macroglobulin ( $\alpha_2M^*$ ), ApoE, PDGF und tPA. Über rezeptorvermittelte Endozytose ist LRP1 für die Aufnahme seiner Liganden verantwortlich, wird anschließend selbst recycelt und wieder an die Zelloberfläche zurückgebracht.

Am intrazellulären C-Terminus der  $\beta$ -Kette befinden sich zwei NPxY Motive und ein mit dem distalen NPxY Motiv überlappendes YxxL Modul, welches hauptsächlich für die Endozytose des Rezeptors verantwortlich zu sein scheint (Li et al. 2000). Die beiden NPxY Motive dagegen können mit zytoplasmatischen Adapterproteinen wie FE65, PSD-95 und Shc (Gotthardt et al. 2000) interagieren, jedoch meist erst nach Tyrosinphosphorylierung im NPxY Motiv durch z.B. Src Kinasen (Barnes et al. 2003) oder Proteinkinase A (Li et al. 2001).

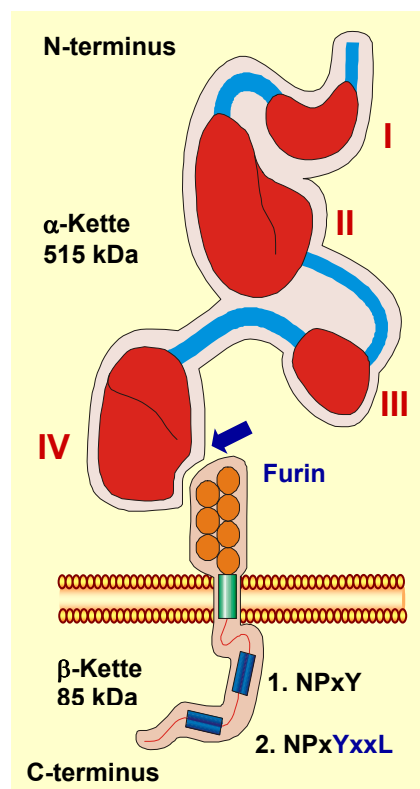


Abb. 2: Die Struktur von LRP1.

LRP1 spielt neben seiner zuerst entdeckten Funktion als *scavenger receptor* für Chylomikronenpartikel (Rohmann et al. 1998) und  $\alpha_2M^*$ -Rezeptor (Strickland et al. 1990; Makarova et al. 2004) ebenso eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proteaseaktivitäten (Kristensen et al. 1990; Strickland et al. 1990; Bu et al. 1992), Entstehung von Atherosklerose (Boucher et al. 2003), dem Toxinmetabolismus (Kounnas et al. 1992) und der Prozessierung des Amyloid Precursor Proteins (APP) in der Alzheimer'schen Erkrankung (Kounnas et al. 1995; Guenette et al. 1996; Ulery and Strickland 2000; Pietrzik et al. 2002). Die Wichtigkeit von LRP1 in der Embryogenese erkannte man erst bei dem Versuch, konventionelle LRP1<sup>-/-</sup> *knock-out* Mäuse herzustellen. Homozygote, LRP1-defiziente Mäuse wiesen eine frühembryonale Letalität auf, welche die molekulare Analyse LRP1-regulierter Prozesse erheblich behinderten (Herz et al. 1992; Herz et al. 1993). In Neuronen wird es überwiegend am Zellkörper und in Dendriten exprimiert. Erst die Entwicklung konditioneller, gewebespezifischer LRP1 *knock-outs* in der Leber (Rohmann et al. 1998) und differenzierten Neuronen (May et al. 2004) führte zu weiteren Erkenntnissen über die Bedeutung von LRP1 jenseits seiner ursprünglichen Funktion als Endozytoserezeptor.

### 1.1.2. Die Rolle von LRP1 in der neuronalen Signalweiterleitung

Die frühembryonale Letalität der LRP1 *knock-out* Mäuse erbrachte detaillierte Einblicke in die Rolle des Rezeptors bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems und wies ihm eine bedeutende Funktion in der neuronalen Signalweiterleitung zu. LRP1-defiziente Tiere weisen massive neurologische Störungen auf, die zu Muskeltremor, Ataxie, Hyperaktivität, Kachexie und frühzeitigem Tod führen (May et al. 2004).

Mehr und mehr Studien erbrachten Hinweise darauf, dass LRP1 im Gehirn an der Regulation von Calciumströmen beteiligt sein könnte. Bacskai konnte zeigen, dass  $\alpha_2M^*$ -induzierter Calciuminflux durch den NMDA Rezeptor mit RAP, dem Rezeptor-assoziierten Protein, geblockt werden kann (Bacskai et al. 2000). RAP ist ursprünglich ein Chaperon, das im Endoplasmatischen Reticulum für die korrekte Faltung der LDL-Rezeptoren verantwortlich ist und die vorzeitige Assoziation mit Liganden im ER verhindern soll. Fügt man es exogen zu, inhibiert es jegliche Ligandenbindung an alle Rezeptoren der LDL-Rezeptor Genfamilie an der Zellmembran (Willnow et al. 1996c). Eine andere Studie beobachtete zudem, dass LRP1 den Calciuminflux in Neuronen auch nach Stimulation mit NMDA, einem synthetischen Glutamat analogon, regulieren kann (Qiu et al. 2002).

Weitere Erkenntnisse über die Rolle von LRP1 in der Neurotransmission kamen durch die Entdeckung in *yeast two-hybrid screens*, dass der LRP1 C-Terminus mit PSD-95 interagieren kann (Gotthardt et al. 2000). PSD-95 (*post synaptic density*

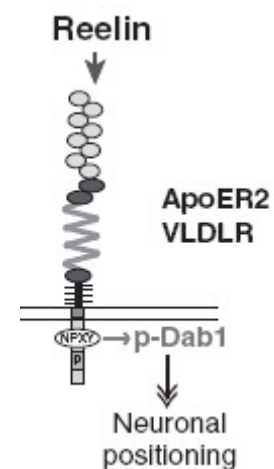
*protein*) ist ein intrazelluläres Gerüstprotein, welches an der Formation hochmolekularer Proteinkomplexe in der postsynaptischen *density* (PSD) beteiligt und auch als Adapterprotein für den NMDA Rezeptor bekannt ist (Husi and Grant 2001). Die PSD ist gekennzeichnet durch eine Verdickung der postsynaptischen Membran, in der sich zahlreiche Glutamatrezeptoren und damit verbundene, membranständige Signalproteine angereichert haben, um das Signal des aus der Präsynapse ausgeschütteten Glutamats aufzufangen und postsynaptisch weiterzuleiten (Sheng 2001b).

Unterstützend konnte May in Immunpräzipitationen nachweisen, dass LRP1 sowohl mit PSD-95 als auch mit den Untereinheiten 2A und 2B des NMDA Rezeptors co-präzipitiert (May et al. 2004). Das Vorhandensein eines solchen trimeren Komplexes aus LRP1, PSD-95 und NMDA Rezeptor wurde zwar oft postuliert, konnte aber bisher nicht durch funktionelle Studien bekräftigt werden.

LRP1 wird auch eine Rolle als Vermittler der L-LTP (*late phase long-term potentiation*) zugeschrieben, die eines der besten Modelle für die Untersuchung der Gedächtnisformation im Hippokampus darstellt (Nicoll and Malenka 1995) und von der wiederholten Stimulation mehrerer Synapsen eines postsynaptischen Neurons abhängig ist. Es wird vermutet, dass der Effekt von tPA auf die L-LTP und der damit einhergehenden synaptischen Plastizität in hippocampalen Hirnschnitten durch LRP1 vermittelt wird, da er mit RAP blockiert werden kann (Zhuo et al. 2000).

Die Einleitung von Signaltransduktionskaskaden erfordert zunächst einen externen Stimulus, der an einen Membranrezeptor bindet, diesen aktiviert und somit das Signal über die Zellmembran ins Zytosol weitergibt. Dort stellen intrazelluläre, membranständige Adapterproteine die Verknüpfung mit Effektorproteinen her, welche über Phosphorylierungen weitere Proteine aktivieren und das Signal somit in den Zellkern transferieren.

Signaltransduktionen über LDL-Rezeptoren sind am besten in ApoER2 und VLDLR untersucht (Abb. 3). Beide Rezeptoren werden extrazellulär von Reelin als Ligand gebunden und vermitteln ihr Signal über die Anschaltung des Disabled-1 (Dab1) Adapterproteins, welches zuvor von Src-Familienkinasen (SFK's) an einem Tyrosinrest phosphoryliert werden muß, um aktiviert zu werden (Trommsdorff et al. 1999; Bock and Herz 2003). Tyrosinphosphorylierungen konnten auch im LRP1 C-Terminus durch externe Bindung von PDGF-BB und interne c-Src Kinasenaktivität beobachtet werden



**Abb. 3: Reelin-vermittelte Signaltransduktion**  
(aus Stolt und Bock, Cellular Signalling, 2006).

(Loukinova et al. 2002) und stellen einen zentralen Schritt in der Aktivierung des Rezeptors dar. Abhängig davon, welcher Ligand gebunden wird, können neben Src Kinasen auch MEKK/JNK/c-Jun Kinasen und Ras/MAP Kinasen von LRP1 moduliert werden (Lutz et al. 2002; Harris-White and Frautschy 2005). Die Beobachtung, dass der LRP1 C-Terminus nach tPA-Bindung ebenso eine sofortige Tyrosinphosphorylierung erfährt, bestärkt seine Funktion als Signaltransmitter in tPA-vermittelten Transduktionskaskaden (Hu et al. 2006).

### 1.1.3. Interaktion mit signalvermittelnden Adapterproteinen

Im Hinblick auf seine Funktion im zentralen Nervensystem (ZNS) sind für LRP1 mehrere zytoplasmatische Adapterproteine bekannt, die an den C-Terminus der  $\beta$ -Kette binden und verschiedene Signaltransduktionskaskaden auslösen können. Einige der wichtigsten sind in Tabelle 1 aufgelistet, und drei von ihnen sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

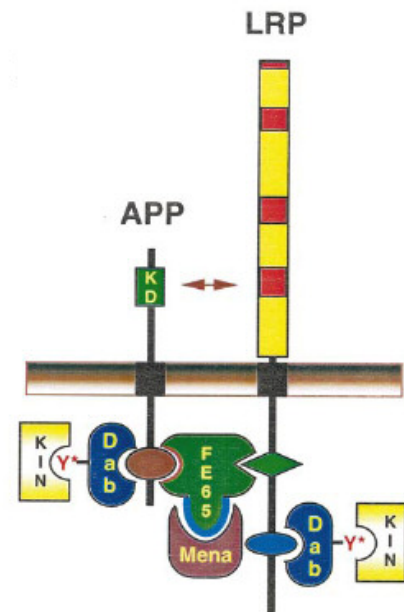
Adapterprotein	Funktion	Referenz
JNK	Aktivierung von c-Jun und Elk1	(Otto et al. 2000)
JIP	zytosolisches Adapterprotein, das JNK bindet	(Lutz et al. 2002)
MEKK-1	JNK Aktivierungskaskade	(Lutz et al. 2002)
MAPKK4	JNK Aktivierungskaskade	(Lutz et al. 2002)
Dab1	Aktivierung von Src Kinasen und PI3K	(Trommsdorff et al. 1998)
<b>FE65</b>	Verknüpfung von LRP1 und APP	(Trommsdorff et al. 1998)
<b>Shc</b>	Aktivierung der Ras und c-myc Kaskade	(Yun et al. 2003)
<b>PSD-95</b>	Verknüpfung von NMDAR und LRP1, Organisation von Komponenten der post-synaptischen Neurotransmissionsmaschinerie in funktionelle Mikrodomänen	(Gotthardt et al. 2000)

**Tabelle 1: Potentielle LRP1 Adapterproteine und ihre Funktionen im ZNS** (aus Harris-White und Frautschy, Current Drug Targets, 2005).

Alle Adapterproteine, die an den zytoplasmatischen Schwanz von LRP1 binden, zeichnen sich durch mindestens eine PID (*protein interaction domain*) aus. Diese kann eine Phosphotyrosinbindedomäne (PTB) oder eine PDZ-Domäne (PSD-95/Dlg/ ZO-1 Homologiedomäne) sein.

**FE65** ist ein multimodulares Adapterprotein, das aminoterminal eine WW-Domäne und carboxyterminal zwei PTB-Domänen besitzt. Wie Abbildung 4 zu entnehmen ist, kann es mit PTB1 an die erste NPxY Domäne von LRP1 und mit PTB2 gleichzeitig an die NPxY Domäne von APP binden.

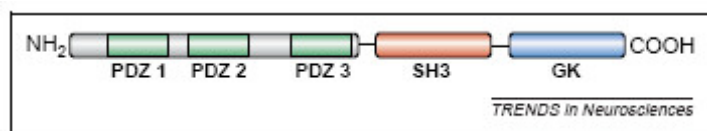
Die Verknüpfung von LRP1 mit APP über FE65 ist von besonderer Bedeutung, da LRP1 die Prozessierung von APP und somit auch die Generation von A $\beta$  beeinflussen kann, welches sich in Form von Plaques im Gehirn von Alzheimer Patienten ablagert und dadurch in hohem Maße an der Entstehung der Krankheit beteiligt ist (Fiore et al. 1995; Pietrzik et al. 2004). FE65 kann durch seine PID-Domänen noch eine Vielzahl anderer Proteine binden und dadurch Einfluss nehmen auf Genexpression, Zellzyklusprogression, Plasmamembrandynamik und Gedächtnisformation (Hu et al. 2005).



**Abb. 4: Interaktion von APP und LRP1 über FE65** (aus Trommsdorff et al.. JBC. 1998).

**PSD-95** ist ein vielseitiges Adapterprotein, das aus drei PDZ-Domänen, einer Src Homologie 3 Domäne (SH3) und einer Guanylatkinase-Domäne (GK) besteht (Abb. 5). Es kommt hauptsächlich in Verdickungen der Postsynapse (PSD) vor und ist an der Formation hochmolekularer Proteinkomplexe beteiligt. Diese beinhaltet die Verknüpfung von verschiedenen Molekülen, z.B. der neuronalen NO Synthase (nNOS) mit NMDA Rezeptoren (Cao et al. 2005) und verankert diese mit dem postsynaptischen Zytoskelett (Sheng and Pak 2000). PDZ-Domänen sind modulare Proteindomänen von ca. 90 Aminosäuren, die auf die Bindung von spezifischen C-terminalen

Peptidsequenzen spezialisiert sind. Die Interaktion von PSD-95 mit der NR2 Untereinheit des NMDA Rezeptors erfolgt über eine konservierte ESDV



**Abb. 5: Schematischer Aufbau von PSD-95** (aus Roche, Trends in Neurosciences, 2004).

oder ESEV Sequenz im intrazellulären C-Terminus und ist wichtig für die Anordnung der NMDA Rezeptoren in der PSD (Steigerwald et al. 2000; Sheng 2001a) und der Verkupplung mit zytoplasmatischen Signaltransduktionswegen (Sprengel et al. 1998). *Yeast two-hybrid* Studien zeigten auch eine Verbindung zwischen LRP1 und PSD-95 auf (Gotthardt et al. 2000) und bestärken seine Rolle

als neuronaler Modulator der Postsynapse. Die potentielle Interaktion von LRP1 mit diesen drei Komponenten der zytosolischen Signaltransduktionsmaschinerie lassen einen biochemischen Mechanismus vermuten, durch welchen LRP1-Liganden ihr Signal in die Zelle transferieren und so weitere zelluläre Prozesse modulieren können.

**Shc** ist ein Adapterprotein mit nur einer N-terminalen PTB-Domäne, das LRP1 mit dem Ras/MAP Kinase oder c-myc Signaltransduktionsweg verbinden kann (Ravichandran 2001). Im Gegensatz zu anderen PTB-Domänenhaltigen Adapterproteinen bindet Shc nur an das Tyrosin der zweiten NPxY Domäne von LRP1, wenn dieses vorher phosphoryliert wurde (Stolt and Bock 2006). Die Phosphorylierung selbst kann durch Src Kinasen erfolgen, welche das NPxY Motiv somit in eine Bindestelle für Shc umwandeln (Barnes et al. 2001). Außer an LRP1 kann Shc ebenfalls an die phosphorylierte NPxY Domäne des EGF-Rezeptors binden und ist dadurch an der Weiterleitung des EGF-Signals zur ras-Signaltransduktionskaskade beteiligt (Rozakis-Adcock et al. 1992). Ein weiterer Rezeptor, der von Shc gebunden werden kann, ist der TGF- $\beta$  Rezeptor (T $\beta$ RI). Nach Aktivierung durch seinen Liganden TGF- $\beta$  kommt es zur Rekrutierung von ShcA, welches durch die intrinsische Tyrosin- und Serin/Threonin-Kinase Aktivität des TGF- $\beta$  Rezeptors an Tyrosin- und Serinresten phosphoryliert wird. Nachfolgende Assoziation mit den Adaptorproteinen Grb2 und Sos führt zu einer Aktivierung des MAP Kinase Signalweges (Lee et al. 2007).

## **1.2. Signaltransduktion über Glutamatrezeptoren**

Im ZNS gibt es zwei Gruppen von Rezeptoren, die beide vom excitatorischen Neurotransmitter L-Glutamat aktiviert werden können und sowohl für die basale synaptische Transmission als auch für die synaptische Plastizität, welche zu Lernvorgängen und Gedächtnisbildung führt, verantwortlich sind (Haberny et al. 2002). Man unterscheidet zwischen ligandengesteuerten, ionotropen und G-Protein-gekoppelten, metabotropen Glutamatrezeptoren.

### **1.2.1. Die Familie der ionotropen Glutamatrezeptoren**

Die Familie der ionotropen Glutamatrezeptoren lässt sich in drei Gruppen einteilen, die NMDA Rezeptoren, die AMPA Rezeptoren und die Kainat Rezeptoren (Hollmann and Heinemann 1994).

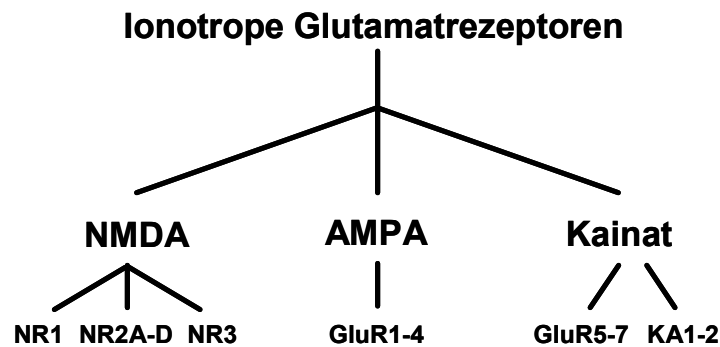


Abb. 6: Die Familie der ionotropen Glutamatrezeptoren.

Die beiden Letzteren werden auch als Non-NMDA-Glutamatrezeptoren bezeichnet, da sie sich, außer von Glutamat, nicht von der synthetischen Aminosäure N-Methyl-D-Aspartat (NMDA), sondern nur von  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure (AMPA) oder Kainat erregen lassen (Dingledine et al. 1999). Jeder Rezeptor setzt sich aus 4-5 Untereinheiten zusammen, die eine funktionelle Pore für den Durchlass von geladenen  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bilden, welche zu einer Depolarisation der postsynaptischen Plasmamembran und Generation eines Aktionspotentials führen.

Für den NMDA Rezeptor sind drei Genfamilien bekannt, welche für die einzelnen Untereinheiten NR1, NR2A-D und NR3 des Rezeptors codieren (Cull-Candy et al. 2001).

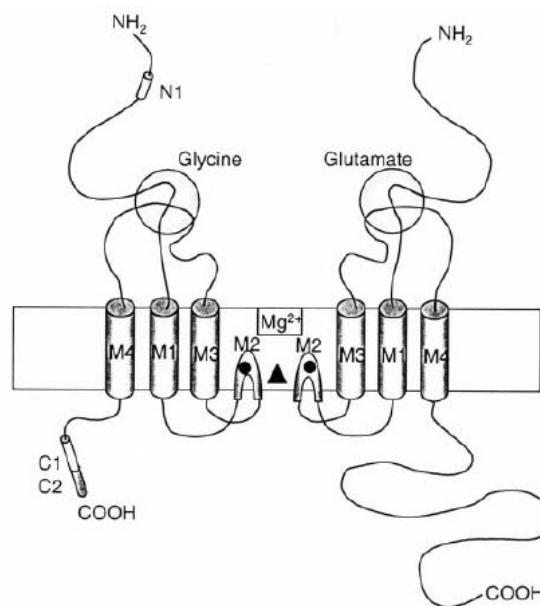


Abb. 7: Die Transmembrandomänen am Beispiel der NR1+2 (aus Stephenson, Current Drug Targets, 2001).

Zwei Genfamilien codieren für die Untereinheiten des Kainat Rezeptors (GluR5-7 und KA1-2) und eine Genfamilie für die des AMPA Rezeptors (GluR1-4) (Haberny et al. 2002).

Die jeweiligen Untereinheiten der drei ionotropen Glutamatrezeptoren sind strukturell sehr ähnlich aufgebaut und durch vier hydrophobe Transmembrandomänen (M1-4, Abb. 7) gekennzeichnet, von denen sich die Zweite (M2) nicht komplett durch die Membran zieht, sondern eine Rückwärtsschleife bildet und die Innenseite der Pore kontrolliert. Dies führt dazu, dass die große Schleife zwischen der dritten (M3) und vierten Domäne (M4) nicht wie bei anderen ligandengesteuerten Ionenkanälen intrazellulär sondern extrazellulär liegt und zusammen mit einem Teil des N-Terminus die Bindestelle für den Co-Agonisten Glycin bildet.

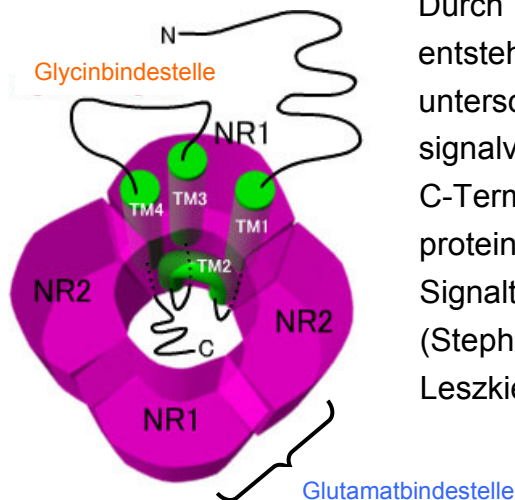
### **1.2.2. Der N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor (NMDAR)**

NMDA Rezeptoren sind an einer Vielzahl synaptischer Transmissionen beteiligt, sei es an der aktivitätsabhängigen synaptischen Plastizität oder an der Entwicklung des prä- und postnatalen ZNS, welche Zelldifferenzierung, axonales Wachstum aber auch Neuronendegeneration durch exzessive NMDA Rezeptoraktivierung beinhaltet (Lalonde and Joyal 1993; Haberny et al. 2002). Sie werden ubiquitär im ZNS exprimiert und finden sich gebündelt an postsynaptischen Dendriten in PSD's wieder (Sheng 2001a, 2001b). Ein für NMDA Rezeptoren spezifisches Merkmal ist, dass sie erst dann aktiviert werden können, wenn zusätzlich zum L-Glutamat auch der Co-Agonist Glycin gebunden hat (Erreger et al. 2004). Da nur die NR1 Untereinheit die Bindestelle für den Co-Agonisten Glycin besitzt, ist sie obligatorisch für einen funktionellen Rezeptor (Hirai et al. 1996).

In der Regel werden zwei NR1 Module mit zwei NR2 Modulen co-exprimiert und zu einem tetrameren Rezeptor zusammengesetzt (Furukawa et al. 2005). Dabei wird die Glutamatbindestelle von NR1 und NR2 gemeinsam gebildet, weshalb ein funktioneller Rezeptor nur mit der Expression beider Untereinheiten gewährleistet ist (Laube et al. 1997; Anson et al. 1998).

Durch die Anordnung der Transmembrandomänen wird eine Pore gebildet, die zunächst durch ein Magnesiumion geblockt und nach Rezeptoraktivierung für Calciumionen durchlässig wird (Abb. 8).





**Abb. 8: Aufsicht auf die Pore des NMDA Rezeptors**

(<http://park12.wakwak.com/~pharma1/textbook/Receptors/nmda-recep.html>)

Durch Variation der NR2A-D Untereinheiten entsteht eine Rezeptordiversität mit unterschiedlichen elektrophysiologischen und signalvermittelnden Eigenschaften, da deren C-Termini verschiedene zytosolische Adapterproteine binden, die jeweils verschiedene Signaltransduktionswege anschalten können (Stephenson 2001; Cull-Candy and Leszkiewicz 2004). Die NR3 Untereinheit wird hauptsächlich in frühen Entwicklungsstadien exprimiert und nimmt nur eine modulatorische Funktion ein, indem sie z.B. die Öffnungszeiten und die Leitfähigkeit

des Kanals herabsetzen kann (Das et al. 1998; Perez-Otano et al. 2001).

### 1.2.2.1. Mechanismus des Calciumeinstroms

Befindet sich die postsynaptische Nervenzelle im Ruhezustand, sind NMDA Rezeptoren inaktiv und durch Magnesiumionen in der Pore geblockt. Um den Kanal zu öffnen, muss der spannungsgesteuerte Magnesiumblock durch eine leichte Membrandepolarisation aufgehoben werden, bevor das Glutamat binden und die Öffnung des Kanals bewirken kann. Somit arbeitet der NMDA Rezeptor wie ein Koinzidenzdetektor, der die Aktivität der postsynaptischen Zelle mit der Freisetzung eines Neurotransmitters aus der präsynaptischen Zelle, ausgelöst durch einen tetanischen Stimulus, korreliert (Cull-Candy et al. 2001). Die Aufhebung des Magnesiumblocks in Kombination mit der Bindung des Agonisten Glutamat führt anschließend zum Calciuminflux durch den offenen Kanal mit anschließender Aktivierung Calcium-vermittelter Signalkaskaden (Chen et al. 2007).

### 1.2.2.2. Aktivierung intrazellulärer Kinasen

Wie bereits in 1.1.2. erwähnt, reguliert der C-terminale Schwanz der NMDA Rezeptor Untereinheiten die Interaktionen mit zytosolischen Adapterproteinen, welche den Rezeptor mit unterschiedlichen Signalwegen verknüpfen können. NR2B beispielsweise interagiert spezifisch mit dem Protein SynGAP, welches RasGTPasen aktivieren kann und inhibierend auf NMDA Rezeptor-vermittelte Erk1/2 Aktivierung wirkt (Kim et al. 2005). Dagegen postuliert Pawlak, dass die tPA-induzierte, erhöhte Expression und Aktivierung von NR2B Rezeptoren bei chronischem Alkoholabusus die Erk1/2 Phosphorylierung triggert und zu verstärkten Anfällen führt (Pawlak et al. 2005). In einer anderen Studie konnte

beobachtet werden, dass NR2A und B Untereinheiten mit unterschiedlichen Affinitäten an die aktivierte Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) binden, was zu unterschiedlichen Formen der synaptischen Plastizität führt (Strack and Colbran 1998; Barria and Malinow 2005). Im Hinblick auf eine Induktion der L-LTP schlägt Zhuo ein Modell vor, in dem der Calciuminflux durch den NMDA Rezeptor eine postsynaptische Signalkaskade auslöst, die die Generierung von cAMP als *second messenger* durch die Adenylatzyklase beinhaltet. cAMP kann dann die Protein Kinase A (PKA) aktivieren, welche im Gegenzug diverse intrazelluläre Signalwege anschalten kann, die zur Transkription neuer Gene führen (Zhuo et al. 2000). Interessanterweise konnte in einem anderen Modellsystem neben der NMDA Rezeptor-vermittelten Aktivierung der PKA ebenfalls eine Beteiligung von G-Proteinen, der PKC und MEK in der Phosphorylierung der Erk1/2 Kinase gezeigt werden. Jedoch ist zu beachten, dass die Aktivierung des Rezeptors in einem Fall von tPA (Medina et al. 2005), im anderen Fall von Glutamat induziert wurde (Jiang et al. 2000). Abschließend ist zu erwähnen, dass posttranslationale Phosphorylierungen an den C-Termini ionotroper NMDA Rezeptor Untereinheiten ähnlich denen der LDL Rezeptoren zur Rekrutierung intrazellulärer Adapterproteine, z.B. PSD-95, führen kann und einen Schlüsselmechanismus für die Regulation der Kanalfunktion darstellt (Chung et al. 2004; Lee 2006; Chen et al. 2007).

Somit deutet eine Vielzahl von Beobachtungen darauf hin, dass ein durch tPA oder Glutamat aktivierter NMDA Rezeptor eine Anschaltung des Erk1/2 Kinase Signalweges bewirken kann. Der genaue Mechanismus dahinter ist jedoch noch ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

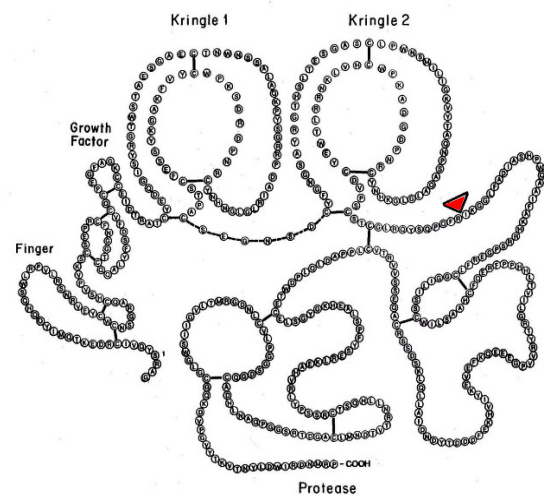
### **1.3. Serinproteasen als molekulare Neurotransmitter**

Serinproteasen sind hauptsächlich an der Regulation der Fibrinolyse und der Degradation der extrazellulären Matrix beteiligt. Daher kommen sie in großen Mengen im Blut und in peripheren Geweben vor. In den letzten Jahren gab es mehr und mehr Studien darüber, dass Serinproteasen wie Tissue-type Plasminogen Activator (tPA), Thrombin oder Neuropsin neben ihren proteolytischen Fähigkeiten auch Schlüsselrollen in physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen im Gehirn besitzen (Tomimatsu et al. 2002). Viele Serinproteasen werden in der Tat von Neuronen im ZNS exprimiert (Davies et al. 1998). Dabei ist tPA von allen die am intensivsten untersuchte Protease im Gehirn, da sie aufgrund ihrer thrombolytischen Funktion im Blut das einzige, von der Zulassungsbehörde freigegebene Medikament zur Behandlung von akutem, ischämischen Schlaganfall ist. Das tPA/Plasminogen System scheint neben der

Degradation von Fibringerinnseln auch eine wichtige Rolle bei Lernvorgängen und Gedächtnisbildung (Baranes et al. 1998; Pawlak et al. 2002), Stress (Pawlak et al. 2003), neuronaler Degeneration (Tsirka et al. 1995), Alkoholabusus (Pawlak et al. 2005) und der Alzheimer'schen Erkrankung (Melchor et al. 2003) zu spielen. Im Folgenden soll die Protease tPA näher beschrieben und im Zusammenhang mit LRP1 und dem NMDA Rezeptor dargestellt werden.

### 1.3.1. Struktur, Aufbau und Funktionen des Tissue-type Plasminogen Activators (tPA)

Der Tissue-type Plasminogen Aktivator (tPA) ist zusammen mit uPA, dem Urokinase-type Plasminogen Aktivator, in Wirbeltieren über die Anschaltung einer proteolytischen Kaskade für die Degradation von Blutgerinnseln im Blutgefäßsystem und peripheren Gewebe verantwortlich (Collen 1999). Diese Serinproteasen besitzen, wie der Name vermuten lässt, einen Serinrest im aktiven Zentrum, welches die enzymatische Aktivität der Protease ausmacht. tPA setzt sich aus mehreren Domänen zusammen: zwei Kringle-Domänen, eine Growth Factor-Domäne und eine Finger-Domäne (Abb. 9),



**Abb. 9: Struktur von tPA**  
(aus [www.bioweb.uwlax.edu](http://www.bioweb.uwlax.edu))

welche die Bindestellen für die Substrate oder einen Rezeptor darstellen. Die Finger-Domäne wird von Fibrin am Blutgerinnsel gebunden und führt zur Aktivierung von tPA. Sie kann aber auch an den extrazellulären Rezeptor Annexin II binden und damit Mikrogliaaktivierung einleiten (Siao and Tsirka 2002). Für die Kringel 2-Domäne ist kürzlich beschrieben worden, dass sie die Interaktion mit der NR1 Untereinheit des NMDA Rezeptor bewirkt. Daraufhin werde dieser von der katalytischen Domäne geschnitten, was zu einer Potenzierung NMDA-induzierter Toxizität führen soll (Lopez-Atalaya et al. 2008). Wie bereits beschrieben ist tPA allein oder als Komplex mit seinem Inhibitor PAI-1 ein Hauptligand für LRP1, welches deren Enzymaktivität im extrazellulären Raum durch rezeptorvermittelte Endozytose beenden kann und somit auch deren Halbwertszeit bestimmt. Diese beträgt für frei zirkulierendes tPA nur 5-8min (Orth et al. 1994; Chandler et al. 1997).

Die enzymatische Reaktion von tPA im Blutgerinnsel erfolgt erst dann, wenn es über seine Fingerdomäne an Fibrin gebunden hat. Die nachfolgende Spaltung des Zymogens Plasminogen in die aktive Protease Plasmin durch tPA geschieht somit an Ort und Stelle und läuft nach folgendem Schema ab (Abb. 10):

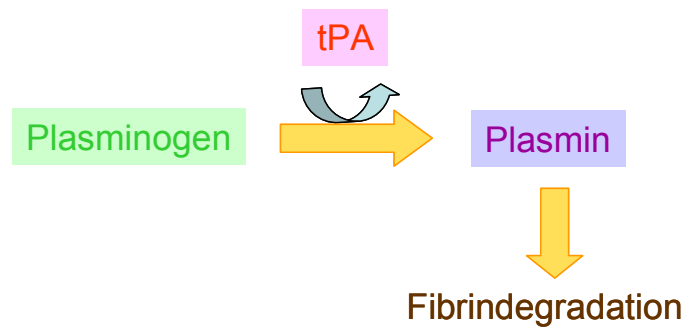


Abb. 10: Die proteolytische tPA-Plasminogen-Kaskade.

Ist das Plasmin erst einmal aktiviert, kann es unzählige Fibringerinnsel degradieren und somit das verstopfte Blutgefäß wieder durchlässig machen (Sheehan and Tsirka 2005).

Aufgrund dieser thrombolytischen Funktion wird tPA (z.B. Actilyse<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim) in der Praxis zur Behandlung von Patienten mit akutem Herzinfarkt oder Schlaganfall eingesetzt. Leider beträgt das Zeitfenster, in dem tPA appliziert werden muss, um für den Patienten eine Symptomverbesserung zu erlangen, nur drei Stunden nach Beginn des Schlaganfalls (Qureshi 1996). Da der Startpunkt jedoch in vielen Fällen nicht genau bestimmt werden kann, ist dies der limitierende Faktor bei der Behandlung der Patienten. tPA kann nicht nur protektiv wirken, sondern auch zu Nebenwirkungen führen, die den Krankheitsverlauf des Patienten verschlechtern. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn das Zeitfenster von drei Stunden bereits unwissentlich überschritten wurde und durch die Gabe von tPA aus einem ischämischen Hirninfarkt eine zerebrale Hämorrhagie (Hirnblutung) entsteht. Dieser Vorgang wird auch hämorrhagische Transformation genannt (Hommel et al. 1995) und führt in den meisten Fällen zu einer enormen Verschlechterung des Krankheitsverlaufs, oft bedingt durch einen tPA-vermittelten Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (Yepes et al. 2003; Benchenane et al. 2005; Parathath et al. 2006).

tPA besitzt jedoch nicht nur Funktionen innerhalb des Blutgefäßsystems, sondern auch in peripheren Geweben. Als Protease, die aus neuronalen Speichern exozytiert wird, nimmt sie z.B. an der proteolytischen Remodellierung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen teil, die einen wichtigen Prozess im Rahmen der Generation der synaptischen Plastizität darstellen (Samson and Medcalf 2006). Auch wird es von Neuronen während des Auswachsens neuer Neurite als proteolytischer Regulator sezerniert (Monard 1988; Seeds et al. 1990).

Zusätzlich kann tPA bei der Antwort auf eine akute Inflammation eine wichtige Rolle spielen, indem es in Kombination mit LRP1 und PAI-1 die Migration von

Makrophagen an und die Adhäsion am Ort der Entzündung moduliert (Cao et al. 2006).

Jüngste Studien zeigten, dass das tPA-Plasminogen-System nicht nur auf seine proteolytische Aktivität beschränkt ist, sondern auch als neue Komponente in der neuronalen Signalweiterleitung auftritt (Fernandez-Monreal et al. 2004b), was im folgenden Kapitel beleuchtet werden soll.

### 1.3.2. tPA als Neuromodulator

*In vivo* wird tPA sowohl von Neuronen als auch von Mikrogliazellen verschiedener Hirnareale exprimiert (Teesalu et al. 2004). Die Bedeutung von tPA als positiver Neuromodulator wurde bereits vor 15 Jahren postuliert, als man entdeckte, dass tPA eines der frühen Gene war, welches durch neuronale Aktivität, insbesondere LTP, induziert wurde (Qian et al. 1993). Umgekehrt konnte man in transgenen Mäusen, die tPA in post-natalen Neuronen konstitutiv überexprimieren, zeigen, dass diese eine erhöhte und anhaltende LTP und ein besseres Orientierungsvermögen im Morris Water Maze Test aufwiesen (Madani et al. 1999). Bei diesem Test werden Mäuse in einen runden Behälter mit trübem Wasser und einer versteckten Plattform gesetzt und beobachtet, wie lange sie brauchen, um schwimmend die Plattform zu erreichen. Der reziproke Zusammenhang zwischen tPA und LTP wurde zudem durch die Beobachtung bestätigt, dass tPA-defiziente Mäuse (tPA<sup>-/-</sup>) tatsächlich eine verminderte L-LTP zeigen, was Voraussetzung für die Formation des Gedächtnisses ist (Carmeliet et al. 1994; Nicoll and Malenka 1995). Auch die proteolytische Aktivität von tPA kann zur synaptischen Plastizität beitragen, indem es z.B. die *precursor*-Form vom *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (proBDNF) in die reife Form (BDNF) umwandelt, welches nach Zugabe zu hippokampalen Hirnschnitten tPA-defizienter Mäuse die verminderte LTP wiederherstellen kann (Pang et al. 2004b). Unklar war bislang, über welchen Mechanismus tPA die LTP in hippokampalen Neuronen induziert. Erst die Untersuchungen von Zhuo konnten belegen, dass diese Induktion über die Bindung an LRP1 vermittelt wird und die Aktivierung des cAMP/PKA Signalweges involviert ist (Zhuo et al. 2000).

Andere Studien postulieren, dass die tPA-induzierte LTP nicht über LRP1, sondern über den NMDA Rezeptor vermittelt wird, indem tPA sich direkt an die NR1 Untereinheit anlagert, diese proteolytisch an einem Argininrest spaltet, wodurch es zu einem verstärkten NMDA-induzierten Calciumeinstrom mit nachfolgender Neurodegeneration kommt (Nicole et al. 2001). Diese direkte Spaltung von NR1 durch tPA konnte aber in zwei voneinander unabhängigen Studien nicht beobachtet werden (Matys and Strickland 2003; Liu et al. 2004) und eine Erklärung, wie die Abspaltung eines N-terminalen Fragmentes von der NR1 Untereinheit zu einem verstärkten Calciumeinstrom führen soll, steht noch aus.

Eine von der proteolytischen Aktivität des tPA unabhängige, aber dennoch über den NMDA Rezeptor-vermittelte Signaltransduktionskaskade wurde von Medina beschrieben. Durch Stimulation primärer hippocampaler Neurone mit tPA wurde eine plasmin-unabhängige Erk1/2 Aktivierung eingeleitet, die jedoch mit dem spezifischen NMDA Rezeptor Inhibitor MK-801 werden konnte und somit die Beteiligung des Glutamaterezeptors betätigte. Die tPA-induzierte Aktivierung des Erk1/2 Signalweges führte *downstream* zu GSK3-Aktivierung, tau-Hyperphosphorylierung, Mikrotubuli-Destabilisierung und Apoptose (Medina et al. 2005). Dies sind Erscheinungen, welche eng mit der Alzheimer'schen Erkrankung assoziiert sind und tPA neben seiner neuroprotektiven auch eine neurotoxische Funktion zuweisen. Trotzdem darf nicht vernachlässigt werden, dass tPA über die proteolytische Degradation von A $\beta$  auch die Anreicherung von A $\beta$ -Plaques mit nachfolgender Neurodegeneration im Gehirn vermindern kann (Melchor et al. 2003). Obwohl der genaue Mechanismus, wie tPA die NMDA Rezeptor Aktivierung bewirkt, kontrovers diskutiert wird, wird eine generelle Beteiligung von tPA in der Modulation der NMDA Rezeptor Funktionen nicht angezweifelt (Pang and Lu 2004a).

Ein weitere toxische Eigenschaft von tPA besteht darin, dass es im Gehirn Matrixmetalloproteinasen (MMP's) anschalten kann, welche Zell-Matrix-Interaktionen unterbrechen, die Degradation der extrazellulären Matrix einleiten und somit zu einem Zusammenbruch der Bluthirnschranke führen können (Asahi et al. 2001). Besonders MMP-9 wird nach tPA Applikation *in vitro* und *in vivo* verstärkt exprimiert, was die zerebralen Blutungen bei Schlaganfallpatienten erklären könnte. RNAi Experimente zeigten schließlich, dass die Hochregulation von MMP-9 über den Rezeptor LRP1 vermittelt wird (Wang et al. 2003). Die tPA- und LRP1-vermittelte Induktion von MMP-9 konnte aber nicht nur im Gehirn, sondern auch in interstitiellen Nierenfibroblasten nachgewiesen werden und beinhaltet die Aktivierung des Erk1/2 Signaltransduktionsweges (Hu et al. 2006). Somit scheint tPA wie ein Zytokin zu funktionieren, das über einen membranständigen Rezeptor sowohl im ZNS als auch in anderen Organen Signaltransduktionskaskaden auslösen kann, die entweder neuroprotektiv oder neurotoxisch wirken und dieser Serinprotease eine höchst komplexe, bivalente Funktion verleihen.

## 1.4. Zielsetzung der Arbeit

Aus immunzytochemischen Studien in hippokampalen Neuronen ist bekannt, dass LRP1 und der NMDA Rezeptor in postsynaptischen Verdickungen der neuronalen Membran co-existieren (May et al. 2004). Bezüglich der Bindung von tPA gibt es jedoch unterschiedliche Ansichten: manche Gruppen postulieren eine direkte Bindung von tPA an seinen Hauptrezeptor LRP1 (Zhuo et al. 2000), andere dagegen eine Bindung an den NMDA Rezeptor (Nicole et al. 2001). Je nachdem, welcher Rezeptor gebunden wird, kann tPA auch verschiedene Signaltransduktionskaskaden einleiten. Zhuo konnte zeigen, dass die Interaktion von tPA mit LRP1 eine cAMP-vermittelte Signaltransduktion auslöst, die an der Induktion der L-LTP beteiligt ist (Abb. 11). Diese scheint definitiv über den Lipoproteinrezeptor zu wirken, da der Effekt mit RAP blockiert werden konnte.

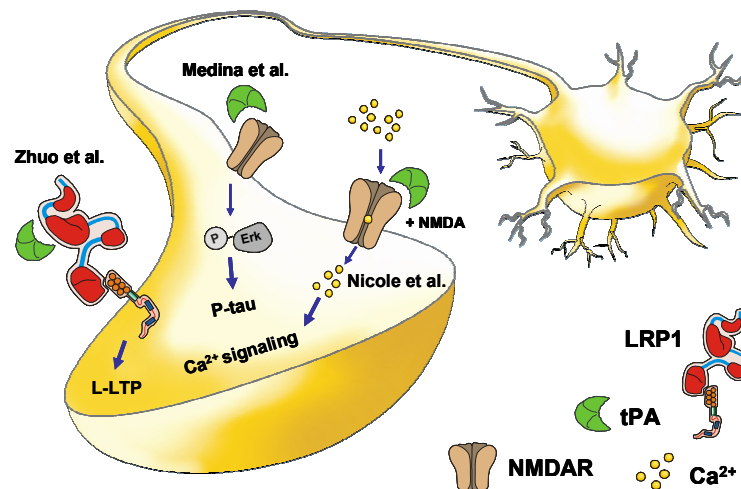
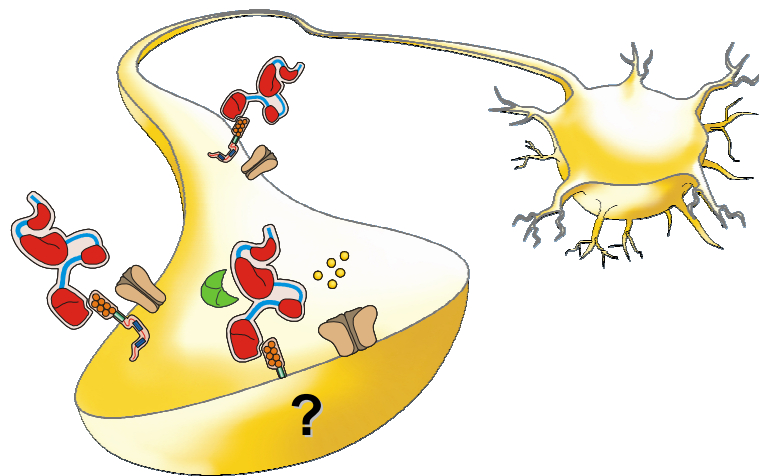


Abb. 11: Vereinfachte Darstellung der potentiellen tPA Funktionen in einer Nervenzelle.

Die Arbeitsgruppe um Medina jedoch postulierte eine tPA-vermittelte Signaltransduktionskaskade, die über die Aktivierung von NMDA Rezeptoren zu einer Phosphorylierung von MAP Kinasen (Erk1/2) und letztendlich durch GSK3 Aktivierung zu einer übermäßigen tau-Phosphorylierung mit anschließender Apoptose führt (Medina et al. 2005). Letztere Effekte weisen tPA somit eine Funktion in der Alzheimer'schen Erkrankung zu, was sich auch in Co-Lokalisationen von tPA mit Amyloid- $\beta$ -reichen Plaques und phospho-tau in Hirnschnitten von Alzheimer Patienten widerspiegelt. Eine andere Gruppe schlägt sogar einen proteolytischen Einfluss von tPA auf den NMDA Rezeptor vor, wobei dieser nach Bindung von tPA an der N-terminalen Domäne geschnitten und in Kombination mit NMDA zu einem potenzierten Calciumeinstrom in die Zelle führen soll. All diese Hypothesen implizieren, dass jene beiden Rezeptor-vermittelten

Transduktionskaskaden unabhängig voneinander entstehen und nebeneinander existieren. Da jedoch einerseits LRP1 der Hauptrezeptor für tPA ist und andererseits ein NMDA Rezeptor-vermittelter Calciumeinstrom beobachtet werden konnte, besteht das Ziel dieser Arbeit darin zu untersuchen, ob diese beiden Rezeptoren vielleicht als multimerer Komplex in der tPA-vermittelten Signaltransduktion zusammenarbeiten. Falls eine Kooperation nachgewiesen werden kann, soll die Funktionsweise des entstandenen Komplexes näher charakterisiert werden (Abb. 12).



**Abb. 12: Arbeitshypothese: Das Zusammenwirken von LRP1 und dem NMDA Rezeptor in der tPA-vermittelten NMDA Rezeptoraktivierung.**



## 2. Material

### 2.1. Chemikalien und Reagenzien

$\alpha$ -MEM	Lonza, Verviers, Belgien
Accugel Acrylamid 40% (29:1)/Bisacrylamid	Nat. Diagnostics, Hesse Hull
Actilyse <sup>®</sup>	Boehringer Ingelheim
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Ampicilin	Sigma, Deisenhofen
B-27 Supplement	Gibco Paisley, Schottland
Bacto-Agar	BD Biosciences, Pont de Claix
Bacto-Trypton	BD Biosciences, Pont de Claix
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
BSA (Bovine Serum Albumin)	Pierce, Bonn
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
Calcium Green <sup>TM</sup> -1 AM	Molecular Probes, Niederlande
DL-AP5	Sigma, Deisenhofen
DMEM	Lonza, Verviers, Belgien
DMSO	Roth, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Entwicklerlösung RD-90	Fujifilm, Belgien
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ficoll <sup>TM</sup> PM400	Sigma, Deisenhofen
Fixierungslösung	Fujifilm, Belgien
Fötale Kälberserum (FBS)	Gibco Paisley, Schottland
Gentamicin	Gibco Paisley, Schottland
Glucose	Sigma, Deisenhofen
Glutamax	Gibco Paisley, Schottland
Glutamin	Gibco Paisley, Schottland
Glutathion	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HBSS	Gibco Paisley, Schottland
	PAA, Linz

---

Hefeextrakt	Sigma, Deisenhofen
HEPES	Serva, Heidelberg
Igepal (NP-40)	Sigma, Deisenhofen
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Ralphs, Kalifornien
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
MK-801	Sigma, Deisenhofen
N-Lauroylsarcosine	Sigma, Deisenhofen
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat (Na-DOC)	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyruvat	Gibco Paisley, Schottland
Neurobasal Medium	Gibco Paisley, Schottland
PBS	Gibco Paisley, Schottland
Penicillin/Streptomycin	Lonza, Verviers, Belgien
PhosSTOP	Roche, Mannheim
Pluronic F-127	Molecular Probes, Niederlande
Poly-L-Ornithin	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Protease Inhibitor complete	Roche, Mannheim
Rinderalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	BioRad, München
stPA reinst	Biopur, Bubendorf, Schweiz
SuperSignal <sup>®</sup>	Pierce, Rockford, USA
TEMED	BioRad, München
Tris	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	Gibco Paisley, Schottland
Tween <sup>®</sup> 20	Sigma, Deisenhofen
U0126	Calbiochem, Darmstadt

Standards:

Biotinylierte Protein Leiter	NEB, Frankfurt
2-log 100bp DNA-Leiter	NEB, Frankfurt

Kits:

Amplex Red Kit	Molecular Probes, Netherlands
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Bonn
Jet Star 2.0 Plasmid Maxi-Prep Kit	Genomed, Bad Oeyenhausen
One-Step RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal Entwicklerlösung	Pierce, Bonn

**2.2. Verbrauchsmaterialien und Geräte**Materialien:

CL-XPosure™ Röntgenfilme	Pierce, Rockford, USA
D-Tube™ Dialyzer Tubes	Novagen, Darmstadt
Einweghandschuhe semperguard	Semperit, Wien
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebekulturflaschen 25 und 75cm <sup>2</sup>	TPP, Trasadingen, Schweiz
Gewebekulturschalen (Ø 3cm, 6cm, 10cm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Glaspipetten 1ml-20ml	VWR, Darmstadt
Kryoröhrchen	Apogent, Wiesbaden
Mikrotest Platten 96-well	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulose-Membran Protran	Schleicher & Schuell, Dassel
Parafilm®	American National Can™, Greenwich, USA
Pipettenspitzen 10µl-1ml	Starlab, Ahrensburg
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,0ml	Eppendorf, Hamburg
sterile Plastikröhrchen 15ml	Greiner, Nürtingen
sterile Plastikröhrchen 50ml	Sarstedt, Braunschweig
Sterilfilter, Minisart, 0,2mm Nitrocellulose	Sartorius, Göttingen
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen	TPP, Trasadingen, Schweiz

Geräte:

Gelelektrophorese System Agagel Mini	BioRad, München
Geldokumentation Intas Gel Imager	INTAS, Göttingen
Autoklav 2540 EL	Tuttnauer Systec, Wetttenberg
CO <sub>2</sub> - Brutschränke	New Brunswick, Edison, USA

Erlenmeyerkolben	Heraeus, Hanau
Flachbettschüttler Rocky 3D	Schott, Mainz
Gefrier- und Kühlschränke	Fröbel Labortechnik, Lindau
	-80°C Heraeus
	-20°C Liebherr
	+4°C Liebherr
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Konfokalmikroskop BX51WI	Olympus, Hamburg
Krypton/Argon Laser	Laser Physics, Cheshire
LAS 3000	FujiFilm, Fuji, Japan
Lichtmikroskope	OLYMPUS, Hamburg
	Zeiss, Göttingen
Magnetrührer RCT	IKA, Staufen
Mikrotiterplatten-Lesegerät Anthos HT III	ThermoLabsystems, Egelsbach
Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite F200	Tecan, Crailsheim
Mikrowelle	micromaxx,
Mini PROTEAN <sup>®</sup> 3 Cell System	BioRad, München
Mini Trans Blot <sup>®</sup> Cell Blotting System	BioRad, München
Multiscan RC Thermo	Labsystems, Finnland
Nipkov System QLC 10	Visitech, Sunderland
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
pH-Meter	inoLab, Weilheim
Pipetten 1 µl-1 ml	Gilson, Limburg-Offheim
Pipettierhilfe accu-jet	VWR, Darmstadt
Power Pac 300	BioRad, München
Röntgenfilm-Entwickler Hyperprocessor	Amersham, Freiburg
Schweißgerät vacufix electronic	Petra, Burgau
Sterilbank SterilGrad	Nunc, Wiesbaden
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Ultraschallstab	Bandelin Electronic, Berlin
UV-Photometer GeneRay	Biometra, Göttingen
Vortex-Genie 2 <sup>™</sup>	Bender & Hobein AG, Zürich
Waagen	Sartorius BL150S
	Mettler PL1200, AE160
Wasserbad GFL1086	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Hettich Mikro200R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Hettich Universal 32	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Sorvall RC5B	Kendro, Langenselbold

Software:

Anthos

ThermoLabsystems, Egelsbach

Icontrol

Tecan, Crailsheim

Metamorph

Molecular Devices Corporation,  
Downington, USA

## 3. Methoden

### 3.1. Zellbiologische Methoden

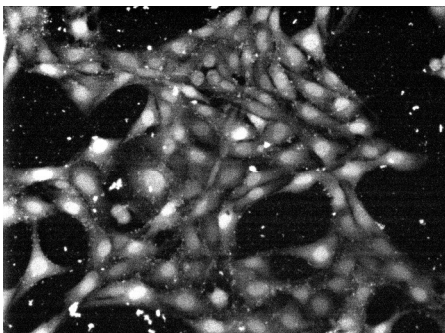
#### 3.1.1. Zellkultur

##### 3.1.1.1. Kultivierung immortalisierter Zellen

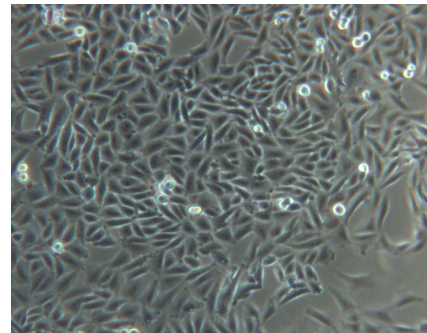
Die immortalisierte Zelllinie HT22 ist ein Subklon der murinen Zelllinie HT4 und wurde erstmals von Morimoto und Koshland beschrieben (Morimoto and Koshland 1990). Die Zellen stammen ursprünglich aus dem Hippokampus und besitzen daher neuronale Eigenschaften. Die Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) Zellen sind epithelial abgeleitete Zellen aus einem weiblichen Hamsterovar.

Alle Zellen wurden in sterilen 6cm Schalen in einem mit 5% CO<sub>2</sub> gesättigten Inkubator bei 37°C in DMEM Komplettmedium kultiviert. Nach Erreichen einer 90-100%igen Konfluenz wurden die Zellen zum Weiterpassagieren mit 5ml PBS gewaschen und so lange trypsinisiert, bis sie sich vom Boden ablösten. Die Zellsuspension wurde in 5ml frischem Medium aufgenommen, vereinzelt und abzentrifugiert, um das überschüssige Trypsin zu entfernen. Das Zellpelllet wurde in 5ml frischem Medium resuspendiert und entweder in einer bestimmten Zellzahl für Versuche ausgesät oder in einem Verhältnis von 1:10-1:20 in eine frische Kulturschale vereinzelt. Für *Calcium Imaging* Experimente wurden die HT22 Zellen entweder auf autoklavierten, runden Deckgläschen in 4cm Schalen oder in 96-wells ausgesät.

Zur langfristigen Konservierung von immortalisierten Zellen wurde das Zellpellet nach der Trypsinisierung in 2ml Einfriermedium resuspendiert, sofort in Kryoboxen bei -80°C weggefroren und am nächsten Tag zur weiteren Aufbewahrung in Flüssigstickstoff gelagert.



Hippokampale murine  
HT22 Zellen



Chinese Hamster Ovary  
CHO-K1 Epithelzellen

DMEM Kompletmedium für HT22:

DMEM inkl. Phenolrot

10% (v/v) aktives fötales Kälberserum (FKS)

1mM MEM Natrium Pyruvat

100U/ml Penicilin und 100µg/ml Streptomycin (Cambrex, Belgien)

α-MEM Kompletmedium für CHO-K1:

α-MEM inkl. Phenolrot

10% (v/v) aktives fötales Kälberserum (FKS)

1mM MEM Natrium Pyruvat

100U/ml Penicilin und 100µg/ml Streptomycin (Cambrex, Belgien)

PBS (pH 7,4):

137mM NaCl

2,7mM KCl

10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Anhydrat1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>Trypsin/EDTA in PBS (pH 7,4):

0.05% (w/v) Trypsin

0.02% (w/v) EDTA

Einfriermedium:

10% (v/v) DMSO

90% (v/v) FKS

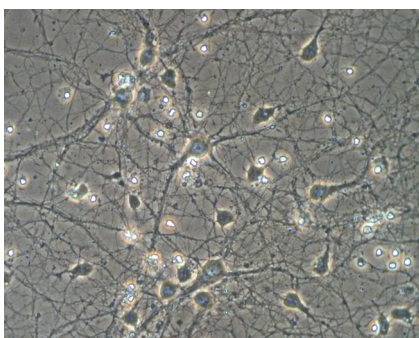
**3.1.1.2. Präparation und Kultivierung primärer hippokampaler Neurone**

Primäre hippokampale Neurone wurden entweder aus Sprague-Dawley Rattenembryonen (E17-18) oder C57BL6 Wildtyp und C57BL6/129 LRP1 *knock-in* Mausembryonen (E15-16) präpariert. Die *knock-in* Mäuse besitzen eine Mutation in der distalen NPxY Domäne der C-terminalen LRP1 β-Kette, die mittels Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch-Technologie (RMCE) in das LRP1 Gen eingeführt wurde (Roebroek et al. 2006). Dabei wurden die Aminosäuren Asparagin (N), Prolin (P) und Tyrosin (Y) der zweiten NPxY Domäne jeweils gegen ein Alanin (A) ausgetauscht (NPVYATL → AAVAATL), um deren Funktionalität einzuschränken. Dieser Austausch ist insofern von Bedeutung, da die Phosphorylierung von Tyrosinen durch Proteinkinasen eine wichtige Voraussetzung für die Aktivierung des Rezeptors und nachfolgende Rekrutierung von Adapterproteinen ist, welche wiederum *downstream* gelegene Signaltransduktionskaskaden einleiten können (Hu et al. 2006). Interessanterweise sind homozygote Mäuse mit einer Mutation in der zweiten NPxY Domäne lebensfähig und fruchtbar, wogegen homozygote Mäuse mit einer inaktivierten proximalen NPxY Domäne einen lethalen Phänotyp aufweisen und noch vor der Geburt sterben (~E18,5).

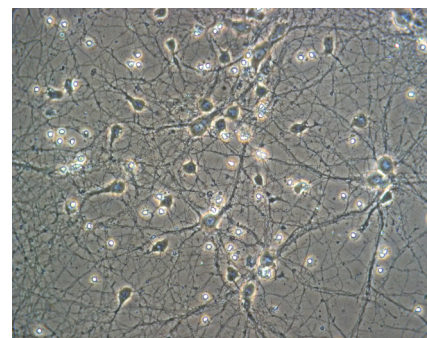
Zur Gewinnung embryonaler hippokampaler Neurone wurde zunächst das trächtige Weibchen mit Isofluran (Forene<sup>®</sup>, Abbott) narkotisiert und dekapitiert. Die Entnahme der Embryonen erfolgte per Kaiserschnitt (sectio caesarea). Nach Freilegung der Embryonen aus Gebärmutter und Fruchtblase wurden diese sofort dekapitiert und die Köpfchen in eiskaltem PBS aufbewahrt. Die Gehirne wurden vorsichtig aus den Schädeln herauspräpariert und bis zur Präparation des Hippokampus ebenfalls in PBS aufbewahrt. Alle Hippokampi der Embryonen eines Muttertieres wurden in HBSS gesammelt, zerteilt und zusammen für 15min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler trypsinisiert. Die angedauten Gewebefragmente wurden anschließend in Neurobasalmedium überführt und zusätzlich mechanisch durch Auf- und Abpipettieren dissoziiert. Unlösliche Gewebefragmente wurden durch Gaze herausfiltriert und die verbleibenden Zellen abzentrifugiert (1200rpm, 4min), um restliches Trypsin zu entfernen. Das Zellpellet wurde in frischem Neurobasalmedium resuspendiert und die Zelllösung zur Zählung in der Neubauerkammer vorbereitet. Dazu wurden 10µl Zelllösung 1:1 mit Trypanblau (Sigma) verdünnt, um tote Zellen anzufärben, und anschließend nur die lebenden Zellen in der Neubauerkammer gezählt. Die absolute Zellzahl wurde wie folgt ermittelt:

$$\varnothing \text{ Zellzahl aus vier Großquadraten} \times 10.000 \text{ (Kammerfaktor)} \times 2 \text{ (Verdünnung)} \times \text{Gesamtvolumen der Zellsuspension} = \text{absolute Zellzahl}$$

Die Zellen wurden anschließend in poly-L-Ornithin-beschichteten 6-well Platten ( $5 \times 10^5$  Zellen/well), 96-well Platten ( $5 \times 10^4$  Zellen/well) oder auf Glasdeckgläschen ausgesät. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um nicht abgesetzte und tote Zellen zu entfernen. Die Kultivierung und Differenzierung erfolgte für 14 Tage (DIV14) in einem mit 5% CO<sub>2</sub> gesättigten Brutschrank bei 37°C ohne weitere Medienwechsel.



Ausdifferenzierte hippokampale Neurone eines Rattenembryos  
E18 DIV14



Ausdifferenzierte hippokampale Neurone eines Mausembryos  
E16 DIV14



Neurobasal-Komplettmedium:

Neurobasal inkl. Phenolrot  
 2% (v/v) B27-Supplement  
 5µg/ml Gentamicin  
 2x Glutamax

HBSS:

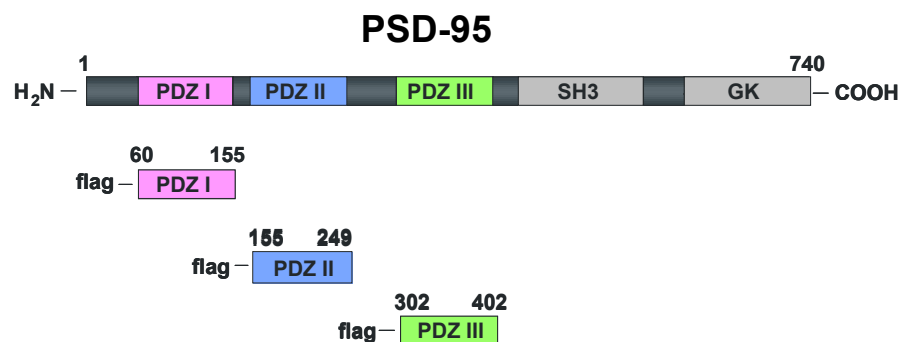
- CaCl<sub>2</sub>  
 - MgCl<sub>2</sub>  
 inkl. Phenolrot

Poly-L-Ornithin:

100µg/ml in PBS

**3.1.2. Transfektionen****3.1.2.1. Plasmid-DNA**

HT22 Zellen wurden mit drei verschiedenen Vektorkonstrukten transfiziert, welche für die einzelnen PDZ Domänen (I, II und III) des PSD-95 kodieren (Abb. 13). Jede einzelne Domäne wurde in den pcDNA3.1 zeo(+) Vektor (Invitrogen) mit einer N-terminalen 3xFlag Sequenz einkloniert. Die korrespondierenden Nukleotidsequenzen aus dem Rattengen sind wie folgt: PDZ I (nt 178-465), PDZ II (nt 463-747) und PDZ III (nt 904-1206) (Cao et al. 2005). Die entsprechenden Vektorkarten sind im Anhang beigefügt.



**Abb. 13: Schematische Illustration der generierten PSD-95 PDZ Domänen.**  
 Die Zahlen entsprechen der jeweiligen Aminosäuresequenz des Gesamtproteins.

Zusätzlich wurde ein pGW1-CMV Expressionsvektor verwendet, der für die komplette humane PSD-95 Sequenz kodiert (eine freundliche Gabe von Dr. Morgan Sheng, (Kim et al. 1995)). Alle Konstrukte wurden mittels der Calcium-Phosphat-Methode (Sambrook 2001) transfiziert. Dazu wurden die Zellen in 6-well Platten mit einer Konfluenz von ~30% in 2ml DMEM ausgesät. Pro well wurden zunächst 75µl ddH<sub>2</sub>O mit 8,3µl 2,5M CaCl<sub>2</sub> und 2µg Plasmid-DNA versetzt und anschließend mit 83µl 2x HEPES-Puffer unter Luftestrom vermischt. Nach 20min Inkubation bei RT wurde das Transfektionsgemisch tropfenweise auf die Zellen

gegeben. Nach 4h erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem, serumfreien DMEM für 24h, um die Zellen auf die anschließende Stimulation mit tPA vorzubereiten.

#### 2,5M CaCl<sub>2</sub>:

7,35g CaCl<sub>2</sub> in 20ml ddH<sub>2</sub>O lösen  
und sterilfiltrieren

#### 2x HEPES Puffer (pH 7,05):

283mM NaCl  
23mM HEPES  
1,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

### 3.1.2.2. RNA Interferenz

Die Reduktion von genspezifischer mRNA und daraus resultierenden Proteinen durch Etablierung der RNA Interferenz (RNAi), auch post-transkriptionelles *gene silencing* (PTGS) oder *knock-down* genannt, findet immer mehr Verwendung in der funktionellen Analyse tierischer Zellen. Dabei wird sich die natürliche Abwehrfunktion der Zelle gegenüber einer viralen Infektion zu Nutze gemacht, bei der virale, doppelsträngige RNA (dsRNA) ins Zytoplasma gelangt. Da sich dort in der Regel nur einzelsträngige, zelleigene RNA-Moleküle (mRNA oder tRNA) befinden, erkennt die Zelle die dsRNA als „Fremd“ und baut sie ab. Dies geschieht mit Hilfe des Dicer-Proteins, einer Typ-III-Ribonuklease, die die dsRNA in kleinere Fragmente von 21-23nt Basenpaarlänge schneidet (Abb. 14).

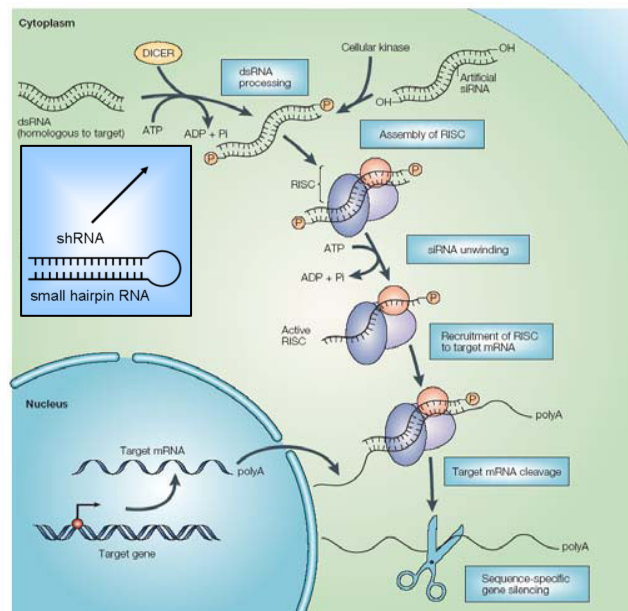


Abb. 14: Der Mechanismus der RNA Interferenz.

Diese als siRNA (*small interfering RNA*) bezeichneten Fragmente werden anschließend phosphoryliert und in den RISC (*RNA-induced silencing complex*), einen Ribonukleoproteinkomplex, eingeschleust. Dort wird ein Fragment unter ATP-Verbrauch in Einzelstränge entwunden und einer der beiden Stränge abgebaut, was zur Aktivierung des RISC führt. Der Komplex kann nun an die

endogene Ziel-mRNA binden, die aus dem Zellkern kommt und deren Sequenz komplementär zu der im RISC gebundenen siRNA ist. Die Ziel-mRNA wird schließlich zerschnitten und damit inaktiviert (Hannon 2002).

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Mechanismen verwendet, um doppelsträngige siRNA Moleküle in die Zelle einzuführen. Zum einen wurde ein Expressionsvektor (shLRP1) transfiziert, der sogenannte *small hairpin RNA*'s (shRNA) erzeugt, die durch einen doppelsträngigen RNA-Stamm und einer verbindenden *loop*-Region gekennzeichnet sind. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die shRNA's noch die Dicer-Maschinerie durchlaufen müssen. Um diesen Schritt zu umgehen, können auch direkt kleine siRNA Moleküle mit einer Länge von 21-23bp eingebracht werden, die zwar einfacher zu transfizieren sind, jedoch auch schneller abgebaut werden als die Expressionsvektoren im Nukleus.

#### **3.1.2.2.1. *small hairpin RNA (shRNA)***

Der in dieser Arbeit verwendete shRNA Expressionsvektor pALsh-LRP1 wurde von Alexander Laatsch generiert (Laatsch et al. 2004) und erkennt die 5'-Region des offenen Leserahmens (ORF) von LRP1. Die darin enthaltene Oligodeoxynukleotidduplex ist gegen folgende Sequenz der kodierenden Region des humanen LRP1 Gens gerichtet:

5'-TAA GAC TTG CAG CCC CAA GCA GTT-3' (Pos. 72-95 des ORF).

Der reine pALsh Vektor diente als negative Transfektionskontrolle. HT22 Zellen ausgesät in 6-well Platten wurden bei einer Konfluenz von ~50% mit Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 (Invitrogen) in einem Verhältnis 2µg Plasmid zu 4µl Lipofectamine transfiziert. Dazu wurden zunächst 50µl Opti-MEM<sup>®</sup>I in einem Eppendorf Reaktionsgefäß mit 4µl Lipofectamine vermischt und weitere 50µl Opti-MEM<sup>®</sup> in einem zweiten Gefäß mit 2µg DNA. Nach 5min wurden beide Ansätze vereint, gemischt und für 25min bei RT inkubiert, um DNA-Lipofectamine-Komplexe zu bilden. Der 100µl Ansatz wurde dann auf 1ml Opti-MEM<sup>®</sup>I getropft, welches auf den Zellen vorgelegt worden war. Nach 4h erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM Komplettmedium. Die Gesamttransfektionsdauer betrug 72h, wobei nach 48h eine Retransfektion nach oben beschriebenem Protokoll erfolgte, um die Transfektionseffizienz zu steigern.

#### **3.1.2.2.2. *small interfering RNA (siRNA)***

Im Gegensatz zur vektorbasierten shRNA Methode werden bei der siRNA Transfektion kleine, synthetisch hergestellte, doppelsträngige RNA Moleküle mit einer Länge von 21-25 Nukleotiden in die Zelle eingeführt, wo sie direkt vom RISC Komplex im Zytoplasma erkannt werden können. Diese Methode wurde hier für

die Transfektion primärer Neurone etabliert, da diese kleinen RNA Fragmente leichter zu transfizieren sind als große Vektorkonstrukte. Die Stealth™ Oligoribonukleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen und besitzen folgende Sequenzen:

Zielgen	siRNA Sequenz in 5'- 3' Richtung	Molarität
PSD95 murin	GGA GUA UGA GGA GAU CAC AUU GGA A sense	40nM
	UUC CAA UGU GAU CUC CUC AUA CUC C antisense	
Shc1 murin	GGC UGU GUG GAG GUC UUA CAG UCA A sense	20nM
	UUG ACU GUA AGA CCU CCA CAC AGC C antisense	
FE65 murin	CCA GAU GCU CAA GUG CCA CGU GUU U sense	100nM
	AAA CAC GUG GCA CUU GAG CAU CUG G antisense	

**Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten siRNA.**

Primäre hippokampale Rattenneurone wurden am Tag 12 in vitro (DIV12) mit oben genannten siRNA Nukleotiden transfiziert und anschließend per Western Blot auf den spezifischen Protein *knock-down* hin untersucht. Dazu wurden 5µl Lipofectamine™2000 in 250µl Neurobasal<sup>minus</sup> verdünnt, ebenso oben genannte Molaritäten an siRNA (Tabelle 2) in 250µl Neurobasal<sup>minus</sup>. Nach 5min wurden beide Ansätze vereint, gemischt und für 20min bei RT inkubiert, Zwischenzeitlich wurde das alte Zellmedium abgenommen, bei 37°C gelagert, die Zellen mit 500µl frischem Neurobasal<sup>minus</sup> versehen und schließlich mit den 500µl Inkubationsansatz vermischt. Nach 4h wurde das Transfektionsgemisch abgenommen und die Zellen mit 1,5ml abzentrifugiertem, alten Medium für 48h inkubiert.

#### Neurobasal<sup>minus</sup>:

Neurobasal inkl. Phenolrot  
2% (v/v) B27-Supplement  
2x Glutamax  
500µM Glutamin

## 3.2. Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1. Bakterientransformationen

Bakterientransformationen wurden durchgeführt, um entweder DNA-haltige Plasmide zu vervielfältigen oder um GST-Fusionsproteine zu exprimieren und aufzureinigen. Dazu wurden zwei verschiedene *E. coli* Stämme verwendet: DH5 $\alpha$  für die Expression von Plasmid-DNA, BL21 für die Induktion von GST-Proteinen (beide von Invitrogen, Karlsruhe). Für die Transformation wurden je 40 $\mu$ l kompetente *E. coli* Zellen mit 0,1-1 $\mu$ g Plasmid-DNA vermischt und für 20min auf Eis inkubiert, dann einem einminütigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und sofort wieder für 2min auf Eis gekühlt. Nach 60min Inkubation in 400 $\mu$ l LB-Medium bei 60°C wurde der Ansatz kurz abzentrifugiert und das Bakterienpellet auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Antibiotika-Selektion soll gewährleisten, dass nur die Bakterien, die das gewünschte Plasmid mit dem Antibiotika-Resistenzgen aufgenommen haben, als Kolonien auf der Platte wachsen und unspezifisches Bakterienwachstum verhindert wird.

#### LB-Medium (pH 7,5):

1% (w/v) Bacto-Trypton  
0,5% (w/v) Hefeextrakt  
1% (w/v) NaCl

#### LB-Agarplatten:

LB-Medium mit 1,5% (w/v)  
Bacto-Agar mischen,  
autoklavieren und nach dem Abkühlen  
auf mit 50 $\mu$ g/ml Antibiotika versehen.

#### 3.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Zunächst wurde ein DH5 $\alpha$  Bakterienklon mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte gepickt und in 5ml LB-Medium (mit 100 $\mu$ g/ml Ampicilin) für 8h bei 37°C geschüttelt (Vorkultur). Für die Hauptkultur wurden 4ml der Vorkultur in 200ml antibiotikahaltiges LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Isolierung der produzierten Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly 1979) mit dem JetStar Maxi Kit der Firma Genomed (Bad Oeynhausen) nach Anweisungen des Herstellers. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde in 1:100er Verdünnung bei 260nm photometrisch bestimmt. Dabei gilt  $1OD_{260nm} \hat{=} 50\mu\text{g/ml}$  doppelsträngige DNA.

#### 3.2.1.2. Expression und Aufreinigung von GST-Proteinen

Zur Herstellung eines RAP-GST Fusionsproteins wurde die vollständige, humane RAP cDNA (GenBank Zugangsnr. M63959) in den pGEX-4T Vektor inkloniert (Kang et al. 2000) und kompetente *E. coli* BL21 Zellen mit diesem transformiert

wie oben beschrieben. Von einer über Nacht angelegten Vorkultur wurden 4ml mit 100ml frischem LB-Medium (100µg/ml Ampicilin) versetzt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> zwischen 0,5 und 1 inkubiert. Die Expression des RAP-GST Proteins wurde durch Zugabe von 500µM IPTG (Roth) für weitere 4h bei 37°C induziert. Das Zellpellet wurde nach Zentrifugation (10.000xg, 15min) in 1ml Sarkosyl-Puffer resuspendiert, für 20min auf Eis inkubiert, 3x kurz sonifiziert, mit 1% TritonX-100 versehen und über Nacht rotierend bei 4°C lysiert. Zellfragmente wurden am nächsten Tag bei 14.000xg für 10min abzentrifugiert. Der Überstand wurde für 2h mit 400µl äquilibrierten Glutathion-Sepharose-beads (Sigma) auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert, um eine Bindung des GST-Proteins an die *beads* zu ermöglichen. Die Elution des GST-Proteins von den *beads* erfolgte mit 200µl einer 10mM Glutathionlösung für 1h. Nach Zentrifugation (500xg, 1min) wurde der Überstand abgenommen, aliquotiert und die Konzentration des aufgereinigten RAP-GST Proteins mittels einer 10%igen SDS-PAGE mit BSA-Standard (0,5-4µg) und anschließender Coomassie-Färbung ermittelt.

Sarkosyl-Puffer (pH 8,0):

500mM Tris-HCl  
3% (v/v) N-Laurylsarcosine  
200mM EDTA

Tris-Puffer (pH7,4):

50mM Tris  
150mM NaCl

Elutionspuffer (pH 7,4):

10mM Glutathion (Sigma) in Tris-Puffer

1M IPTG:

283mg IPTG auf 1ml ddH<sub>2</sub>O

### 3.3. Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1. Stimulation der Zellen

HT22 Zellen in 6-well Platten wurden bei einer Konfluenz von ~80% für 24h mit serumdefizientem DMEM Medium inkubiert, bevor sie mit tPA stimuliert wurden. Dies war nötig, um die Basalrate an phosphoryliertem Erk1/2 niedrig zu halten, da diese Kinase auch von Serumkomponenten aktiviert werden kann. Die Stimulation mit tPA erfolgte in 1ml serumfreiem Medium für 30min bei 37°C.

In dieser Studie wurde humanes, rekombinantes tPA verwendet, welches in der Medizin als Medikament mit dem Handelsnamen Actilyse (Boehringer Ingelheim) bekannt ist und aus überexprimierenden Hamsteroarialzellen (CHO-Zellen) gewonnen wird. Um zu testen, ob es sich genauso verhält wie synthetisch hergestelltes, wurde ebenfalls reines tPA von der Firma Biopur (Schweiz)

bezogen. Im Vergleich zeigte sich, dass eine Stimulation der MAP Kinase mit synthetischem tPA bereits bei einer Konzentration von 10µg/ml detektierbar war, wogegen 40µg/ml Actilyse für einen vergleichbaren Effekt nötig waren. Daraus wurde geschlossen, dass 10µg/ml reines tPA funktionell 40µg/ml Actilyse gleichzusetzen ist, welches in dieser Studie hauptsächlich verwendet wurde. Actilyse wurde als 2mg/ml Stocklösung in ddH<sub>2</sub>O angesetzt, aliquotiert, bei -20°C gelagert und mit einer Konzentration von 80µg/ml eingesetzt.

Um auszuschließen, dass die Erk1/2 Aktivierung durch einen Zusatzstoff in der Actilyse und nicht durch das eigentliche tPA erfolgte, wurde das gelöste Medikament für einen Testversuch über Nacht mit dreimaligen Pufferwechsel gegen steriles H<sub>2</sub>O dialysiert (MWCO 12-14 kDa) und wie normale Actilyse in Zellkultur eingesetzt.

Die Inhibitoren U0126, MK-801, DL-AP5 und RAP wurden für bestimmte Zeiten auf den Zellen vorinkubiert (Tabelle 3) und waren auch während der tPA-Stimulation noch im Medium vorhanden.

Primäre hippokampale Neurone wurden am Tag 14 in vitro (DIV14) ebenso behandelt wie HT22 Zellen mit der Ausnahme, dass 24h zuvor kein Mediumwechsel vollzogen wurde, da die Zellen ohnehin ohne Serum kultiviert wurden.

Inhibitor	Funktion	Molarität	Lösungsmittel	Vorinkubation
U0126	MEK Inhibitor	50µM	DMSO	15min
MK-801	NMDA Rezeptor Kanalöffnungsblocker	10µM	ddH <sub>2</sub> O	15min
DL-AP5	NMDA Rezeptor kompetitiver Antagonist	100µM	0,1M NaOH	5min
RAP	Lipoproteinrezeptor Ligandenblocker	500nM	Elutionspuffer	1h

**Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Inhibitoren.**

### 3.3.2. Zellyse und Proteinbestimmung

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellen sofort auf Eis gekühlt, mit 1ml eiskaltem TBS gewaschen und in 500µl TBS mit einem Zellschaber abgekratzt. Das nach kurzer Zentrifugation (30sec, 10.000xg) sedimentierte Pellet wurde zunächst für 20min auf Eis lysiert und danach für 20min bei 14.000xg in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert, um aufgebrochene Zellfragmente zu pelletieren. Die Menge des Lysispuffers pro well ergab sich aus der Größe des Zellpellets und

betrug bei HT22 Zellen durchschnittlich 50µl, bei primären Neuronen ~30µl. Für die Untersuchung von phosphorylierten Proteinen musste der Lysispuffer mit Natriumorthovanadat und PhosSTOP versetzt werden, um die Abspaltung des Phosphats durch Phosphatasen zu verhindern.

Für die nachfolgende Proteinbestimmung wurde das *BCA Protein Assay Kit* der Firma Pierce (Bonn) verwendet. Dazu wurden 5µl des erhaltenen Zelllysats 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt, mit 1ml BCA-Reagenz versetzt und für 30 min bei 60°C inkubiert. Die Gesamtproteinkonzentration des Zellextrakts wurde anschließend anhand einer BSA-Eichgeraden photometrisch in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Anthos HT III) bei 560nm bestimmt und mit der ANTHOS-Software ausgewertet.

<u>RIPA-Lysispuffer:</u>	<u>1x TBS (pH 7,4):</u>
50mM Tris	25mM Tris-Base
1% (v/v) NP40	137mM NaCl
0,5% (w/v) Na-Deoxycholat	270µM KCl
0,1% (w/v) SDS	
1mM Natriumorthovanadat	
1x Protease Inhibitor (complete)	
1x Phosphatase Inhibitor (PhosSTOP)	

### 3.3.3. Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld (Laemmli 1970). Sie findet unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgelsystem statt, d.h. alle Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine werden durch das im Probenpuffer enthaltene Detergens SDS (engl. *sodium dodecyl sulfate*) und das Disulfidbrücken-reduzierende β-Mercaptoethanol aufgebrochen. Das negativ geladene SDS lagert sich mit einer Stöchiometrie von 1 SDS-Molekül pro 3 Aminosäuren an die Proteine der resultierenden Primärstruktur und verleiht dieser somit eine negative Ladung, welche die Eigenladung der Proteine überdeckt. Nach Anlegung einer elektrischen Spannung wandern die Proteine zur positiv geladenen Anode und werden dabei im Trenngel entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Ein 4%iges Sammelgel sorgt für eine gleichmäßige Verteilung der Proteine, bevor sie das Trenngel erreichen. Entscheidend für die Dichte der Netzstruktur des Geles ist der Anteil des Polyacrylamids: je höher der Anteil, desto dichter das Netz. Hochprozentige Gele sind besonders für die Auftrennung kleiner Peptidfragmente geeignet.

Zur Untersuchung der phosphorylierten Erk1/2 Kinase wurden je 20µg der Proteinproben mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt, 5min bei 95°C aufgeköcht,



abgekühlt, abzentrifugiert und auf ein 12%iges Acrylamidgel geladen. Der Gellauf erfolgte mit 1x SDS-Laufpuffer bei einer Spannung von 80-120V in Elektrophoresekammern (Mini-Protean) der Firma BioRad (München). Die Auftrennung von LRP1 und PSD95 fand aufgrund ihres höheren Molekulargewichts mit 10%igen Gelen statt. Als Proteinstandard dienten 10µl des biotinylierten Markers der Firma NEB (Frankfurt).

Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel für den anschließenden Western Blot vorbereitet.

Gele in %	ddH <sub>2</sub> O	40% Acrylamid (29:1)	4x Trenngel-puffer	4x Sammelgel-puffer	10% APS	TEMED
4%	1,563ml	312µl	-	625µl	25µl	2,5µl
10%	5ml	2,5ml	2,5ml	-	100µl	10µl
12%	4,5ml	3ml	3,5ml	-	100µl	10µl

**Tabelle 4: Gelzusammensetzung verschiedenprozentiger Polyacrylamidgelen für ein 1,5mm Gel.**

4x SDS-Probenpuffer:

62,5mM Tris-HCl; pH 6,8

10% (v/v) Glycerin

2% (w/v) SDS

0,02% (w/v) Bromphenolblau

4x Trenngelpuffer (pH 8,8):

1,5M Tris

0,4% (w/v) SDS

4x Sammelgelpuffer (pH 6,8):

0,6M Tris-HCl

0,4% (w/v) SDS

1x Laufpuffer (pH 8,3):

192mM Glycin

25mM Tris-Base

0,1% (w/v) SDS

### 3.3.4. Western Blot

Der Western Blot ist eine etablierte Methode nach Burnette (Burnette 1981), mit der Proteinbanden aus einem Acrylamidgel durch Anlegen einer elektrischen Spannung auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend per Immundetektion spezifisch nachgewiesen werden können. Der Proteintransfer erfolgte mit 1x Transferpuffer in BioRad Nassblotkammern bei 30V über Nacht oder bei 250mA für 2h auf Eis. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran kurz in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit Ponceau S angefärbt, um die Qualität und Gleichmäßigkeit des Transfers zu überprüfen. Nach Entfärbung der rot angefärbten Proteinbanden mit TBST wurde die Membran in Blockierungspuffer

inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran mit Milchprotein abzusättigen. Je nachdem, welche Proteine detektiert werden sollten, fand die Inkubation entweder in 2% Blockierungspuffer für 30min (für P-Erk1/2) oder in 5% Blockierungspuffer für 1h statt (alle anderen Proteine).

1x Transferpuffer (pH 8,8) :

25mM Tris Base

192mM Glycin

Blockierungspuffer:

1x TBS-T

2-5 % (w/v) Magermilchpulver

TBS-T:

1x TBS

0,1% (v/v) Tween-20

Ponceau S:

0,5% (w/v) in ddH<sub>2</sub>O

1% (v/v) Essigsäure

### 3.3.5. Immunologischer Nachweis von Zielproteinen

Nach Absättigung der freien Bindungsstellen durch Milchprotein wurde die Membran mit dem Primärantikörper inkubiert, der gegen das zu detektierende Protein gerichtet ist. Die Inkubation erfolgte in der Regel rotierend über Nacht bei 4°C. Tabelle 5 zeigt die Primärantikörper auf, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Alle Primärantikörper wurden mit 0,02% Natriumazid versetzt, um Bakterienwachstum zu verhindern.

Um die spezifische Proteinbande sichtbar zu machen, wurde die Membran zunächst 4x mit TBS-T gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 6), welcher gegen den tierspezifischen Fc-Teil des Erstantikörpers gerichtet ist, für 1h bei RT inkubiert.

Dem Sekundärantikörper wurde noch Anti-Biotin zugegeben, um den biotinylierten Marker zu detektieren. Nach wiederholtem Waschen mit TBS-T erfolgte der Nachweis der Proteine mittels Chemilumineszenz (SuperSignal®). Dabei wird das Substrat Luminol mit Hilfe der Meerrettichperoxidase (HRP), welche an den Zweitantikörper gekoppelt ist, zu 3-Aminophthalat katalysiert. Die bei dieser Reaktion freigesetzte Energie in Form von Lichtquanten konnte durch Auflegen eines Röntgenfilmes (CL-XPosure™ Film) photochemisch dokumentiert werden.

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Actin 20-33	Kaninchen	1:1000 in 5% Milch	Sigma
Fe65 ww	Kaninchen	1:20.000 in TBST	Eigenproduktion von Dr. J. Buxbaum
Flag M2	Maus	1:3000 in TBST	Sigma
LRP 1704	Kaninchen	1:10.000 in 5% Milch	Eigenproduktion von C. Pietrzik
p44/42 MAP Kinase	Kaninchen	1:500 in 5% BSA	Cell Signaling
Phospho-p44/42 MAP Kinase (E10)	Maus	1:500 in TBS	Cell Signaling
PSD-95	Maus	1:500 in TBST	BD Biosciences
SHC1	Maus	1:3000 in TBST	BD Biosciences

Tabelle 5: Primärantikörper.

Bezeichnung	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG	HRP	1:10.000 in 5% Milch	Jackson Lab
Anti-Maus-IgG	HRP	1:10.000 in 5% Milch	Jackson Lab
Anti-Biotin	HRP	1:100 in 5% Milch	NEB

Tabelle 6: Sekundärantikörper.

### 3.4. Physiologische Methoden

#### 3.4.1. Calcium Messung

Um tPA-induzierte Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in Neuronen und HT22 Zellen zu messen, wurde der fluoreszierende Calciumindikator Calcium Green<sup>TM</sup>-1 in Kombination mit Pluronic F-127 (beides Molecular Probes, Niederlande) verwendet. Letzteres soll die Solubilisierung des wasserunlöslichen Farbstoffs und somit dessen Aufnahme in die Zelle erleichtern. Bei Anstieg des intrazellulären Calciumpegels beginnt der Farbstoff, verstärkt zu fluoreszieren, und diese Fluoreszenzänderung kann gemessen werden. Dazu wurden zwei verschiedene Methoden angewandt, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

### 3.4.1.1. Konfokale Lasermikroskopie

Die konfokale Lasermikroskopie ermöglicht dem Betrachter einen direkten Blick auf die Vorgänge innerhalb der Zelle, da sie am Monitor *live* mitverfolgt werden können.

Nach 24h unter serumfreien Bedingungen wurden die Zellen, die auf Deckgläschen in 4cm-Schalen ausgesät waren, in Neurobasal Medium für 1h bei 37°C mit 10µM Calcium Green<sup>TM</sup>-1 beladen. Die Inhibitoren MK-801 (10µM) und RAP (500nM) wurden bei Bedarf mitinkubiert und waren auch zum Zeitpunkt der tPA-Stimulation noch präsent. Nach Ende der Beladungszeit wurde überschüssiger Farbstoff entfernt und die Zellen mit HBSS<sup>+/+</sup> gewaschen. Pro Messung wurde ein Deckgläschen in die beheizte Messkammer überführt, welche an ein konfokales Mikroskop mit Krypton/Argon Laser und einem Nipkov Drehscheiben System angeschlossen war. Die Zugabe von tPA (40µg/ml) erfolgte nach einem Vorlauf von 2min, die totale Messzeit betrug 5min. Die Fluoreszenz des Calcium Green<sup>TM</sup>-1 wurde bei 488nm angeregt und Änderungen der emittierten Fluoreszenz wurden mit dem Metamorph Imaging Programm analysiert. Dabei wurden Änderungen des  $[Ca^{2+}]_i$ -Pegels in individuellen Zellsomata als relative Änderung der aktivierten Fluoreszenz im Verhältnis zur Startfluoreszenz ( $[dF/F_0]$ ) dargestellt.

#### HBSS<sup>+/+</sup>:

HBSS (PAA, Linz)

2mM CaCl<sub>2</sub>

1mM MgCl<sub>2</sub>

10mM Glucose

### 3.4.1.2. Fluoreszenzmessung

Die zweite Methode zur Messung von intrazellulärem Calcium war etwas weniger aufwendig, da sie über Fluoreszenzmessung im 96-well Format erfolgte. Dies war besonders für die Messung der NPxY(2) Neuronen von Vorteil, da man weniger Zellen brauchte. Die Beladung der Zellen mit dem Farbstoff und den Inhibitoren erfolgte wie oben beschrieben. Die Messung erfolgte ebenfalls über einen Zeitraum von 5min in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Infinite F200, Tecan), mit 2min Vorlauf vor der tPA-Stimulation. Fluoreszenz wurde bei 485nm Wellenlänge angeregt und das emittierte Licht bei 535nm detektiert. Zur Auswertung wurde der maximale Anstieg der Calciumkonzentration gegen die Startfluoreszenz normalisiert ( $[F_{max}/F_0]$ ).

### 3.4.2. Glutamat Messung

Die Ausschüttung von L-Glutamat durch HT22 Zellen als mögliche Folge der tPA Stimulation wurde mit Hilfe des Amplex Red Kits (Molecular Probes) analysiert. Dazu wurden die Zellen in einer Dichte von  $1,6 \times 10^4$  Zellen/well in einer 96-well Platte ausgesät und nach 24h für weitere 24h in serumfreiem DMEM Medium kultiviert. Die Inkubation mit tPA (40 $\mu$ g/ml) erfolgte für 1min oder 5min in HBSS<sup>+/+</sup>. Die Messung erfolgte mit 50 $\mu$ l Überstand nach Anweisungen des Herstellers in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Infinite F200, Tecan) bei 540nm Fluoreszenzanregung und 580nm Emissionsdetektion.

## 3.5. Molekularbiologische Methoden

### 3.5.1. Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde durchgeführt, um HT22 Zellen auf die Expression von NMDA Rezeptoren zu überprüfen. Gesamt-RNA zur Durchführung der Reversen Transkription wurde entweder aus HT22 Zellen oder primären hippokampalen Neuronen als Positivkontrolle mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers isoliert. 500ng der präparierten RNA wurden anschließend für die RT-PCR eingesetzt (One-Step RT-PCR Kit, Qiagen). Die *Primer* (Invitrogen) wurden exonübergreifend gegen Sequenzen aus dem NR1 Mausgen gerichtet und erzeugen ein Fragment von 407bp (Tabelle 7).

#### RT-PCR-Ansatz:

500ng Gesamt-RNA  
 0,4mM Deoxynucleotid-Mix  
 0,6 $\mu$ M *Forward-Primer* NR1  
 0,6 $\mu$ M *Reverse Primer* NR1  
 5U RNase Inhibitor  
 2 $\mu$ l Enzym Mix  
 50 $\mu$ l

#### RT-PCR-Programm:

50°C 30min  
 94°C 15min  
 94°C 1min  
 53°C 30sec  
 72°C 2min  
 72°C 10min  
 4°C  $\infty$

} 45x

Primer	Spezies	Sequenz in 5'- 3' Richtung	Exon	Position
NR1 <i>forward</i>	Maus	AGT GCT GTT ATG GCT TCT GC	10	1451-1470
NR1 <i>reverse</i>	Maus	TCG GCC AAA GGG ACT GAA GC	13	1857-1838

Tabelle 7: Primer für die RT-PCR.

### 3.5.2. Analytische DNA Agarose Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung des amplifizierten DNA-Fragmentes wurden 20µl des PCR-Products mit 6x DNA-Auftragspuffer versetzt (Endkonzentration 1x) und auf ein 2%iges Agarosegel geladen. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TBE-Puffer kurz aufgekocht, abgekühlt und mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Nach Aushärtung des Gels in der Elektrophoresekammer wurde dieses mit den Proben und einem 100bp-DNA-Standard als Größenstandard beladen. Die Auftrennung erfolgte in 1x TBE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 80V. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA-Doppelhelix konnten die DNA-Fragmente später auf dem UV-Transilluminator visualisiert und dokumentiert werden.

1x TBE-Elektrophoresepuffer:

89mM Tris-Base  
89mM Borsäure  
2mM EDTA

6x DNA-Probenpuffer:

10mM Tris-HCl; pH 8,0  
50% (v/v) Ficoll  
0,006% (w/v) Bromphenolblau

Ethidiumbromidstammlösung:

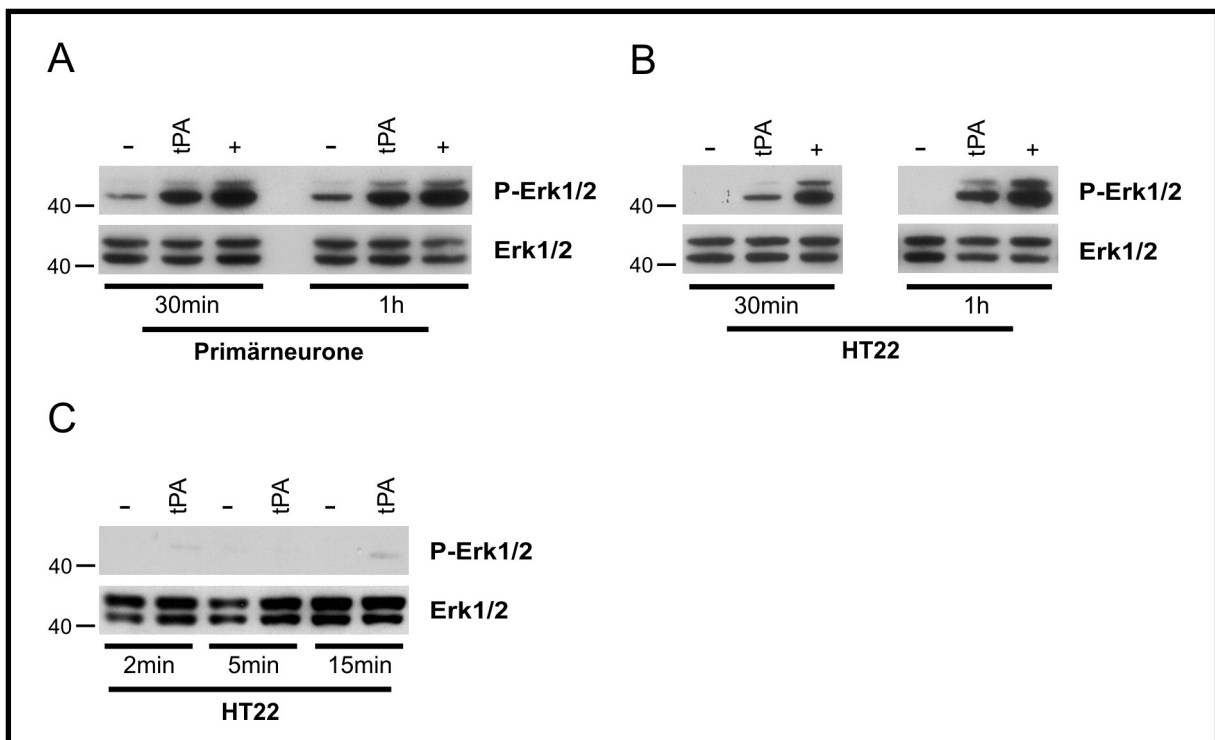
500µg/ml in ddH<sub>2</sub>O

## 4. Ergebnisse

In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass tPA in der Lage ist, den Erk1/2 MAP Kinase Weg in hippokampalen Neuronen anzuschalten (Medina et al. 2005). Dabei wurde postuliert, dass die Aktivierung der Erk1/2 Kinase unabhängig von der proteolytischen Aktivität des Plasminogenaktivators über den NMDA Rezeptor vermittelt wird. Die Arbeitsgruppe um Denis Vivien wiederum veröffentlichte Daten, die besagen, dass die direkte Bindung von tPA an die aminoterminal Domäne der NR1 Untereinheit zu einer proteolytischen Spaltung derselbigen führt und es daraufhin zu einer Erhöhung des NMDA-induzierten Calciuminflux kommt (Nicole et al. 2001; Fernandez-Monreal et al. 2004a). Obwohl beide Gruppen eine tPA-induzierte Aktivierung des NMDA Rezeptors vorschlagen, ist immer noch unklar, über welchen Mechanismus die Anschaltung der nachfolgenden Signaltransduktionskaskade erfolgt.

### 4.1. Spezifische Aktivierung der Erk1/2 Kinasen durch tPA in neuronalen Zellen

Zunächst sollte mittels Western Blot Analyse ermittelt werden, ob tPA in zwei verschiedenen Zellsystemen eine Phosphorylierung des Erk1/2 Proteins bewirkt: zum einen in HT22 Zellen, eine vom Hippokampus abgeleitete murine Zelllinie, und zum anderen in primären hippokampalen Neuronen aus Rattenembryonen. Durch Inkubation der Zellen mit 80µg/ml tPA (Actilyse) über verschiedene Zeiträume hinweg (2min-3h) sollte der beste Stimulationszeitpunkt für die Aktivierung von Erk1/2 bestimmt werden. Wie Abbildung 15 zu entnehmen ist, erfolgte eine maximale Phosphorylierung der Kinase ab einem Inkubationszeitraum von 30min-1h, sowohl in primären Neuronen (Abb. 15A) als auch HT22 Zellen (Abb. 15B). Kürzere Stimulationen von 2-15min erzielten keinen signifikanten Effekt (Abb. 15C) und wurden daraufhin vernachlässigt. Im Vergleich mit dem reinen, synthetischen tPA (stPA, Biopur) stellte sich heraus, dass 80µg/ml Actilyse einer Aktivität von 20µg/ml stPA entsprachen (ohne Abbildung). Dies war insofern von Bedeutung, als dass vorangegangene Publikationen tPA-Konzentrationen im Bereich von 10-20µg/ml eingesetzt hatten. Für weitere Versuche dieser Arbeit wurde jedoch Actilyse verwendet.



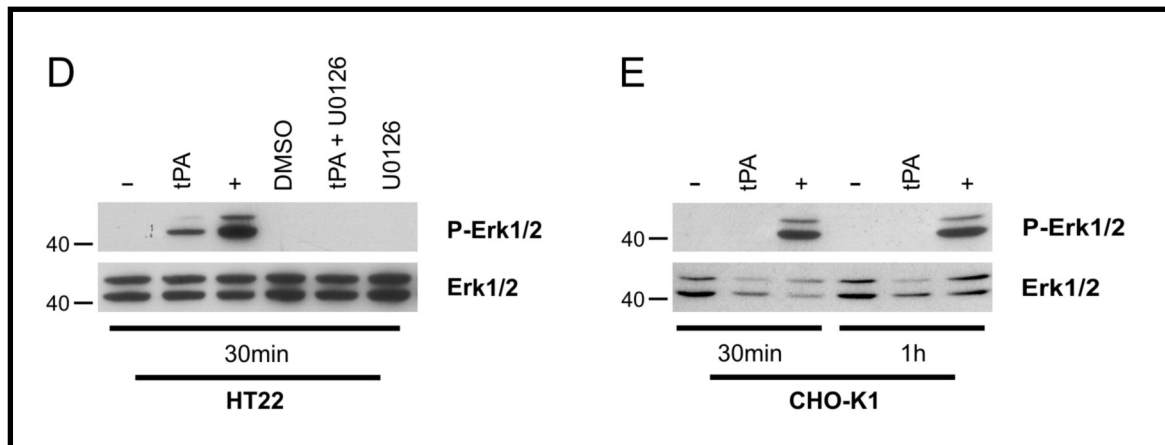
**Abb. 15A-C: tPA aktiviert die Erk1/2 Kinase in primären hippocampalen Neuronen und in der neuronalen Zelllinie HT22.**

(A) Western Blot Analyse von hippocampalen Rattenneuronen (E18 DIV14). Der Proteinnachweis erfolgte mit monoklonalem anti-Phospho-Erk1/2 und polyklonalem anti-Erk1/2 Antikörper nach tPA Behandlung für 30min oder 1h. Wasser (-) and 10% FKS (+) dienten jeweils als Negativ- und Positivkontrolle. (B) Vergleichbare Behandlung von HT22 Zellen mit 80µg/ml tPA. (C) Zeitkinetik von 2-15min in HT22 Zellen ergibt keine Erk1/2 Stimulation durch tPA (80µg/ml).

Die Stärke der Aktivierung der Kinase ergibt sich aus dem Grad ihrer Phosphorylierung und muss daher im Verhältnis zum unphosphorylierten Erk1/2 Protein betrachtet werden. Da die Gesamtproteinmenge an unphosphoryliertem Erk1/2 in allen Bedingungen gleich geblieben ist, kann die Erk1/2 Aktivierung allein durch einen Vergleich der phosphorylierten Banden zur entsprechenden Negativkontrolle ermittelt werden. Als Positivkontrolle diente 10% FKS. Das unphosphorylierte Erk1/2 ist zudem ein so genanntes *house-keeping* Protein, das unabhängig von Stimulationen immer gleich stark in der Zelle exprimiert sein sollte und daher auch als Beladungsreferenz angesehen werden kann.

Um weiterhin den Signalweg zu untersuchen, der zur Aktivierung der Erk1/2 Kinase führt, wurden HT22 Zellen mit U0126 für 15min vorinkubiert. U0126 ist ein Inhibitor der MEK1/2 Kinase, welche in der Transduktionskaskade oberhalb der Erk1/2 Kinase liegt und diese nach Stimulation phosphoryliert. Nachfolgende tPA Zugabe erzeugte keine Erk1/2 Phosphorylierung verglichen mit der normalen Stimulation (Abb. 15D). Somit ist bestätigt, dass durch tPA die klassische MAP Kinase Transduktionskaskade induziert wird und MEK1/2 direkt für die Aktivierung von Erk1/2 verantwortlich zeichnet.





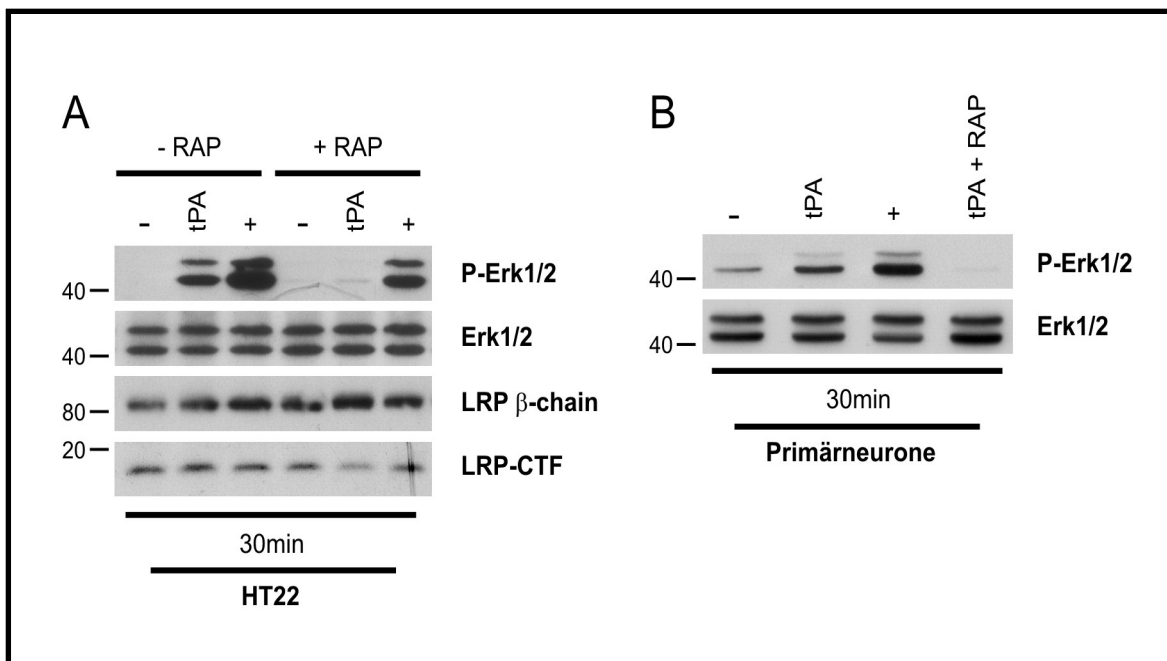
**Abb. 15D-E:** (D) Die Western Blot Analyse von Zelllysate aus HT22 Zellen zeigt eine komplett reduzierte Erk1/2 Phosphorylierung nach Vorinkubation des MEK Inhibitors U0126 (10 $\mu$ M, 15min) und nachfolgender tPA Behandlung (80 $\mu$ g/ml). DMSO und U0126 dienten als Negativkontrollen. (E) Vergleichbare tPA Stimulation von CHO-K1 Zellen ergibt keine Erk1/2 Aktivierung.

Zusätzlich zu den neuronalen HT22 Zellen wurde auch die Epithelzelllinie CHO-K1 auf Erk1/2 Aktivierung getestet. Interessanterweise wurde das Protein in dieser Zelllinie durch tPA aber nicht phosphoryliert, wie Abbildung 15E erkennen lässt. Die Tatsache, dass eine tPA-vermittelte Erk1/2 Aktivierung scheinbar nur in neuronalen Zellen funktioniert, lässt vermuten, dass ein neuronenspezifischer Rezeptor an der Signalvermittlung beteiligt sein muss.

#### 4.2. Blockade der Erk1/2 Phosphorylierung durch RAP

In Fibroblasten konnte bereits beobachtet werden, dass eine tPA-induzierte Erk1/2 Phosphorylierung mit anschließender Induktion der Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) LRP1-abhängig ist (Hu et al. 2006). Da tPA ohnehin ein markanterer Ligand für LRP1 als für den NMDA Rezeptor ist, sollte die Beteiligung von LRP1 in der tPA-vermittelten Signaltransduktion näher untersucht werden. Dazu wurden neuronale Zellen vor der tPA Stimulation mit RAP inkubiert. Das *Receptor-associated Protein* (RAP) ist ein Chaperon, das LRP1 zur richtigen Faltung im Endoplasmatischen Retikulum verhilft. Appliziert man es jedoch als extrazelluläres, GST-gekoppeltes Protein, kann es an die extrazellulären Domänen von LRP1 binden und somit jegliche Ligandenbindung blocken. Da sich die extrazellulären Domänen innerhalb der LDL Rezeptorgenfamilie sehr ähneln, inhibiert RAP nicht nur spezifisch LRP1, sondern auch alle anderen Familienmitglieder (Abb. 1).

Die Vorinkubation von RAP-GST (500nM, 1h) vor der tPA-Stimulation resultierte in einem markanten Rückgang der Erk1/2 Phosphorylierungsrate in HT22 Zellen (Abb. 16A, obere Banden, Spur 5). Ein vergleichbarer Effekt konnte auch in primären Neuronen beobachtet werden (Abb. 16B, Spur 4).



**Abb. 16: RAP fungiert als funktioneller Inhibitor der tPA-vermittelten Erk1/2 Aktivierung.**

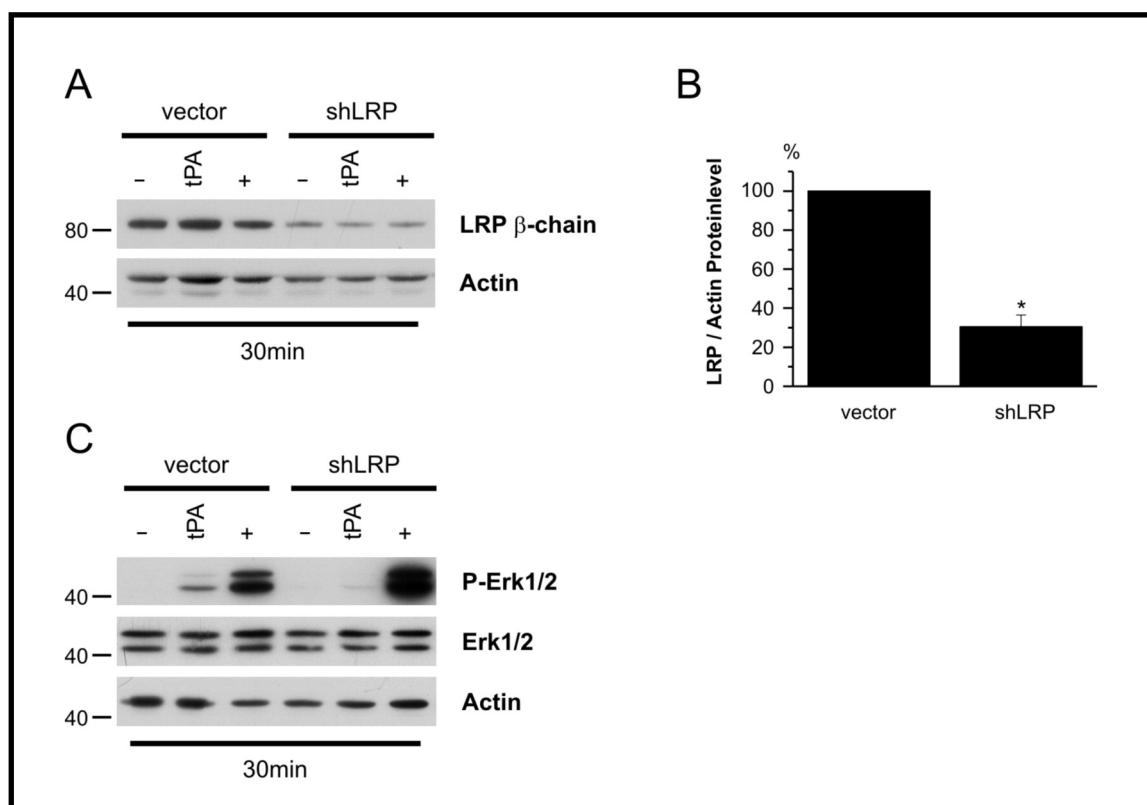
(A) Erk1/2 Phosphorylierung in HT22 Zellen präinkubiert mit 500nM RAP für 1h vor der tPA Stimulation ist stark inhibiert im Vergleich zur Kontrollbehandlung ohne RAP. Inkubation desselben Blots mit polyklonalem 1704 anti-LRP1 Antikörper läßt keine veränderte LRP1 Prozessierung erkennen (LRP1 β-Kette, 85kD; LRP1-CTF's, 18kDa) (B) Bestätigung des RAP-Effekts in primären hippocampalen Neuronen (E18 DIV14) stimuliert mit 80μg/ml tPA.

Es gibt einige Diskussionen darüber, ob tPA im Zuge der NMDA Rezeptor- und MAP Kinasen Aktivierung seiner ursprünglichen Funktion als Protease gerecht wird und proteolytische Aktivität aufweist oder nicht. Die Gruppe um Nicole postuliert, dass erst die proteolytische Spaltung der NR1 Untereinheit durch tPA den NMDA Rezeptor aktiviert und einen NMDA-induzierten Calcium-Einstrom potenziert (Nicole et al. 2001; Fernandez-Monreal et al. 2004a). Dagegen konnte Medina zeigen, dass die tPA-vermittelte Erk1/2 Aktivierung unabhängig von der proteolytischen Aktivität der Protease stattfindet, da eine katalytisch inaktive, mutante Form von tPA, tPAS478A, denselben Effekt bewirkt wie normales tPA (Medina et al. 2005). Um einen potenziellen, proteolytischen Effekt von tPA auf LRP1 zu untersuchen, wurde derselbe Blot zusätzlich mit dem 1704 Antikörper inkubiert, der die LRP1 β-Kette (85 kDa) und C-terminalen Fragmente (LRP-CTF's, ~18 kDa) detektiert. Wie Abbildung 16A (untere Banden) zeigt, veränderte der Plasminogenaktivator weder die LRP1 Proteinexpression noch die Prozessierung der β-Kette in C-terminale Fragmente, da keine Unterschiede in der jeweiligen Proteinrate entdeckt werden konnten. Somit kann eine proteolytische Aktivität von tPA auf LRP1 ausgeschlossen werden.

### 4.3. Identifizierung von LRP1 als Hauptrezeptor für die tPA-vermittelte Erk1/2 Aktivierung

Um sich der Frage zu stellen, ob der beobachtete RAP-Effekt bezüglich der Erk1/2 Phosphorylierung tatsächlich auf eine Blockade des LRP1 und nicht auf eine der anderen LDL-Rezeptor Familienmitglieder zurückzuführen ist, wurde eine etablierte, vektor-basierte shRNA *knock-down* Strategie angewandt, um die genspezifische LRP1 Proteintranslation zu inhibieren (Laatsch et al. 2004).

Wie in Abbildung 17A zu erkennen ist, führt die Transfektion der Zellen mit dem shLRP1 Plasmid zu einer deutlichen Reduktion der LRP1  $\beta$ -Kette im Vergleich zur Vektorkontrolle. Zur Quantifizierung des Protein *knock-downs* wurde die Expressionsstärke der LRP1  $\beta$ -Kette zu der des Actins relativiert. Die Auswertung ergibt eine Reduktion der Proteinrate um 70% (Abb. 17B; \* $p < 0,05$  vs. vector;  $n=3$ ).



**Abb 17: Knock-down des LRP1 Proteins mit einem *short hairpin* LRP1 Plasmid (shLRP1) resultiert in verminderter Erk1/2 Phosphorylierung.**

(A) Western Blot Analyse der reduzierten LRP1  $\beta$ -Ketten Expression (85kDa) nach 72h Transfektion mit dem shLRP1 Plasmid oder der Leervektorkontrolle in HT22 Zellen. (B) Die Quantifizierung des *knock-downs* der LRP1  $\beta$ -Kette normalisiert gegen Actin ergibt eine Reduktion der Proteinexpression um annähernd 70% (\* $p < 0,05$  vs. vector,  $n=3$ ). (C) Markante Abnahme der tPA-induzierten Erk1/2 Phosphorylierung in den shLRP1 knock-down (72h) Zellen verglichen mit der Vektorkontrolle.

Nachfolgende Stimulation mit tPA führt zu einer fast vollständigen Aufhebung der Erk1/2 Phosphorylierung in den transfizierten Zellen (Abb. 17C, Spur 5). Es ist zu betonen, dass die Western Blots zur Kontrolle des genspezifischen LRP1 *knock-*

*downs* und zur Bestimmung der Erk1/2 Aktivierung selbstverständlich mit dem identischen Zelllysate eines Versuches durchgeführt wurden.

Zusammengenommen implizieren diese Daten, dass die Beteiligung anderer Lipoproteinrezeptoren ausgeschlossen werden kann und LRP1 spezifisch für die tPA-induzierte MAP Kinasen Aktivierung verantwortlich ist, indem es das extrazelluläre Signal des Liganden von der Zelloberfläche ins Zytoplasma weiterleitet und dort eine Signaltransduktionskaskade auslöst. Somit wäre ein weiteres Indiz dafür geschaffen, dass dieser Lipoproteinrezeptor nicht nur eine Funktion im Cholesterinstoffwechsel ausübt, sondern auch für die neuronale Signalweiterleitung im Gehirn von immenser Bedeutung ist.

#### **4.4. Beteiligung von NMDA Rezeptoren an der tPA-induzierten MAP Kinasen Aktivierung**

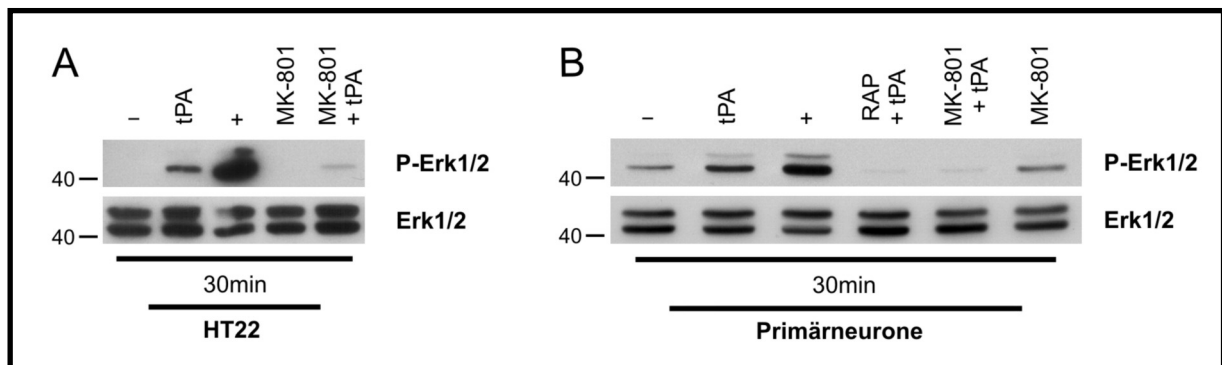
Da postuliert wurde, dass tPA sein Signal auch über direkte Bindung an den NMDA Rezeptor ins Zellinnere transduzieren könnte (Nicole et al. 2001; Fernandez-Monreal et al. 2004a; Pawlak et al. 2005), sollte die Rolle dieses ionotropen Glutamt Rezeptors im vorliegenden Modellsystem näher untersucht werden.

##### **4.4.1. Blockade durch MK-801, ein Kanalöffnungsblocker**

Zum Nachweis der Beteiligung des NMDA Rezeptors in der tPA-vermittelten Erk1/2 Aktivierung wurden die Zellen vor der tPA Stimulation mit dem NMDA Rezeptor Inhibitor MK-801 (10 $\mu$ M, 15min) inkubiert. Dieser nicht-kompetitive Inhibitor blockiert den Calcium Einstrom durch den Ionenkanal, indem er in der Pore bindet und sie somit für Ionen undurchlässig macht.

In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Studien konnte tatsächlich eine Reduktion der tPA-vermittelten Erk1/2 Phosphorylierung beobachtet werden, wenn die Zellen zuvor mit MK-801 inhibiert wurden. Im Vergleich zur nicht-inhibierten tPA Stimulation war ein deutlicher Rückgang des phosphorylierten Erk1/2 Signals zu verzeichnen. Diese Reaktion erfolgte sowohl in HT22 Zellen (Abb. 18A, Spur 5) als auch in Primärneuronen (Abb. 18B, Spur 5). Interessanterweise ist diese MK-801-vermittelte Reduktion der aktivierten Erk1/2 Kinase vergleichbar mit dem zuvor beobachteten RAP-Effekt (Abb. 18B, Spur 4 und 5).

Daraus lässt sich schließen, dass diese beiden Effekte entweder parallel auf zwei verschiedenen Reaktionswegen entstehen, oder aber aufeinanderfolgen. Letzteres würde bedeuten, dass LRP1 und der NMDA Rezeptor in dieser Signaltransduktionskaskade synergistisch arbeiten.

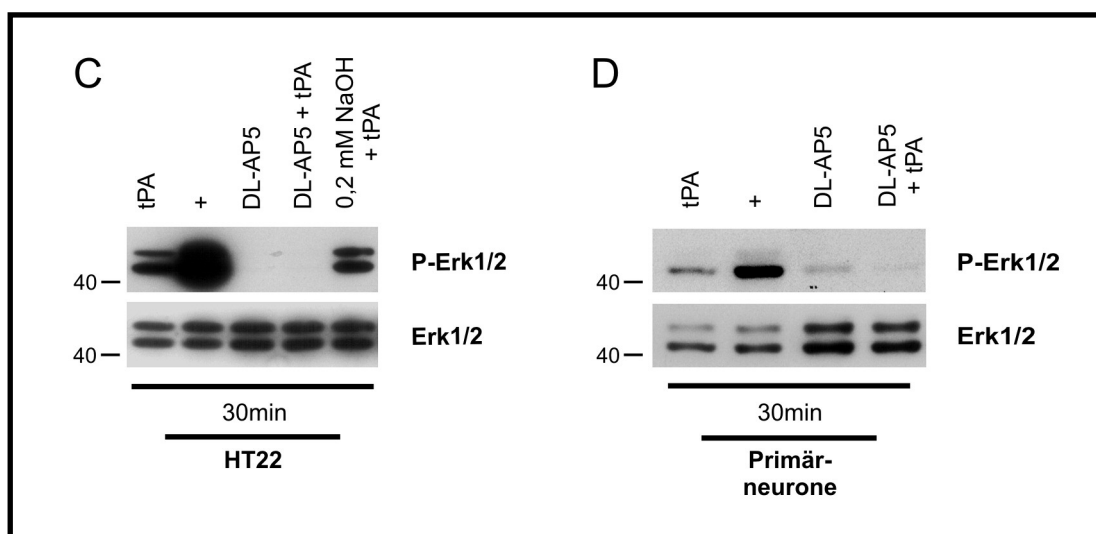


**Abb. 18A-B: MK-801 verhindert die tPA-induzierte Erk1/2 Phosphorylierung.**

(A) Vorinkubation von HT22 Zellen mit dem NMDA Rezeptor Kanalöffnungsblocker MK-801 (10 $\mu$ M) für 15min und anschließende tPA Stimulation resultieren in stark reduzierter Erk1/2 Phosphorylierung verglichen mit den nicht-inhibierten Zellen. (B) RAP (500nM), der Lipoproteinrezeptor Ligandenbindungsblocker und MK-801 (10 $\mu$ M), der NMDA Rezeptor Inhibitor reagieren mit einer fast identischen Reduktion der Erk1/2 Phosphorylierung auf tPA Stimulation in primären hippocampalen Neuronen.

#### 4.4.2. Blockade durch DL-AP5, ein kompetitiver Antagonist

Um sicherzustellen, dass MK-801 tatsächlich spezifisch den NMDA Rezeptor blockiert, wurde ein zweiter Inhibitor aus einer anderen Wirkstoffklasse verwendet. DL-AP5 ist ein kompetitiver NMDA Rezeptor Antagonist, der mit Glutamat um die Bindungsstelle am NMDA Rezeptor konkurriert und diese, wenn er im Überschuss vorhanden ist, verdrängt. Wie erwartet, führte die Vorinkubation mit DL-AP5 (100 $\mu$ M) in primären Neuronen ebenfalls zu einem deutlichen Rückgang des P-Erk1/2 Signals (Abb. 18D, Spur 4), in HT22 sogar zu einer kompletten Inhibition (Abb. 18C, Spur 4).



**Abb. 18C-D: DL-AP5 verhindert die tPA-induzierte Erk1/2 Phosphorylierung.**

(C) Präinkubation von HT22 Zellen mit 100 $\mu$ M DL-AP5, einem kompetitiven NMDA Rezeptor Antagonisten, für 5min resultiert in einer totalen Reduktion der Erk1/2 Phosphorylierung nach tPA Stimulation. 0,2mM NaOH diente als Lösungsmittelkontrolle für DL-AP5. (D) Verringerte Erk1/2 Phosphorylierung durch DL-AP5 kann auch in primären hippocampalen Neuronen nachgewiesen werden.

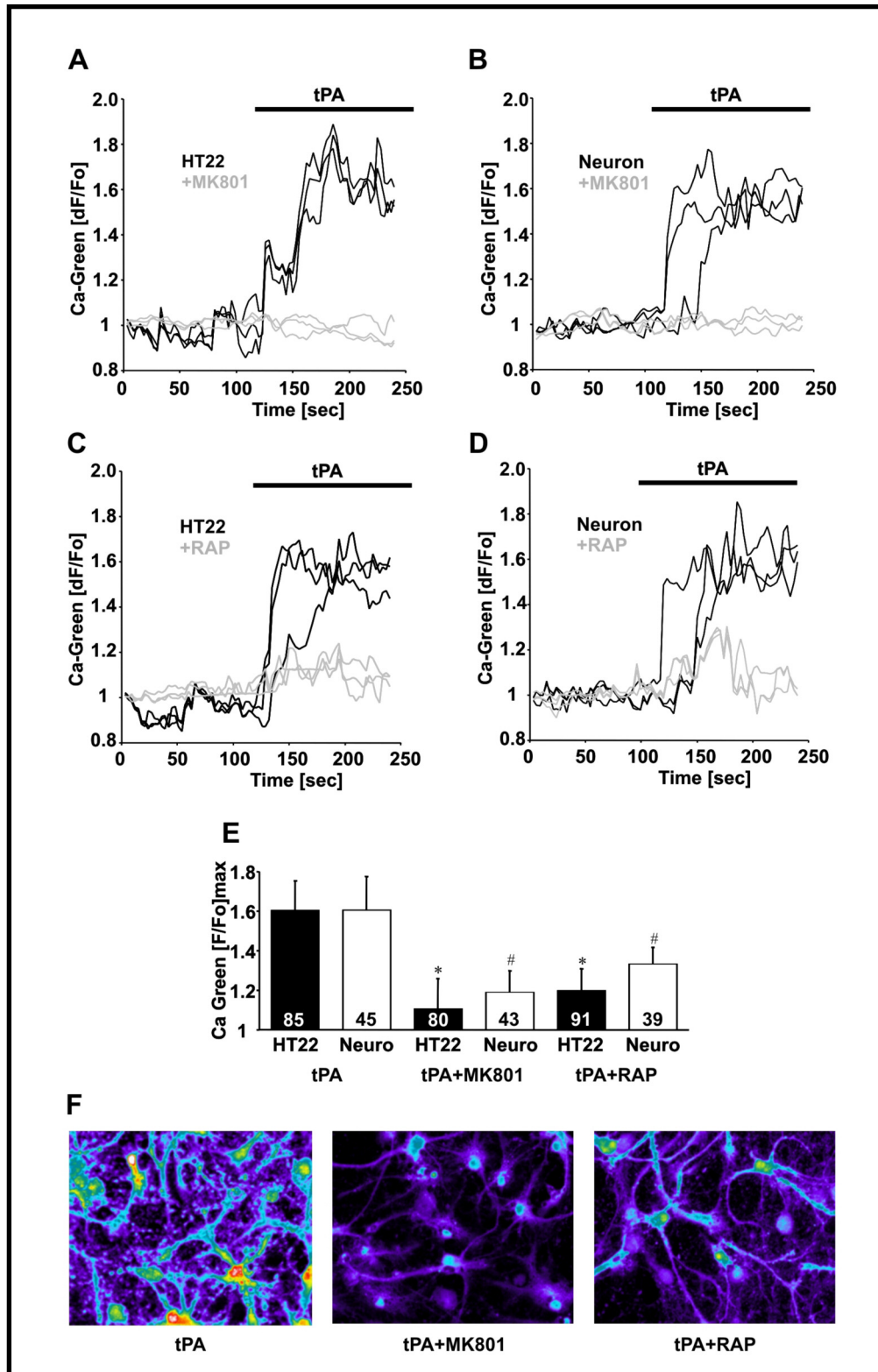
Die Inkubation mit 0,2mM NaOH plus tPA diene als Kontrolle und zeigt auf, dass die Inhibition nicht auf das Lösungsmittel des DL-AP5 zurückgeführt werden kann. Somit bestätigt auch die Verwendung des kompetitiven Antagonisten DL-AP5 die Beteiligung von NMDA Rezeptoren an der tPA-vermittelten Erk1/2 Aktivierung.

#### **4.5. Die Rolle von LRP1 und NMDA Rezeptoren im tPA-vermittelten *Calcium Signaling***

Weitere Beweise dafür, dass LRP1 in Kombination mit tPA zur Aktivierung von NMDA Rezeptoren führen kann, lieferten *Calcium Imaging* Experimente. Dabei wird die Veränderung des intrazellulären Calciumspiegels anhand der Reaktion eines Fluoreszenzfarbstoffs mit dem einströmenden Calcium im Zytosol der Zelle gemessen. Die Zugabe von tPA nach einem zweiminütigen Ruhevorlauf führte sowohl in HT22 Zellen (Abb. 19, A und C, schwarze Linien) als auch in Primärneuronen (Abb. 19, B und D, schwarze Linien) zu einem sofortigen Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Das Reaktionsmuster war in beiden Zelltypen sehr ähnlich und bestand aus einer initialen Peak- und nachfolgenden Plateauphase, welche einen typischen Verlauf für aktivierte NMDA Rezeptoren darstellen.

Dieser tPA-bedingte, intrazelluläre Calciumanstieg konnte verhindert werden, wenn die Zellen zuvor mit dem NMDA Rezeptor Antagonisten MK-801 vorinkubiert wurden (Abb. 19, A und B, graue Linien). Dies ist insofern nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass die Kanäle eben durch diesen Inhibitor blockiert sind und somit der Durchtritt von Calcium verhindert wird. Umso erstaunlicher war es jedoch zu beobachten, dass eine Vorinkubation beider Zelltypen mit dem LRP1 Ligandenbindungsblocker RAP einen ähnlichen Effekt aufweist (Abb. 19, C und D, graue Linien). Da bislang keine blockierende Aktivität von RAP auf den NMDA Rezeptor bekannt ist, muß diese über LRP1 wirken. Zur statistischen Auswertung der Daten wurde der maximale Calciumanstieg in den unterschiedlichen Bedingungen miteinander verglichen. Wie Abb. 19E zu entnehmen ist, wurde das Calciumsignal in beiden Zelltypen durch MK-801 oder RAP drastisch reduziert (\*<sup>und#</sup>p<0,05; n=43-91 Einzelzellen von mindestens drei unterschiedlichen Deckgläschen).

Somit scheint die Bindung von tPA an LRP1 innerhalb weniger Sekunden eine Aktivierung des NMDA Rezeptors mit anschließendem Calciumeinstrom auszulösen, wodurch sich die These einer funktionellen Kooperation zwischen LRP1 und dem NMDA Rezeptor in der tPA-vermittelten Calciumsignaltransduktion immer weiter manifestiert.



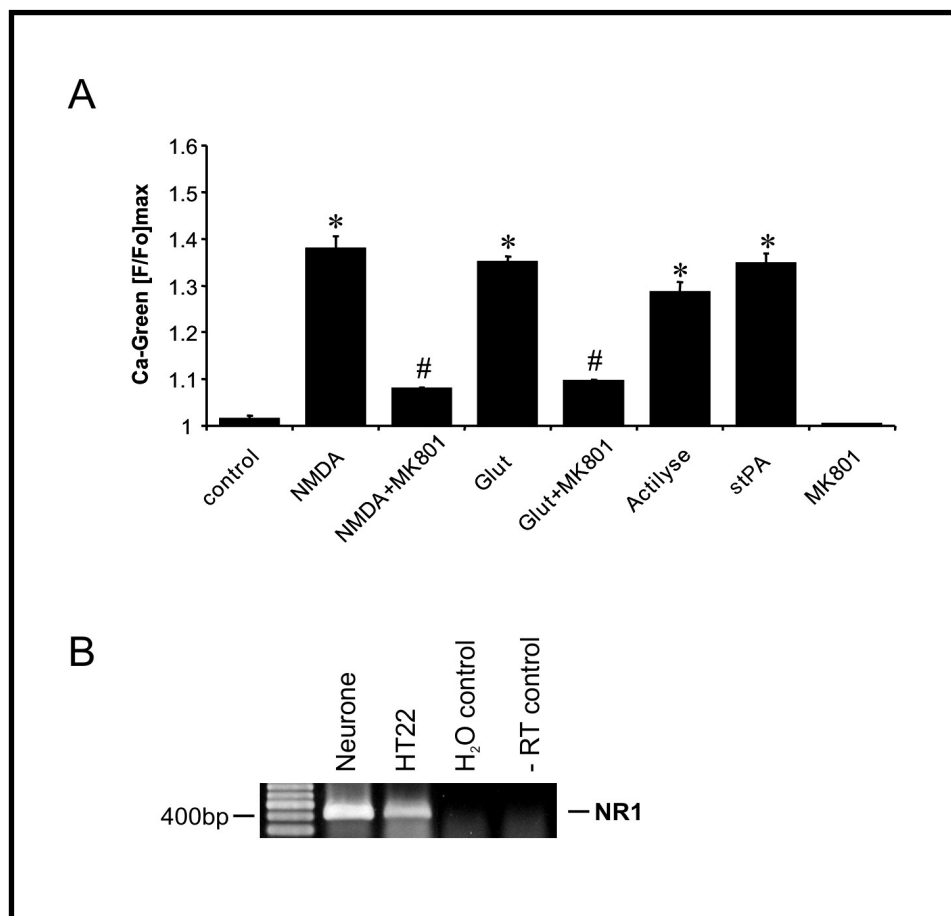
**Abb. 19: tPA-induziertes Calcium Signaling in primären hippocampalen Neuronen und HT22 Zellen.** Der Calcium Indikator Calcium Green wurde verwendet, um tPA-bedingte Änderungen des  $[Ca^{2+}]_i$  in HT22 Zellen (**A, C**) oder primären Neuronen (**B, D**) mittels konfokaler Lasermikroskopie zu analysieren (20x Vergrößerung). In **A-D** repräsentiert jede Spur eine Einzelzellmessung der Veränderung des  $[Ca^{2+}]_i$  im Soma nach tPA Behandlung (40 $\mu$ g/ml). Für jede Bedingung sind die Zeitverläufe des  $[Ca^{2+}]_i$  dreier repräsentativer Zellen desselben Bildausschnitts gezeigt. Messungen aus Zellen, die mit MK-801 (10 $\mu$ M; **A, B**) oder RAP (500nM; **C, D**) behandelt wurden, sind in grau dargestellt. Die entsprechenden repräsentativen Positivkontrollen derselben Kulturen sind in schwarz dargestellt. (**E**) Durchschnittsdaten aller Messungen: die maximale Calciumantwort nach tPA Zugabe war signifikant reduziert durch MK-801 oder RAP (n=43-91 Zellen; \*p<0,05 vs. tPA in HT22 Zellen; #p<0,05 vs. tPA in primären Neuronen). (**F**) Exemplarische Bilder des Calcium Imaging mittels konfokaler Lasermikroskopie in Neuronen: je farbiger die Zellkörper, desto mehr Calciumeinstrom erfolgte. Man beachte den inhibierenden Effekt von MK-801 und RAP.

Entgegen der verbreiteten Hypothese, dass HT22 Zellen keine NMDA Rezeptoren exprimieren (Davis and Maher 1994; Dargusch and Schubert 2002), wiesen die vorangegangenen *Calcium Imaging* Versuche jedoch darauf hin, da der Calciumeinstrom analog zu Primärneuronen spezifisch durch den Inhibitor MK-801 blockiert werden konnte. Hierbei sollte erwähnt werden, dass diese Hypothese zwar aufgestellt, aber nie durch Versuche belegt wurde. Um die Existenz funktioneller NMDA Rezeptoren in HT22 Zellen zu verifizieren, wurde diese mit NMDA oder Glutamat, den typischen NMDA Rezeptor Aktivatoren, behandelt und auf Calciumeinstrom hin getestet. Im Gegensatz zu den vorigen Versuchen, wurde das *Calcium Imaging* diesmal im 96-well Format im Fluoreszenzlesegerät, jedoch nach demselben Prinzip durchgeführt. Wie Abb. 20A zu entnehmen ist, führte die Stimulation mit NMDA oder Glutamat zu einem vergleichbaren Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels ( $\sim 1,4x$ ), wie er auch mit Actilyse (tPA) oder dem reinen tPA (stPA) beobachtet werden konnte (Balken 2, 4, 6 und 7). Dabei sind die Calcium Green Fluoreszenzintensitäten als maximale Fluoreszenzänderung im Verhältnis zur Anfangsfluoreszenz ( $[F/F_0]_{max}$ ;  $*p < 0,05$  vs. control;  $n=4$ ) berechnet. Da NMDA einen hochspezifischen Agonisten für den NMDA Rezeptor und keinen anderen ionotropen Glutamatrezeptor darstellt, müssen die beobachteten Effekte auf die Expression funktioneller NMDA Rezeptoren in HT22 Zellen zurückzuführen sein. Diese These wird zusätzlich noch untermauert durch die Tatsache, dass sowohl der Glutamat- als auch der NMDA-Effekt durch MK-801 inhibierbar sind (Balken 3 und 5;  $^{\#}p < 0,05$  vs. NMDA/Glutamat;  $n=4$ ).

Weitere Hinweise für die Existenz von NMDA Rezeptoren ergaben sich aus der reversen Transkription von HT22 mRNA mit anschließender PCR, in denen die mRNA Expressionsrate der NMDA Rezeptor Untereinheit 1 (NR1) in HT22 Zellen und primären Neuronen untersucht wurde. Das Ethidiumbromidgel zeigt für HT22 Zellen ein spezifisches cDNA-Signal auf einer Höhe von ca. 400bp, welches mit dem der primären Mausneuronen korreliert (Abb. 20B). Die aus den Primern berechnete Sequenz liegt bei 407bp und passt daher ideal zur Größe der beobachteten Bande. Als Negativkontrollen dienten zum einen  $H_2O$  als RNA-Ersatz und ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase.

Zusammengenommen ist davon auszugehen, dass HT22 Zellen tatsächlich funktionierende NMDA Rezeptoren exprimieren.





**Abb. 20: HT22 Zellen exprimieren funktionelle NMDA Rezeptoren.**

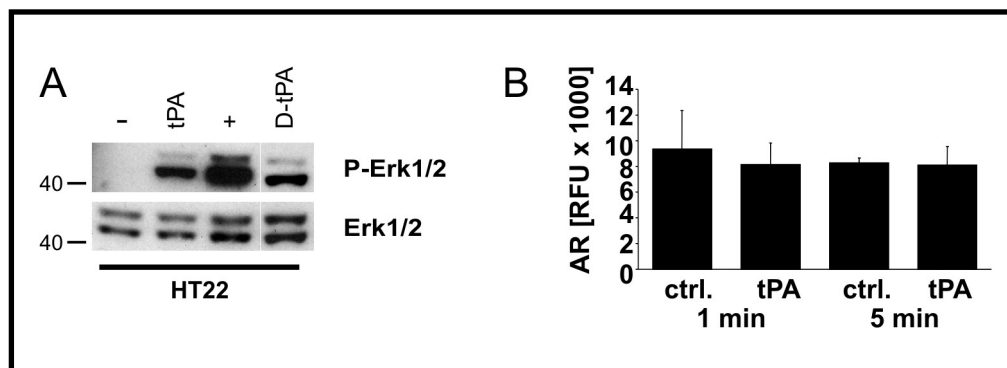
(A) In HT22 Zellen wurde der intrazelluläre Calcium<sup>2+</sup> Spiegel mit dem Fluoreszenzindikator Calcium Green gemessen. Farbstoffbeladene Zellen wurden mit NMDA (30µM), Glutamat (1mM), Actilyse (40µg/ml) oder stPA (10µg/ml) stimuliert. MK-801 (10µM) wurde 30min vorinkubiert. Die Calcium Green Fluoreszenzintensitäten sind berechnet als maximale Fluoreszenzänderung im Verhältnis zur Anfangsfluoreszenz ( $[F/F_0]_{max}$ ; \* $p < 0,05$  vs. control; # $p < 0,05$  vs. NMDA/Glutamat;  $n=4$ ). (B) RT-PCR mit NR1 Primern (Maus) aus 500ng HT22 mRNA ergibt ein cDNA Signal, das dem primärer Mausneurone entspricht. H<sub>2</sub>O und die Probe ohne Reverse Transkriptase (-RT) dienen als Negativkontrollen.

#### 4.6. Die Bedeutung von Glutamat in der tPA-vermittelten Signaltransduktion

In dieser Arbeit wurde größtenteils das etablierte Medikament Actilyse anstelle von reinem, synthetischen tPA (stPA) verwendet. Daher sollte ausgeschlossen werden, dass jenes mit niedermolekularen Zusätzen kontaminiert war. Dies wäre insofern von Bedeutung gewesen, als dass z.B. das Vorhandensein von Glutamat einerseits den NMDA Rezeptor direkt aktivieren könnte, andererseits eine Verunreinigung mit L-Arginin zur Generation von Stickstoffmonoxid (NO) durch die NO-Synthetase (NOS) und somit ebenfalls zu einer Aktivierung der MAP Kinase Kaskade hätte führen können (Kanterewicz et al. 1998). Deswegen wurde die gelöste Actilyse für einen Testversuch in einem Dialysierrohrchen mit einer

Ausschlussgröße von 12-14kDa gegen steriles H<sub>2</sub>O über Nacht dialysiert und auf HT22 Zellen eingesetzt. Nachfolgende Stimulation mit dem dialysierten tPA (D-tPA) resultierte in einer vergleichbaren Erk1/2 Phosphorylierung, wie sie auch mit normalem tPA beobachtet werden konnte (Abb. 21A, Spur 4).

Daraus ist zu folgern, dass die NMDA Rezeptor-vermittelte Erk1/2 Aktivierung tatsächlich durch tPA selbst und nicht durch einen niedermolekularen Zusatzstoff in der Actilyse ausgelöst wird.



**Abb. 21: Glutamat allein ist nicht der Auslöser der tPA-vermittelten NMDA Rezeptor Aktivierung.**

(A) HT22 Zellen weisen nach Stimulation mit dialysiertem tPA (D-tPA) einen vergleichbaren Effekt auf wie mit nicht-dialysiertem tPA. (B) Der Amplex Red Glutamate Assay zeigt keine L-Glutamate Freisetzung nach tPA Stimulation in HT22 Zellen. Die Daten sind dargestellt als relative Amplex Red (AR) Fluoreszenzeinheit (RFU) über die Zeit (n=4; \*p<0,05 vs. ctrl).

Da die *Calcium Imaging* Experimente in frischem HBSS Puffer und nicht in konditioniertem Medium, welches Spuren an endogenem Glutamat enthalten könnte, durchgeführt wurden, ist es eher unwahrscheinlich, dass Glutamat für die Aktivierung des NMDA Rezeptors verantwortlich ist. Um jedoch auszuschließen, dass der tPA-induzierte Calciumanstieg auf sekundärem Weg durch die Ausschüttung von endogenem Glutamat ausgelöst wurde, wurde die Glutamatkonzentration im Zellkulturmedium nach tPA-Stimulation gemessen. Weder nach 1min noch nach 5min konnte eine Ausschüttung von Glutamat in tPA-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten detektiert werden (Abb. 21B; \*p<0,05 vs. ctrl; n=4).

Somit kann eine tPA-induzierte Glutamatausschüttung, die sekundär NMDA Rezeptoren aktiviert, in dieser Versuchsreihe ausgeschlossen werden.

#### 4.7. PSD-95 als funktionelles Bindeglied zwischen LRP1 und dem NMDA Rezeptor

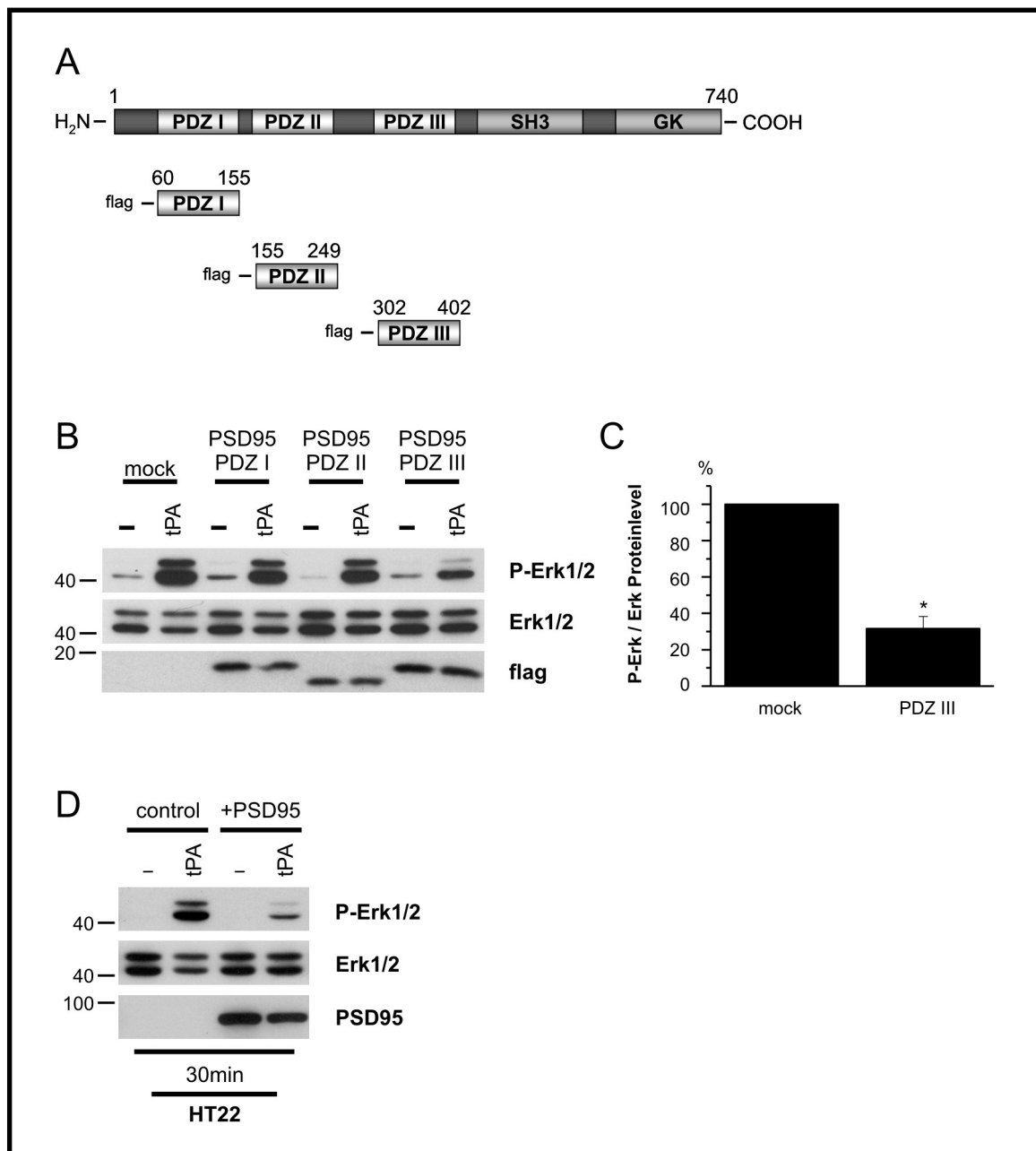
Der Mechanismus, der zu einer LRP1-vermittelten NMDA Rezeptor Aktivierung führen könnte, ist bislang noch ungeklärt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass diese beiden Rezeptoren an der Zelloberfläche intrazellulär durch Adapterproteine

miteinander verbunden sein könnten. Ein potentieller Kandidat ist das *post-synaptic density* Protein PSD-95, welches über seine drei PDZ-Bindedomänen sowohl an den C-Terminus von LRP1 als auch an den NMDA Rezeptor binden kann (May et al. 2004; Eugenin et al. 2007). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob PSD-95 oder ein anderes Adapterprotein als intrazelluläres Bindeprotein zwischen LRP1 und dem NMDA Rezeptor in der tPA-induzierten Erk1/2 Aktivierung in Frage kommt.

#### 4.7.1. Überexpression von PSD-95 und einzelnen PDZ-Domänen

Wenn die beiden Rezeptoren tatsächlich über ein Adapterprotein in Verbindung stehen, sollte das LRP1-vermittelte Signal zum NMDA Rezeptor unterbrochen werden können, wenn ein verkürztes Bindeprotein in den Zellen überexprimiert wird, welches zwar noch an LRP1, aber nicht mehr gleichzeitig an den NMDA Rezeptor binden kann. Dazu wurden drei verkürzte, mit einem *flag-tag* versehene PSD-95 Konstrukte generiert, welche für die einzelnen PDZ-Domänen kodieren (Abb. 22A). Abbildung 22B zeigt die Expressionsrate aller drei Konstrukte nach Transfektion (*flag*-Antikörper). Nur die Überexpression der PSD-95 PDZ III Domäne resultierte in einer deutlichen Reduktion der Erk1/2 Phosphorylierung nach tPA Behandlung verglichen mit der Vektorkontrolle und den ersten beiden PDZ Domänen (Abb. 22B, Spur 8). Die Quantifizierung ergibt eine Reduktion des Signals um ~70% in den PDZ III transfizierten Zellen verglichen mit der Kontrolltransfektion (Abb. 22C). Daraus ergab sich die Hypothese, dass die überexprimierte PDZ III Domäne entweder das endogene PSD-95 oder ein anderes Adapterprotein von der Bindungsstelle am LRP1 C-Terminus verdrängt und dadurch die Bildung eines LRP1-Adapterprotein-NMDA Rezeptor-Komplexes verhindert wird. Die Generation dieses Dreierkomplexes könnte eine Voraussetzung für die tPA-vermittelte NMDA Rezeptor Aktivierung mit nachfolgender MAP Kinase Signaltransduktion sein.

Andererseits könnte man erwarten, dass ein Überangebot an PSD-95 Gesamtprotein die Komplexbildung und nachfolgende Erk1/2 Aktivierung verstärkt, da mehr Moleküle vorhanden wären, die die beiden Rezeptoren verknüpfen könnten.



**Abb. 22: Der Einfluss von PSD-95 in der tPA-induzierten Erk1/2 Aktivierung.**

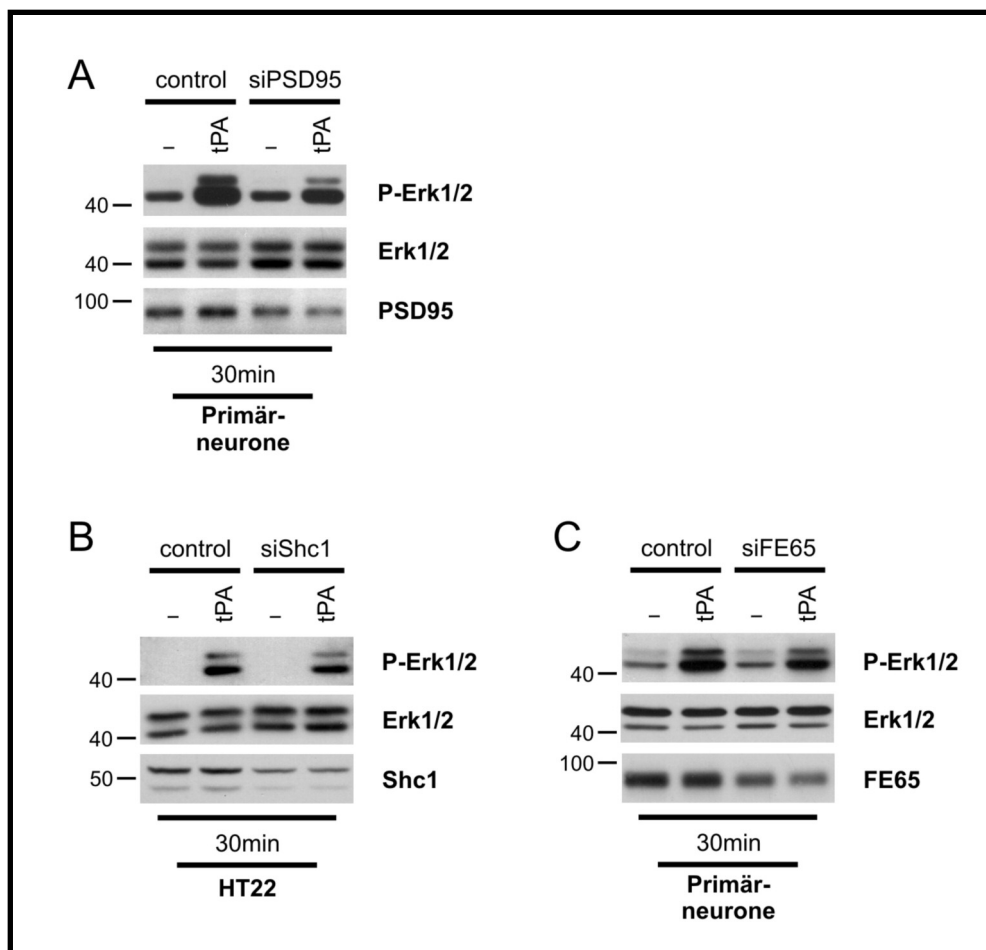
(A) Schematische Illustration der generierten PSD-95 PDZ Domänen. Die angezeigten Zahlen entsprechen den Aminosäuren der PSD-95 Sequenz aus der Ratte. (B) Die Überexpression der PSD-95 PDZ III Domäne in HT22 Zellen resultiert in einer verminderten Erk1/2 Phosphorylierung nach tPA Behandlung im Vergleich zu den anderen zwei Domänen und der Vektorkontrolle (pcDNA 3.1). Der Nachweis mit dem *flag*-Antikörper zeigt die Expression aller drei Konstrukte. (C) Die Quantifizierung des PDZ III Effekts zeigt eine 70%ige Reduktion der Erk1/2 Phosphorylierung (\* $p < 0,05$  vs. mock;  $n=3$ ). (D) Die Überexpression des PSD-95 Gesamtproteins resultiert in einer reduzierten Erk1/2 Aktivierung nach tPA Stimulation im Vergleich zur Kontrolltransfektion.

Um diese Hypothese zu testen, wurde ein Konstrukt in HT22 Zellen überexprimiert, welches für die Gesamtsequenz des PSD-95 Proteins kodiert. Die erfolgreiche Expression des Proteins konnte mit einem spezifischen Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 22D, untere Bande). Interessanterweise führte die nachfolgende tPA Stimulation in diesen Zellen entgegen der Erwartung

ebenfalls zu einer Reduktion der Erk1/2 Phosphorylierung (Abb. 22D, obere Banden). Im Hinblick auf die vorigen Versuche kann dieses Ergebnis nur dahingehend interpretiert werden, dass die intakten PSD-95 Proteine im Überschuss an beide Rezeptoren gleichzeitig binden und dadurch eine Bildung des Dreierkomplexes verhindert wird.

#### 4.7.2. Knock-down von Adapterproteinen PSD-95, SHC1 und FE65

Ähnlich der PSD-95 Überexpression konnte auch bei einem spezifischen siRNA *knock-down* von PSD-95 beobachtet werden, dass die Phosphorylierungsrate von Erk1/2 nach tPA Behandlung abnahm (Abb. 23A, Spur 4).



**Abb. 23: Die Beteiligung weiterer Adapterprotein für LRP1 an der tPA-induzierten Erk1/2 Aktivierung.**

(A) siRNA *knock-down* von PSD-95 (40nM) in Primärneuronen reduziert die tPA-induzierte Erk1/2 Aktivierung. (B) siRNA *knock-down* von Shc1 (20nM) in HT22 Zellen hat keinen Effekt auf die tPA-induzierte Erk1/2 Aktivierung. (C) *Knock-down* von FE65 mit transfizierter siRNA (100nM) hat keine Auswirkungen auf die tPA-induzierte Erk1/2 Aktivierung in primären hippocampalen Neuronen.

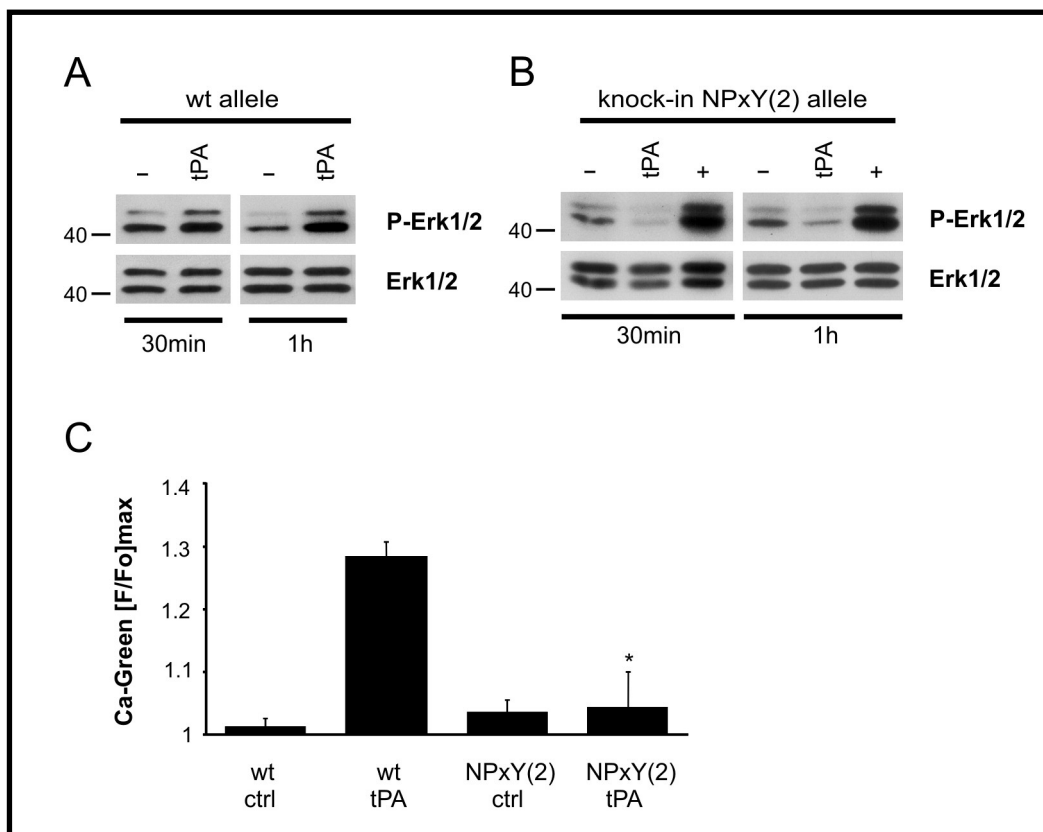
Dabei könnte die Reduktion der PSD-95 Proteinrate (Abb. 23A, untere Bande) ebenfalls zu einer geringeren Komplexbildung an der Zelloberfläche und somit einer geringeren Erk1/2 Aktivierung führen.

Um zwei andere, bekannte Adapterproteine von LRP1, Shc und FE65, in der tPA-vermittelten Erk1/2 Aktivierung auszuschließen, wurde die Expressionsrate dieser beiden Proteine ebenso mit Hilfe spezifischer siRNA Oligomere vermindert (Abb. 23, B und C, untere Banden). Nachfolgende tPA Stimulation erzeugte keine prägnante Änderung der Erk1/2 Aktivierung verglichen mit der Negativkontrolle (Abb. 23, B und C, obere Banden).

Zusammengenommen lässt sich daraus schließen, dass diese beiden Adapterproteine im Gegensatz zu PSD-95 keine Funktion in unserem Modellsystem besitzen.

#### **4.8. Identifizierung der distalen NPxY Domäne der intrazellulären LRP1 $\beta$ -Kette als Vermittlerin der tPA-induzierten Signaltransduktionskaskade**

Als potentielle Bindungsstellen für intrazelluläre Adapterproteine, welche LRP1 mit dem NMDA Rezeptor verbinden, kommen prinzipiell zwei Domänen in Frage, NPxY(1) und NPxY(2). Beide befinden sich am C-Terminus der LRP1  $\beta$ -Kette, welche ins Zytosol hineinragt. Um die Domäne, die als Andockstelle für das Adapterprotein dient, näher zu identifizieren, bediente man sich einer *knock-in* Strategie. In einer 2006 veröffentlichten Studie wurden mittels der *Recombinase-Mediated Cassette Exchange (RMCE)* Technologie mutante LRP1 *knock-in* Mäuse generiert (Roebroek et al. 2006). Mutationen wurden entweder ins erste (NPTY  $\rightarrow$  AATA) oder zweite (NPVYATL  $\rightarrow$  AAVAATL) NPxY Motiv der intrazellulären Domäne von LRP1 eingeführt. Interessanterweise weisen die homozygoten Mäuseembryonen des proximalen NPxY *knock-in* einen lethalen Phänotyp auf und sterben noch vor der Geburt, während die Mäuse mit einer mutierten distalen NPxY Domäne einen normalen, fertilen Phänotyp aufzeigen. Viele Publikationen postulierten bereits, dass die distale NPxY(2) Domäne mit verschiedenen zytosolischen Adapterproteinen interagieren kann (Pietrzik et al. 2004; Harris-White and Frautschy 2005). Daher wurden für die folgenden Experimente primäre, hippokampale Neurone aus Embryonen der NPxY(2) Mutanten generiert, um weitere Erkenntnisse über die Funktion der distalen NPxY(2) Domäne in der Verbindung von LRP1 zum NMDA Rezeptor zu erlangen. Nach Stimulation mit tPA wiesen die Neuronen der NPxY(2) mutierten Mäuse (Abb. 24B, mittlere Spuren) in der Tat einen deutlichen Rückgang der Erk1/2 Phosphorylierung auf verglichen mit den Wildtypneuronen (wt) (Abb. 24A, rechte Spuren). Bei genauerer Betrachtung scheint das Signal sogar noch unter dem der Negativkontrolle zu liegen.



**Abb. 24: Das distale NPxY Motiv im intrazellulären C-Terminus von LRP1 ist wichtig für die NMDA Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion.**

(A) Primäre hippocampale Neurone aus Wildtypmäusen zeigen einen Anstieg der Erk1/2 Phosphorylierung nach tPA Stimulation. (B) Entsprechende Neurone aus mutierten NPxY(2) Embryonen weisen keinen Anstieg, sondern eine Reduktion der Erk1/2 Phosphorylierung verglichen mit der Negativkontrolle auf. (C) In selbigen Neuronen wurde die intrazelluläre Calciumrate mittels des Fluoreszenzindikators Calcium Green analysiert. Farbstoffbeladene Wildtyp- oder Mutantenzellen wurden mit tPA oder Kontrollagenzien stimuliert. Die Fluoreszenzintensitäten wurden ermittelt als maximale Fluoreszenzänderung im Verhältnis zur Startfluoreszenz ([F/Fo]max; \*p<0,05 vs. wt tPA; n=4).

Die Ergebnisse des Western Blots auf Erk1/2 Ebene konnten zudem durch Calciummessungen in selbigen Primärneuronen bestätigt werden, denn tPA-stimulierte NPxY(2) Neurone wiesen auch einen verminderten Calciumeinstrom im Vergleich zu Wildtyp (wt) Neuronen auf (Abb. 24C; \*p<0,05 vs. wt tPA, n=4).

Diese Ergebnisse bekräftigen die Wichtigkeit einer funktionellen LRP1 NPxY(2) Domäne in der tPA-induzierten Aktivierung des NMDA Rezeptors mit nachfolgender Signaltransduktion, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit über das Adapterprotein PSD-95 vermittelt wird.

## 5. Diskussion

Auf der Suche nach einem Rezeptor, der an der tPA-vermittelten Aktivierung einer intrazellulären Signaltansduktionsmaschinerie beteiligt sein könnte, wurden bisher zwei potentielle Kandidaten ins Visier genommen, LRP1 und der NMDA Rezeptor. In Bezug auf den NMDA Rezeptor wurden zwei verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, wie die Signalweiterleitung in primären Neuronen funktionieren könnte. Die Arbeitsgruppe um Nicole postuliert, dass tPA extrazellulär mit seiner katalytischen Domäne an die NR1 Untereinheit des NMDA Rezeptors binden kann. Dieser Hypothese liegen Co-Immünpräzipitationen zugrunde, in denen sowohl tPA mit einem NR1 Antikörper als auch NR1 mit einem tPA Antikörper präzipitiert werden konnten. Eine Bindung von tPA an die NR2A Untereinheit wurde ebenfalls beobachtet, sie fiel jedoch sehr viel schwächer aus. Weiterhin wurde deutlich, dass diese Bindung über die katalytische Domäne von tPA erfolgen musste, da sie mit dem tPA-Inhibitor PAI-1 blockiert werden konnte. Die proteolytische Aktivität von tPA als Serinprotease nimmt in diesem Modell einen besonderen Stellenwert ein, da sie den N-Terminus an einem bestimmten Argininrest (Arg260) spalten kann und es dadurch zu einer Potenzierung des NMDA-induzierten Calciumeinstroms kommt. Inwiefern die Abspaltung eines ca. 28kDa großen, extrazellulären Fragmentes der NR1 Untereinheit jedoch zu einem erhöhten Calciumeinstrom führen kann, bleibt zu diskutieren (Nicole et al. 2001; Fernandez-Monreal et al. 2004a; Fernandez-Monreal et al. 2004b).

Der zweite vorgeschlagene Mechanismus kommt von der Arbeitsgruppe um Medina, die zeigte, dass tPA die Aktivierung der Erk1/2 Signalkaskade einleiten kann, welche zwar den NMDA Rezeptor involviert, jedoch unabhängig von der proteolytischen Aktivität des Plasminogenaktivators ist. Dies konnte anhand der Verwendung einer katalytisch inaktiven Mutante von tPA (tPAS478A), bei der das Serin im aktiven Zentrum durch Alanin ersetzt wurde, demonstriert werden. Stimulation von hippokampalen Neuronen mit dieser Mutante führte ebenso zu einer Aktivierung der MAP Kinase wie katalytisch aktives (Medina et al. 2005). Nimmt man an, dass die Erk1/2 Phosphorylierung durch eine vorherige Aktivierung des NMDA Rezeptors eingeleitet wird (Sweatt 2001; Krapivinsky et al. 2003), kann eine proteolytische Spaltung des NMDA Rezeptors als Ursache für erhöhte Calciumdurchlässigkeit und nachfolgender Erk1/2 Aktivierung somit in diesen Versuchen ausgeschlossen werden. Eine andere Hypothese besagt, dass die proteolytische Aktivität von tPA bei der Umwandlung von Plasminogen in Plasmin eine Rolle spielen könnte und Plasmin als Endprodukt der eigentliche Initiator der MAP Kinasen Aktivierung ist. Dies konnte jedoch widerlegt werden, da eine Stimulation mit Plasmin alleine keinen Effekt auf die Phosphorylierungsrate



von Erk1/2 hatte (Medina et al. 2005). Da das extrazelluläre tPA-Signal nur über einen Rezeptor ins Zellinnere transferiert werden kann, wurde die Beteiligung zweier tPA Rezeptoren im vorgestellten System untersucht. Zum einen der bereits postulierte NMDA Rezeptor, zum anderen Annexin II (Hajjar et al. 1994; Hajjar et al. 1998; Siao and Tsirka 2002). Die Beteiligung des Ersteren konnte durch Blockade mit MK-801 nachgewiesen werden. Die Inhibierung von Annexin II mit Homocystein, einer Aminosäure, die die Bindung von tPA an Annexin II verhindert, hatte jedoch keinen Effekt auf die Erk1/2 Aktivierung und weist diesem Rezeptor demnach keine funktionelle Bedeutung in der tPA-induzierten Signaltransduktion zu (Medina et al. 2005).

Somit zeigen zwei unterschiedliche Studien eine Rolle für den NMDA Rezeptor als Vermittler der tPA-induzierten Signalweiterleitung auf. Andere jedoch postulieren LRP1 als Hauptrezeptor für tPA-Bindung mit nachfolgender Signaltransduktion.

Zu ihnen gehört unter anderem die Studie von Zhuo, welche die Rolle von LRP1 in der tPA-vermittelten L-LTP (*late-phase long term potentiation*) im Hippokampus beleuchtet. Darin wurde gezeigt, dass durch kompetitive Bindung von RAP, dem *Receptor-associated Protein*, an die Ligandenbindungsdomänen von LRP1 eine durch exogenes tPA hervorgerufene, synaptische Potenzierung (gemessen als postsynaptische EPSP's) in hippokampalen Hirnschnitten tPA-defizienter Mäuse geblockt werden konnte (Zhuo et al. 2000). Dagegen hatte tPA keinen Effekt auf NMDA Rezeptor-vermittelte EPSP's. Gleichzeitig wurde getestet, ob RAP alleine auch eine inhibitorische Wirkung auf tetanisch stimulierte NMDA Rezeptoren ausübt. Dies konnte durch die Messung NMDA Rezeptor-spezifischer Signale in Gegenwart von RAP verneint werden. Es ist bekannt, dass die Anschaltung des cAMP/PKA Signalweges eine entscheidende Rolle bei der Induktion der L-LTP spielt (Abel et al. 1997). Daher wurde untersucht, ob tPA die PKA Aktivität verstärken kann. In der Tat führte die Inkubation primärer hippokampaler Neurone mit tPA zu einer erhöhten PKA Aktivität im Zelllysat, welche durch Vorinkubation mit RAP blockiert werden konnte. Im Gegensatz zu einer früheren Hypothese, dass die Induktion der L-LTP eine Aktivierung des NMDA Rezeptors erfordert (Qian et al. 1993), scheint mit der neu entdeckten Funktion von LRP1 in der L-LTP überholt zu sein.

Detailliertere Einblicke in den Mechanismus der Signalweiterleitung über LRP1 kommen aus der Arbeitsgruppe um Hu und Liu. Sie schlagen vor, dass tPA neben seiner Proteasefunktion im Prinzip wie ein Zytokin funktioniert: es bindet an den Zellmembranrezeptor LRP1, welcher eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade induziert, an deren Ende die spezifische Genexpression von MMP-9 steht. Auch hier konnte mit Plasmininhibitoren und dem katalytisch inaktiven tPA gezeigt werden, dass dieser Effekt unabhängig von der Plasminproduktion ist und wahrscheinlich nur durch reine Ligandenbindung

induziert wird. Die Weiterleitung eines extrazellulären Signals an die Signaltransduktionsmaschinerie im Zytoplasma funktioniert in der Regel über Tyrosinphosphorylierungen. Tatsächlich konnte bereits nach ca. 30sec tPA-Stimulation eine Tyrosinphosphorylierung an der LRP1  $\beta$ -Kette festgestellt werden, welche zu einer Aktivierung der nachfolgenden MEK1 (MAP Kinase Kinase) und Erk1/2 (MAP Kinase) führte (Hu et al. 2006). Manche Rezeptoren, z.B. EGFR, besitzen intrinsische Kinaseadomänen an ihren intrazellulären C-Termini und sind in der Lage, sich nach Dimerisierung gegenseitig zu phosphorylieren (Schlessinger 2002). Da LRP1 selbst keine Kinaseaktivität besitzt, muss die Phosphorylierung von einer anderen Kinase übernommen werden, die jedoch noch nicht genau identifiziert ist. Ist ein Tyrosin am LRP1 C-Terminus einmal phosphoryliert, kann es z.B. von dem Adapterprotein Shc gebunden werden, welches das Signal dann über die Grb/Sos/Ras/MAP Kinase Kaskade weitergibt (Barnes et al. 2001; May and Herz 2003). Inwiefern die Phosphorylierung an LRP1 für die Bindung anderer Adapterproteine wie PSD-95 oder FE65 jedoch Voraussetzung ist, ist noch nicht hinreichend geklärt.

Im Gegensatz zu den vorigen Studien wurden diese Untersuchungen nicht in neuronalen Zellen, sondern in interstitiellen Nierenfibroblasten durchgeführt. Dennoch lassen sich diese Ergebnisse auch auf neuronale Zellen übertragen, da man in einer früheren Studie über Mausmodelle mit fokaler zerebraler Ischämie ebenfalls eine tPA-induzierte Überexpression von MMP-9 beobachten konnte, die durch LRP1 vermittelt wird und aller Wahrscheinlichkeit nach größere Hirnschädigungen aufgrund einer übermäßigen Degradation der extrazellulären Matrix zur Folge hat (Wang et al. 2003).

Somit wurde gezeigt, dass tPA über LRP1 auch ohne die Beteiligung von NMDA Rezeptoren eine Signaltransduktionskaskade auslösen kann. Trotz der allgemeinen Übereinstimmung der stimulatorischen Rolle von tPA in neuronalen Zellen wird der zu Grunde liegende Mechanismus kontrovers diskutiert und bedarf einer weiteren Aufklärung.

Daher wurde diese Studie durchgeführt, um die Frage zu klären, über welchen Mechanismus die tPA-induzierte Signalvermittlung in Neuronen erfolgt und inwiefern die Oberflächenrezeptoren LRP1 und NMDA Rezeptor daran beteiligt sind, tPA zu binden und das Signal in die Zelle zu transferieren.

## 5.1. Die Beteiligung von LRP1 und dem NMDA Rezeptor in der tPA-induzierten Signaltransduktion

### 5.1.1. Aktivierung der MAP Kinasenkaskade

Als Indikator für tPA-induziertes *downstream signaling* wurde die Phosphorylierung der MAP Kinase Erk1/2 studiert, wie es bereits von Medina und Hu beschrieben worden war (Medina et al. 2005; Hu et al. 2006). Tatsächlich konnte tPA die Aktivierung von Erk1/2 in neuronalen Zellen induzieren, und es stellte sich heraus, dass diese Phosphorylierung direkt von der MEK1, der MAP Kinase Kinase, die sich in der Kaskade oberhalb von Erk1/2 befindet, durchgeführt wurde. Um herauszufinden, ob das Signal über LRP1 oder den NMDA Rezeptor vermittelt wird, inkubierte man diese Zellen mit RAP, welches die Ligandenbindung an LRP1 blockiert. In der Tat führte diese Blockade zu einer Aufhebung der tPA-vermittelten Erk1/2 Phosphorylierung. Da RAP selbst aber nicht an tPA binden kann (Willnow et al. 1996a; Zhuo et al. 2000), muss der beobachtete Effekt auf eine Inhibition des LDL-Rezeptors und nicht auf eine inhibierte Bindung von tPA an den NMDA Rezeptor zurückgeführt werden, wie man der postulierten Methode von Nicole nach vermuten könnte (Nicole et al. 2001). Da diese Gruppe einen proteolytischen Effekt von tPA auf den NMDA Rezeptor beobachten konnte, der in der Abspaltung eines N-terminalen Fragmentes der NR1 Untereinheit resultierte, war es interessant zu schauen, ob es einen ähnlichen Effekt auch bei LRP1 gab. Die Untersuchung der LRP  $\beta$ -Kette und der C-terminalen Spaltfragmente wies jedoch ein typisches Bandenmuster auf und ließ keine veränderte Prozessierung von LRP durch tPA erkennen.

Auch wenn RAP ein potenter Ligandenblocker für LRP1 ist, so muss man dennoch beachten, dass es auch die Substratbindung an andere Lipoproteinrezeptoren der Genfamilie inhibieren kann. Um sicherzugehen, dass die Blockade der Aktivierung von Erk1/2 durch RAP LRP1-spezifisch ist, wurde ein shRNA Plasmid für LRP1 in Zellen transfiziert, um die Expression des Proteins effizient auszuschalten. Dazu wurden verschiedene Transfektionsbedingungen ausgetestet und die beste resultierte in einer 70%igen Reduktion der LRP1 Proteinrate. Das Problem hierbei lag an der langen Halbwertszeit des Rezeptors (Guenette et al. 2002), der sich durch immer wiederkehrende Endozytose und Recycling an die Zelloberfläche sehr lange in verschiedenen Zellkompartimenten aufhalten kann, bis er endlich neu transkribiert wird und somit als mRNA für den RISC Komplex als Spaltsubstrat zur Verfügung steht. Nichtsdestotrotz reichte der Protein *knock-down* aus, um bei einer anschließenden Stimulation der Zellen mit tPA eine erniedrigte Phosphorylierungsrate von Erk1/2 zu bewirken und somit die Spezifität von LRP1 zu bestätigen. Dieser Versuch lieferte ein weiteres Mosaiksteinchen in der

Beweisführung, dass doch eher LRP1 als Hauptbindepartner für tPA in Neuronen fungiert und die nachfolgende Signalkaskade aktiviert als der NMDA Rezeptor. Dennoch sollte eine potentielle Beteiligung von NMDA Rezeptoren nicht kategorisch ausgeschlossen werden. Daher wurde in Analogie zu den Versuchen von Medina und Kollegen (Medina et al. 2005) ebenfalls der Einfluss des NMDA Rezeptor Kanalblockers MK-801 auf die tPA-induzierte Erk1/2 Aktivierung untersucht. Es zeigte sich, dass deren Ergebnisse bestätigt werden konnten, was einen Ausschluss des NMDA Rezeptors unmöglich machte. Dies wurde zusätzlich durch die Verwendung des Glutamatantagonisten DL-AP5, der den NMDA Rezeptor nicht in der Pore, sondern an der Außenseite angreift, bekräftigt. Auch die Beobachtung, dass die tPA-vermittelte Anschaltung der MAP Kinase Kaskade offensichtlich nur in neuronalen Zellen und nicht in CHO-K1 Epithelzellen funktionierte, ließ auf die Notwendigkeit eines neuronalen Mediators schließen. Aber die Tatsache, dass die beobachtete Reduktion in der Erk1/2 Phosphorylierung durch MK-801 nahezu identisch mit der RAP-induzierten war, stellte ein erstes Indiz für eine funktionelle Interaktion der beiden Rezeptoren in der tPA-Signalkaskade zu gleichen Teilen dar.

### **5.1.2. Induktion des Calciumeinstroms**

Weitere Beweise für die Beteiligung von NMDA Rezeptoren in der tPA-vermittelten, neuronalen Signalweiterleitung kamen aus *Calcium Imaging* Experimenten, in denen der intrazelluläre Anstieg von Calcium in neuronalen Zellen mit dem Fluoreszenzmarker Calcium Green gemessen wurde. Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb weniger Sekunden nach tPA-Stimulation ein starker Calciumeinstrom erfolgte, der von NMDA Rezeptoren ausgelöst werden musste, da er spezifisch mit MK-801 blockiert werden konnte. Die externe Blockade mit MK-801 schließt die Beteiligung anderer Calciumkanäle und eine Ausschüttung von Calcium aus intrazellulären Speichern wie dem Endoplasmatischen Reticulum aus. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass man bisher nur eine potenzierende Wirkung von tPA auf einen NMDA-induzierten Calciumeinstrom feststellen konnte, nicht jedoch einen direkten Effekt (Fernandez-Monreal et al. 2004b). Ein ähnliches Phänomen bezüglich der Potenzierung des Calciumeinstroms zeigte Bacskai bereits für einen anderen LRP1-Liganden,  $\alpha_2M^*$  (Bacskai et al. 2000). Die Beteiligung dieses Liganden als Induktor der Aktivierung von Erk1/2 konnte jedoch in dieser Arbeit nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Von zentraler Bedeutung in der Aufklärung des Mechanismus der tPA-vermittelten Signaltransduktion war die Beobachtung, dass die Induktion des Calciumeinstroms ebenfalls mit RAP, einem LDL-Rezeptor Inhibitor, geblockt werden konnte, und somit zum ersten Mal eine direkte Aktivierung eines

Calciumkanals durch tPA über LRP1 als Rezeptor postuliert werden kann. Es scheint, dass die Wirkung von tPA auf den NMDA Rezeptor wirklich nur dann existiert, wenn jenes zuvor von LRP1 abgefangen und gebunden wird. Die *Calcium Imaging* sprechen daher für einen tPA-LRP1-Komplex, der den Öffnungsmechanismus des NMDA Rezeptors auslösen kann.

In der Regel lassen sich NMDA Rezeptoren nur über die Bindung eines Aktivators, Glutamat oder NMDA, in Kombination mit dem Co-Agonisten Glycin und einer Vordepolarisation zur Aufhebung des Magnesiumblocks öffnen. Daher war es wichtig zu überprüfen, ob Glutamat bei der tPA-LRP1-induzierten NMDA Rezeptoraktivierung eine Rolle spielt. Da die *Calcium Imaging* Experimente in frischem, glutamatfreien Puffer durchgeführt wurden, ist es unwahrscheinlich, dass dieses maßgeblich für die Öffnung des Glutamatrezeptors verantwortlich zeichnet. Um jedoch auszuschließen, dass der Stimulus Actilyse eventuell mit Glutamat kontaminiert ist, wurde dieses mit einer Ausschlussgröße von 12-14kDa dialysiert, so dass das kleine Glutamatmolekül (~150Da) aus dem Ansatz herausdiffundieren konnte. Nachfolgende Stimulation von Zellen mit dem dialysierten tPA ergab dennoch eine Erk1/2 Aktivierung, welche somit nicht auf eine Glutamatkontamination zurückzuführen ist. Prinzipiell hätte es sein können, dass die Zellen auf tPA-Stimulation mit der Ausschüttung von endogenem Glutamat reagieren, welches sekundär den NMDA Rezeptor aktiviert. Mit Hilfe des *Amplex Red Glutamat Assays* konnte diese Möglichkeit widerlegt werden, da die Zellen nach Stimulation mit tPA nicht mit einer messbaren Glutamatausschüttung reagierten. Obwohl eine mögliche Rolle von Glutamat nicht komplett ausgeschlossen werden kann, liefern die dargestellten Versuche Argumente gegen solch einen Mechanismus.

Inwieweit eine Beteiligung von AMPA-Rezeptoren und dem Co-Agonisten Glycin in der NMDA Rezeptoraktivierung von Nöten ist, wurde in dieser Arbeit nicht mehr nachgegangen, aber es ist durchaus möglich, dass endogen sezerniertes Glycin eine Rolle spielt. Ebenso kann es sein, dass durch die normale Zellaktivität, bei der es zu einem ständigen Ein- und Ausstrom von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in Neuronen kommt, AMPA-Rezeptoren bereits angeschaltet sind (Vordepolarisation) und dies für eine Aufhebung des Magnesiumblocks der NMDA Rezeptoren ausreicht. Da jedoch bislang keine Wirkung von tPA auf AMPA-Rezeptoren bekannt ist und der Calciumeinstrom spezifisch mit MK-801 und RAP blockiert werden konnte, spricht dies für einen neuen, LRP1-vermittelten Mechanismus.

Aus den oben geschilderten Experimenten folgernd lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die intermolekulare Interaktion von tPA, LRP1 und NMDA Rezeptoren die Öffnung dieser Glutamatrezeptoren auslösen kann.

Auch wenn postuliert wurde, dass HT22 keine funktionellen NMDA Rezeptoren besitzen, konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass dies doch der Fall zu sein scheint und sie als geeignetes Ersatzmodell für primäre Neurone eingesetzt werden können. Erstens wiesen sie in den tPA-stimulierten *Calcium Imaging* Versuchen einen nahezu identischen Kurvenverlauf auf wie primäre Neurone, mit Anfangspeak und anschließender Plateauphase. Zweitens konnten sie spezifisch mit zwei voneinander unabhängigen NMDA Rezeptor Inhibitoren blockiert werden und drittens konnte die Expression der NR1 Untereinheit auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Den funktionellen Beweis jedoch lieferten die *Calcium Imaging* Versuche im 96-well Format, in denen HT22 Zellen sowohl auf NMDA, als auch auf Glutamat mit erhöhtem Calciumeinstrom reagierten, welcher mit MK-801 inhibiert werden konnte. Diese Daten demonstrieren eindeutig die Sensitivität des HT22 Systems für NMDA Rezeptor Agonisten und sind Beweis für die Expression funktioneller NMDA Rezeptoren.

## 5.2. Charakterisierung der Brücke zwischen LRP1 und dem NMDA Rezeptor

Was man aus den oben beschriebenen Experimenten bisher schließen kann, ist dass tPA wahrscheinlich erst an den Lipoproteinrezeptor LRP1 bindet und anschließend den NMDA Rezeptor rekrutiert, um einen Komplex zu formen, der eine Calcium-vermittelte Signaltransduktionskaskade mit anschließender Erk1/2 Aktivierung einleitet.

Wie das tPA Signal von LRP1 zum NMDA Rezeptor jedoch weitergeleitet wird, ist noch immer unklar. Es könnte entweder extrazellulär über eine Verbindung der N-Termini beider Rezeptoren transferiert werden oder intrazellulär über deren zytosolische C-Termini (Abb. 25).

Ein potentieller Kandidat für eine intrazelluläre Verbindung ist das Adapterprotein PSD-95, welches sowohl mit dem C-Terminus von LRP1 als auch mit dem NMDA Rezeptor interagieren kann (May et al. 2004). Interessanterweise ist für den NMDA Rezeptor eine Interaktion von PSD-95 mit den PDZ I und II Domänen

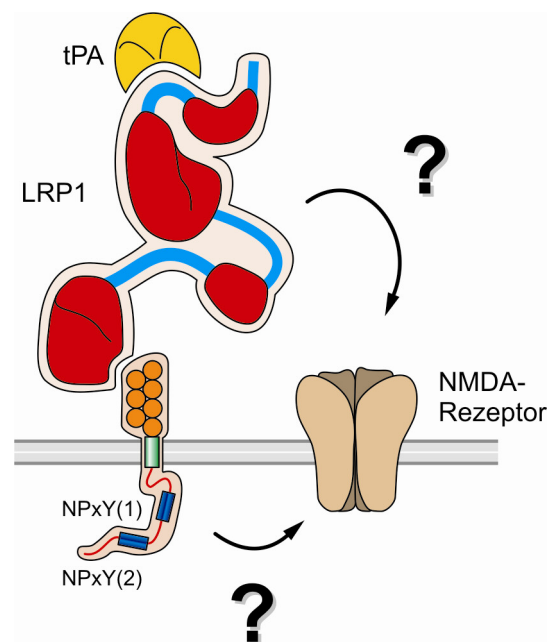


Abb. 25: Schematische Darstellung der Verbindungsmöglichkeiten zwischen LRP1 und dem NMDA Rezeptor – extrazellulär oder intrazellulär?

bekannt (Niethammer et al. 1996) und für LRP1 eine Interaktion mit PDZ III (Gotthardt et al. 2000), so dass ein- und dasselbe PSD-95 Molekül zwei Proteine miteinander verknüpfen könnte. Obwohl das Konzept, dass Adapterproteine diese beiden Rezeptoren miteinander verbinden könnten, schon früher aufgestellt wurde (May et al. 2004), konnten bisher noch keine biochemischen und physiologischen Daten für eine Signaltransmission durch diesen potentiellen Dreierkomplex vorgelegt werden.

Um die Topologie von Dreierkomplexen zu untersuchen, kann man z.B. verkürzte Adapterproteine überexprimieren, die nur noch an eines der beiden zu verknüpfenden Proteine im Überschuss binden und somit den Komplex aufbrechen können. Dies wurde bereits für LRP1 und FE65 gezeigt, welches die Verknüpfung mit APP, dem Amyloid Precursor Protein, herstellt (Pietrzik et al. 2004). Gotthardt und Kollegen demonstrierten, dass ein verkürztes PSD-95 Konstrukt, welches nur die PDZ III Domäne enthält, immer noch an LRP1 binden kann und somit die Verknüpfungsstelle für das PSD-95 Molekül am LRP1 sein könnte (Gotthardt et al. 2000). Ähnliche Ergebnisse wurden mit *yeast two-hybrid* Screens für das verwandte LRP1b erzeugt, welches mit PDZ I und III interagieren kann (Marschang et al. 2004).

Daher bestand die weitere Überlegung darin, im Zellmodell ein Konstrukt zu überexprimieren, welches nur die PDZ III Domäne enthält, alle Bindungsstellen an LRP1 Proteinen belegt und so die Bindung endogener Adapterproteine verhindert. In Analogie zur Studie von Gotthardt wurden drei PSD-95 Konstrukte generiert, die für die entsprechenden Domänen PDZ I, II und III codieren. Nur die Überexpression des PDZ III Konstruktes führte zu einer Verminderung der tPA-induzierten Erk1/2 Phosphorylierung, was darauf schließen lässt, dass eine Blockade des LRP C-Terminus zu einer Verhinderung des Dreierkomplexes führt. Unterstützt wurde diese Überlegung durch die Beobachtung, dass ein Überangebot an PSD-95 Gesamtprotein ebenfalls zu einem unterbrochenen Komplex führte, wahrscheinlich durch räumliche Verdrängung von LRP1 vom NMDA Rezeptor. Dies könnte dadurch zustande kommen, dass das Gesamtprotein alle PDZ Domänen enthält und die überexprimierten Moleküle gleichzeitig an LRP1 (über PDZ III) und den NMDA Rezeptor (über PDZ I oder II) binden können. So wäre die Überbrückungskapazität von PSD-95 behindert und LRP1 hätte keine Chance mehr, mit dem NMDA Rezeptor verbunden zu werden. Hierbei stellt sich jedoch die Frage, warum die Überexpression der einzelnen PDZ I und II Domänen keinen negativen Effekt auf die Erk1/2 Phosphorylierung hatte. Denn wenn PDZ III einerseits den LRP1 C-Terminus blockieren kann, müssten doch andererseits auch die beiden ersten PDZ Domänen den C-Terminus vom NMDA Rezeptoren blockieren und so eine Komplexbildung verhindern. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die artifiziellen PDZ I und II Konstrukte mit

unterschiedlicher Affinität, wenn überhaupt, an den NMDA Rezeptor C-Terminus binden. Unveröffentlichte Co-Immünpräzipitationen und *Pull-down Assays* in unserem Labor zeigten bereits, dass eine Bindung von LRP1 an PSD-95 oft schwer nachzuweisen ist, da anscheinend der Konformationsstatus von PSD-95 dabei eine große Rolle spielt. Dies lässt darauf schließen, dass eventuell die Tertiärstruktur, welche alle drei PDZ Domänen plus die SH3- und GK-Domänen (s. Abb. 5) einschließt, für die Bindung an den NMDA Rezeptor von Bedeutung ist und nicht von den einzelnen Domänen imitiert werden kann.

Um zu klären, ob die Verbindung von LRP1 zum NMDA Rezeptor tatsächlich durch PSD-95 oder ein anderes, endogenes Adapterprotein vermittelt wird, was durch obige Versuche von beiden Rezeptoren verdrängt worden wäre, wurden spezifische siRNA *knock-down* Experimente durchgeführt. Neben PSD-95 sind FE65 und Shc als potentielle Adapterproteine für LRP1 bekannt (Ravichandran 2001; Pietrzik et al. 2004). Jedoch ergab sich nur beim genspezifischen *knock-down* von PSD-95 eine verminderte Erk1/2 Phosphorylierung, welche aus der Reduktion des endogenen Proteins und der damit verhinderten Komplexbildung resultieren könnte. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass Fe65 und Shc nicht als Verbindungsproteine zwischen LRP1 und NMDA Rezeptoren fungieren und bisher nur PSD-95 als potentielles Adapterprotein identifiziert werden konnte.

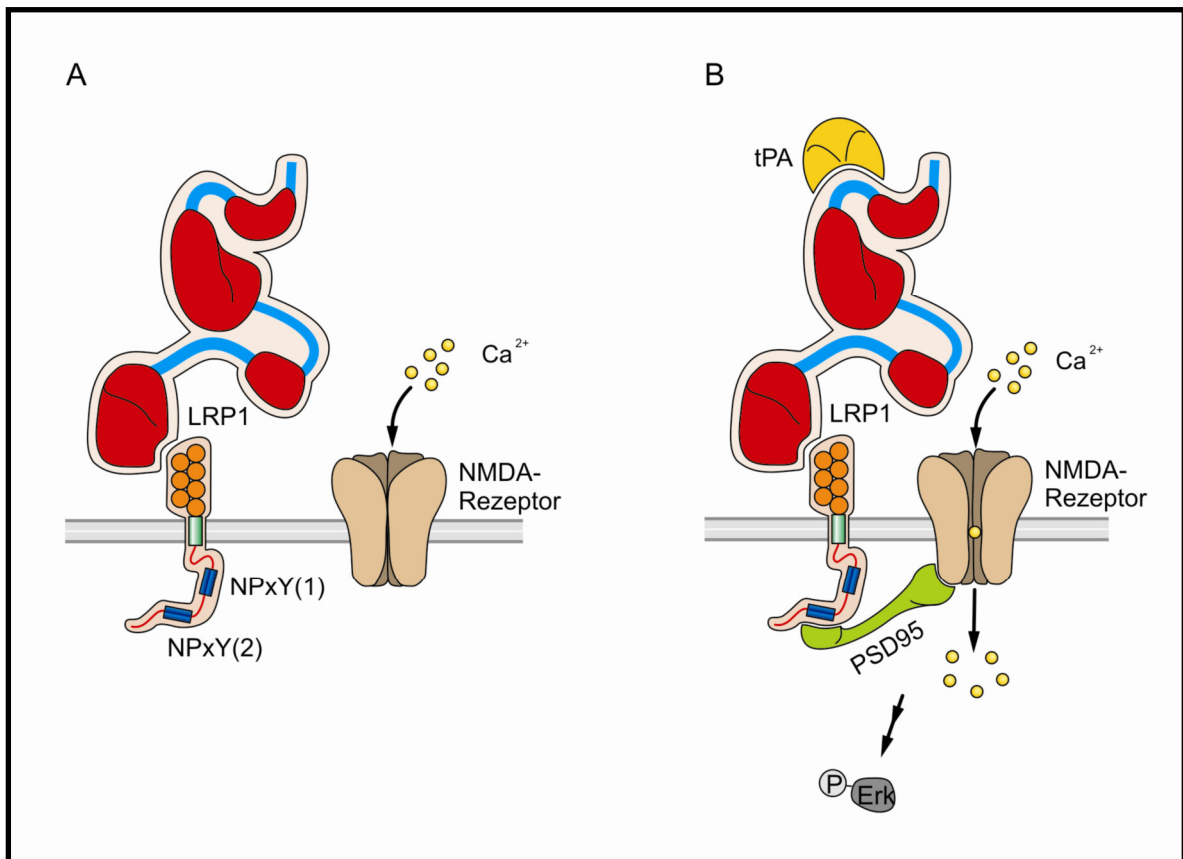
Wenn in der Tat tPA zuerst an LRP1 bindet und das Signal über PSD-95 an den NMDA Rezeptor weitergibt, würde man annehmen, dass Mutationen im LRP1 C-Terminus, der Bindestelle für PSD-95, die Signalweiterleitung an den NMDA Rezeptor verhindern. LRP1 besitzt zwei NPxY Domänen im C-Terminus, die mit intrazellulären Adapterproteinen interagieren können. Für FE65 z.B. ist bekannt, dass es an beide NPxY Domänen binden kann (Pietrzik et al. 2004), und Shc bevorzugt eher NPxY(2) (Stolt and Bock 2006). Die genaue Bindestelle für PSD-95 ist noch nicht bekannt, außer dass es irgendwo am LRP1 C-Terminus sein muss. Jedoch ergeben sich die meisten Proteininteraktionen über die NPxY (2) Domäne (Trommsdorff et al. 1998; Gotthardt et al. 2000; Barnes et al. 2003).

Um die Bindestelle für das Adapterprotein lokal einzugrenzen, wurden LRP1 *knock-in* Mäuse verwendet, die eine Mutation in der zweiten NPxY Domäne besitzen ((Roebroek et al. 2006), s. 3.1.1.2.). Primäre Neurone aus diesen Mäusen wiesen weder eine tPA-induzierte Erk1/2 Aktivierung noch einen erhöhten Calciumeinstrom im Vergleich zu Wildtypmäusen auf. Daraus lässt sich schließen, dass die Signalweiterleitung zum NMDA Rezeptor über die NPxY(2) vermittelt wird und mit aller Wahrscheinlichkeit nach über PSD-95 erfolgt.



### 5.3. Das komplexe Zusammenspiel von LRP1 und dem NMDA Rezeptor – Kann ein Lipoproteinrezeptor einen Calciumkanal öffnen?

Die Vorstellung, dass die alleinige Bindung von tPA an einen Lipoproteinrezeptor ausreicht, um einen ionotropen Glutamaterezeptor zu öffnen, erscheint zunächst spektakulär. Dennoch sprechen die präsentierten Ergebnisse für sich und sollen an folgendem Modell hypothetisch erläutert werden (s. Abb. 26).



**Abb. 26: Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Modells des tPA-vermittelten Calcium Signaling via eines LRP1-PSD-95-NMDA Rezeptor-Komplexes.**

(A) Co-Existenz von LRP1 und NMDA Rezeptor an der neuronalen Zelloberfläche. Im inaktiven Zustand ist der Calcium Kanal geschlossen. (B) Ligandenbindung von tPA an die extrazelluläre Domäne von LRP1 aktiviert den Rezeptor und führt zur intrazellulären Rekrutierung von PSD-95 an die C-terminale NPxY(2) Domäne. PSD95 verknüpft den LRP1 C-Terminus mit dem NMDA Rezeptor, der sich daraufhin öffnet und zum Einstrom von extrazellulärem Calcium mit anschließender Aktivierung der MAP Kinase.

Wie Abbildung 26A zu entnehmen ist, befinden sich LRP1 und der NMDA Rezeptor im nicht-aktivierten Zustand in postsynaptischen Verdickungen der neuronalen Zelloberfläche, wobei der Calciumkanal geschlossen ist und kein Durchlass von Calciumionen erfolgt. Diese Co-Lokalisation beider Rezeptoren konnte bereits in immunzytochemischen Färbungen hippocampaler Neurone gezeigt werden (May et al. 2004). Unserer Hypothese nach erfolgt nach Applikation von tPA (Abb. 26B) nun eine primäre Bindung des Liganden tPA an

seinen Rezeptor LRP1 und nicht an den NMDA Rezeptor, da der *downstream* gelegene Effekt der Erk1/2 Phosphorylierung mit RAP blockiert werden kann. Nach einer möglichen Phosphorylierung und somit Aktivierung des Lipoproteinrezeptors am C-Terminus, wie es bereits von Hu und Liu gezeigt werden konnte (Hu et al. 2006), kommt es womöglich zu einer Rekrutierung des Adapterproteins PSD-95, welches gleichzeitig an den C-Terminus von LRP1 und dem NMDA Rezeptor bindet, diese beiden Rezeptoren miteinander verknüpft und dadurch in enge Nachbarschaft bringt. Dabei scheint die Komplexbildung durch PSD-95 über das distale NPxY(2) Motiv der LRP1  $\beta$ -Kette zu erfolgen. Die nachfolgende Öffnung des Ionenkanals führt zu einem schnellen Influx von Calciumionen im Sekundenbereich, was für einen direkten Öffnungsmechanismus spricht. Wären weitere Proteine zwischengeschaltet, käme es zu einer Zeitverzögerung und man spräche von einem indirekten, *second messenger* Effekt. Das Calciumsignal wird daraufhin intrazellulär an die MAP Kinasenkaskade weitergeleitet und verstärkt, was anhand der Phosphorylierung der Erk1/2 Kinase dokumentiert wurde.

Im Laufe der Untersuchungen kam natürlich die Frage auf, ob die zwei Rezeptorsysteme vielleicht doch unabhängig voneinander arbeiten, da einerseits die Anschaltung der MAP Kinasekaskade durch LRP1 und andererseits ein tPA-induzierter, verstärkter Calciumeinstrom durch den NMDA Rezeptor bereits dokumentiert waren (Nicole et al. 2001; Hu et al. 2006). Dagegen spricht jedoch die Tatsache, dass der tPA-induzierte Calciumeinstrom in der Tat mit RAP blockiert werden kann und somit eine Verbindung zwischen dem Ionenkanal und dem Lipoproteinrezeptor bestehen muss. Wenn tPA einen direkten Effekt nur über die Bindung an den NMDA Rezeptor ausüben würde, dürfte die Gabe von RAP und der shRNA *knock-down* von LRP1 keinen Einfluss haben.

Zu diesem Zeitpunkt kann nicht ausgeschlossen werden, dass es nach Bindung von tPA an LRP1 und der intrazellulären Rekrutierung des Adapterproteins PSD-95 vielleicht auch eine Konformationsänderung des gebildeten Komplexes erfolgt, die zu einer extrazellulären Interaktion mit dem NMDA Rezeptor führt und diesen daraufhin stimuliert. Man könnte spekulieren, dass sich die extrazelluläre LRP1  $\alpha$ -Kette mitsamt des gebundenen tPAs in Richtung NMDA Rezeptor hinüberbeugt und vielleicht mit einem Glutamatrest die Bindungstasche zwischen der NR1 und NR2 Untereinheit ausfüllt. Dies würde auch erklären, warum sich die Erk1/2 Phosphorylierung mit dem kompetitiven Glutamatantagonisten DL-AP5 inhibieren lässt, aber freies Glutamat nach unseren Ermittlungen keine Rolle spielt. Denkbar wäre auch, dass die beiden Rezeptoren eventuell über tPA als extrazellulären Linker miteinander verbunden werden, so wie es z. B. bei der Vernetzung von

LRP1 und dem PDGF Rezeptor über PDGF-BB der Fall ist (Loukinova et al. 2002).

Diese extrazelluläre Vernetzung würde eine Bindung von tPA an den NMDA Rezeptor nicht mehr komplett ausschließen, dennoch liefert diese Arbeit Beweise für einen LRP1-PSD-95-NMDA Rezeptor Dreierkomplex als Startpunkt der tPA-vermittelten Signaltransduktion.

#### **5.4. Die Bedeutung des Einsatzes von tPA unter physiologischen und pathophysiologischen Gesichtspunkten**

Wie bereits impliziert wurde, kann diese tPA-stimulierte Erk1/2 Aktivierung fatale, neurotoxische Auswirkungen auf Neurone haben. Im Zusammenhang mit der Entstehung der Alzheimer'schen Erkrankung konnte bereits gezeigt werden, dass das Amyloid- $\beta$  Peptid ( $A\beta$ ), welches aus dem Vorläuferprotein APP herausgeschnitten wird und für die Entstehung der Eiweißplaques verantwortlich zeichnet, ebenfalls eine erhöhte tPA Produktion induzieren und somit zu NMDA Rezeptor-vermittelter Apoptose und Nekrose via GSK3 Aktivierung und tau Hyperphosphorylierung führen kann (Medina et al. 2005). Weitere Bedenken kommen aus Studien, die tPA die Fähigkeit zuweisen, eine MMP-9 Genexpression via LRP1 zu induzieren und somit neuronalen Zelltod durch Degradation der extrazellulären Matrix einzuleiten (Wang et al. 2003; Hu et al. 2006). Am augenscheinlichsten unter den in dieser Arbeit erworbenen Gesichtspunkten ist jedoch das Problem der Excitotoxizität. Darunter versteht man die Dysregulation der Calciumhomöostase innerhalb der Zelle aufgrund eines exzessiven Calciuminflux, welcher letztendlich zum Zelltod führt (Arundine and Tymianski 2003). In der Tat konnte im Rahmen dieser Arbeit ab einer tPA Inkubation von >24h ein progressives Zellsterben beobachtet werden, was jedoch nicht näher untersucht wurde, da man sich auf die kurzfristigen Effekte (<1h) konzentrierte. Wenn die Bindung von tPA an LRP1 tatsächlich eine verstärkte Öffnung des NMDA Rezeptors bewirken kann, sollte man dies bei der medizinischen Gabe von tPA in Fällen von akutem Schlaganfall bedenken. In der Tat wurden bereits Nebenwirkungen wie epileptische Anfälle, Erregungszustände oder Verwirrung beschrieben, die evt. durch eine Überaktivierung von NMDA Rezeptoren ausgelöst werden können (Gebrauchsinformation Actilyse<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim, 2007). Im schlimmsten Fall kann es durch den exzessiven Calciumeinstrom auch zu einem erweiterten Zelltod durch Excitoxizität im Bereich des Gefäßverschlusses kommen, welchen man jedoch in Kauf nehmen muss, da der Patient trotzdem noch vom Auflösen der Blutgerinnsel und der Wiederherstellung des Blutflusses in

verschlossenen Gefäßen profitiert. Diese neurotoxischen Nebenwirkungen sind insofern zu beachten, als dass tPA nicht nur von der amerikanischen US Food and Drug Administration, sondern auch von den deutschen Gesundheitsbehörden als Antithrombotikum zur Behandlung von akutem Schlaganfall, Herzinfarkt oder massiver Lungenembolie in der Praxis genehmigt wurde.

Daher ist es von besonderer Bedeutung, die Rolle von LRP1 in der NMDA Rezeptoraktivierung weiter aufzuklären, um die Wirkungsweise von tPA zu verbessern und die Nebenwirkungen einzudämmen.

## 6. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zusätzliche Einblicke in das Zusammenspiel der tPA-induzierten und LRP1-vermittelten NMDA Rezeptoraktivierung gewonnen werden. Dennoch bleiben Fragen offen, die noch nicht ausreichend geklärt sind.

Im Hinblick auf eine mögliche extrazelluläre Bindung zwischen LRP1 und dem NMDA Rezeptor könnte man überprüfen, inwieweit die Applikation von tPA die beiden Rezeptoren einander näher bringt und eventuell verlinkt. Dies wäre mit Hilfe geeigneter Antikörper über Co-Immünpräzipitationen durchführbar. Auch könnte man untersuchen, zu welchem Rezeptor tPA eine höhere Bindungsaffinität besitzt. Des Weiteren könnte man mit in unserer Arbeitsgruppe generierten Mini-Rezeptoren von LRP1, welche die einzelnen Ligandenbindungsdomänen der  $\alpha$ -Kette in Kombination mit der  $\beta$ -Kette enthalten, die Bindungsdomäne für tPA an LRP1 näher charakterisieren. Dazu müssten diese Konstrukte jedoch in LRP1-knock-out Zellen (z.B. CHO 13-5-1) in Kombination mit mindestens zwei NMDA Rezeptor Untereinheiten transfiziert werden, um ein annähernd funktionelles Zellkulturmodell zu generieren. Dies könnte wahrscheinlich nur mit viralen, stabilen Transfektionen realisiert werden, was momentan im Rahmen einer Diplomarbeit in Angriff genommen wird. In Kooperation mit der Gruppe um Volkmar Lessmann in Magdeburg sollen zudem elektrophysiologische Techniken, Einzelzellableitungen und *patch-clamp* Experimente, angewendet werden, um die Kanalaktivität der NMDA Rezeptoren nach tPA Gabe näher zu untersuchen. Obwohl der Calciumeinstrom aus dem extrazellulären Raum durch die beiden NMDA Rezeptor Inhibitoren MK-801 und DL-AP5 belegt werden konnte, ist es doch interessant zu schauen, ob nicht auch intrazelluläre Calciumspeicher zum erhöhten Calciumspiegel beitragen. Dazu könnte man diese zuvor chemisch „entleeren“ und anschließend die Calcium-Messungen durchführen. Reagieren die Zellen dann wie gewohnt, wäre dies ein weiteres Indiz für die spezifische Beteiligung von NMDA Rezeptoren und dem Einstrom von extrazellulärem Calcium. Bezüglich der tPA-Signaltransduktionsmaschinerie kommt eine Vielzahl an involvierten Proteinen in Frage, die nach dem Calciumeinstrom und vor der Aktivierung der Erk1/2 Kinasen zwischengeschaltet sein könnten. Medina konnte bereits eine Beteiligung der Proteinkinase C bestätigen und PI3K ausschließen (Medina et al. 2005), aber auch die Proteinkinase A könnte an einer tPA-induzierten und LRP1-vermittelten Signalweiterleitung eine Rolle spielen (Zhuo et al. 2000). Im Hinblick auf LRP1 ist auch eine Aktivierung des JIP/JNK Signalweges nicht ausgeschlossen, was weiterhin untersucht werden könnte (Lutz et al. 2002). Abschließend wäre es mit Hilfe von DNA-Microarrays interessant zu erforschen, welche Gene außer MMP-9 noch durch eine tPA-induzierte Erk1/2 Phosphorylierung aktiviert werden können.

## 7. Zusammenfassung

In seiner Hauptfunktion als Serinprotease spielt tPA eine entscheidende Rolle bei der Auflösung von Blutgerinnseln in blockierten Blutgefäßen nach plötzlich auftretenden Krankheiten wie ischämischem Schlaganfall, akutem Herzinfarkt oder massiver Lungenembolie. Trotz seiner überwiegend positiven Wirkung auf das Blutgefäßsystem kann es jedoch nach Überschreiten der Blut-Hirn-Schranke im Gehirn zu Exitotoxizität und neuronalem Zelltod führen. Über welchen Rezeptormechanismus tPA sein neurotoxisches Signal in die Zelle transferiert und nachfolgende Signaltransduktionskaskaden einleitet, konnte bisher nur unzureichend geklärt werden und sollte im Rahmen dieser Arbeit entschlüsselt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass in der tPA-vermittelten Aktivierung der Erk1/2 Kinase sowohl LRP1, ein Mitglied der LDL-Rezeptorgenfamilie, als auch der NMDA Rezeptor, ein ionotroper Glutamatrezeptor, beteiligt sind, da der Effekt auf die Erk1/2 Phosphorylierung mit den spezifischen Inhibitoren RAP, MK-801 und DL-AP5 blockiert werden konnte. Eine weitere Bestätigung der LRP1-Spezifität ergab sich aus shRNA knock-down Experimenten. Mit Hilfe des Inhibitors U0126 ließ sich demonstrieren, dass die Erk1/2 Aktivierung direkt über die in der Kaskade darüber liegende MAP Kinase Kinase (MEK) induziert wird. Außer der MAP Kinasenaktivierung hat tPA auch Einfluss auf die Calciumhomöostase innerhalb der Zelle. *Calcium Imaging* Experimente mittels konfokaler Lasermikroskopie und Fluoreszenzmessung ergaben, dass die Applikation von tPA sowohl in primären hippokampalen Zellen als auch in der neuronalen Zelllinie HT22 zu einem robusten Einstrom von Calcium in die Zelle führte. Dieser konnte einerseits mit MK-801, was für einen Calciumeinstrom durch den NMDA Rezeptor spricht, andererseits aber auch mit RAP, was eine Beteiligung von LRP1 aufzeigt, blockiert werden. Weitere Experimente demonstrierten, dass die Aktivierung des NMDA Rezeptors unabhängig von Glutamat zu sein scheint und gaben Anlass zur Vermutung eines neuen, LRP1-vermittelten Mechanismus. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese eines multimeren tPA-LRP1-NMDA Rezeptor Komplexes, der über die primäre Bindung von tPA an LRP1 aktiviert wird und anschließend das Signal an den NMDA Rezeptor weiterleitet. RNAi Experimente und Überexpressionsstudien bestätigten die Beteiligung von PSD-95 als intrazelluläres Adapterprotein, welches die beiden Rezeptoren miteinander verbindet. Als Bindungsstelle für PSD-95 am LRP C-Terminus konnte die distale NPxY(2) Domäne identifiziert werden. Somit weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf einen neuen, tPA-vermittelten Mechanismus zur Öffnung von Glutamatrezeptoren hin, der eine funktionelle Kooperation von dem Lipoproteinrezeptor LRP1 mit dem NMDA Rezeptor voraussetzt.

## 8. Literaturverzeichnis

- Abel, T., P. V. Nguyen, M. Barad, T. A. Deuel, E. R. Kandel and R. Bourchouladze (1997). "Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory." *Cell* 88(5): 615-26.
- Anson, L. C., P. E. Chen, D. J. Wyllie, D. Colquhoun and R. Schoepfer (1998). "Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors." *J Neurosci* 18(2): 581-9.
- Arundine, M. and M. Tymianski (2003). "Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity." *Cell Calcium* 34(4-5): 325-37.
- Asahi, M., X. Wang, T. Mori, T. Sumii, J. C. Jung, M. A. Moskowitz, M. E. Fini and E. H. Lo (2001). "Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia." *J Neurosci* 21(19): 7724-32.
- Bacskai, B. J., M. Q. Xia, D. K. Strickland, G. W. Rebeck and B. T. Hyman (2000). "The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via N-methyl-D-aspartate receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(21): 11551-6.
- Baranes, D., D. Lederfein, Y. Y. Huang, M. Chen, C. H. Bailey and E. R. Kandel (1998). "Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway." *Neuron* 21(4): 813-25.
- Barnes, H., E. J. Ackermann and P. van der Geer (2003). "v-Src induces Shc binding to tyrosine 63 in the cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein 1." *Oncogene* 22(23): 3589-97.
- Barnes, H., B. Larsen, M. Tyers and P. van Der Geer (2001). "Tyrosine-phosphorylated low density lipoprotein receptor-related protein 1 (Lrp1) associates with the adaptor protein SHC in SRC-transformed cells." *J Biol Chem* 276(22): 19119-25.
- Barria, A. and R. Malinow (2005). "NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII." *Neuron* 48(2): 289-301.
- Benchenane, K., V. Berezowski, C. Ali, M. Fernandez-Monreal, J. P. Lopez-Atalaya, J. Brillault, J. Chuquet, A. Nouvelot, E. T. MacKenzie, G. Bu, R. Cecchelli, O. Touzani and D. Vivien (2005). "Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis." *Circulation* 111(17): 2241-9.

- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-23.
- Bock, H. H. and J. Herz (2003). "Reelin activates SRC family tyrosine kinases in neurons." *Curr Biol* 13(1): 18-26.
- Bohm, C., N. M. Seibel, B. Henkel, H. Steiner, C. Haass and W. Hampe (2006). "SorLA signaling by regulated intramembrane proteolysis." *J Biol Chem* 281(21): 14547-53.
- Boucher, P., M. Gotthardt, W. P. Li, R. G. Anderson and J. Herz (2003). "LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis." *Science* 300(5617): 329-32.
- Boucher, P., P. Liu, M. Gotthardt, T. Hiesberger, R. G. Anderson and J. Herz (2002). "Platelet-derived growth factor mediates tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic domain of the low Density lipoprotein receptor-related protein in caveolae." *J Biol Chem* 277(18): 15507-13.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis." *Science* 232(4746): 34-47.
- Bu, G., E. A. Maksymovitch, J. M. Nerbonne and A. L. Schwartz (1994b). "Expression and function of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in mammalian central neurons." *J Biol Chem* 269(28): 18521-8.
- Bu, G., S. Williams, D. K. Strickland and A. L. Schwartz (1992). "Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(16): 7427-31.
- Burnette, W. N. (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." *Anal Biochem* 112(2): 195-203.
- Cao, C., D. A. Lawrence, Y. Li, C. A. Von Arnim, J. Herz, E. J. Su, A. Makarova, B. T. Hyman, D. K. Strickland and L. Zhang (2006). "Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration." *Embo J* 25(9): 1860-70.
- Cao, J., J. I. Viholainen, C. Dart, H. K. Warwick, M. L. Leyland and M. J. Courtney (2005). "The PSD95-nNOS interface: a target for inhibition of excitotoxic p38 stress-activated protein kinase activation and cell death." *J Cell Biol* 168(1): 117-26.
- Carmeliet, P., L. Schoonjans, L. Kieckens, B. Ream, J. Degen, R. Bronson, R. De Vos, J. J. van den Oord, D. Collen and R. C. Mulligan (1994). "Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice." *Nature* 368(6470): 419-24.



- Chandler, W. L., M. C. Alessi, M. F. Aillaud, P. Henderson, P. Vague and I. Juhan-Vague (1997). "Clearance of tissue plasminogen activator (TPA) and TPA/plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) complex: relationship to elevated TPA antigen in patients with high PAI-1 activity levels." *Circulation* 96(3): 761-8.
- Chen, L., Y. Miyamoto, K. Furuya, N. Mori and M. Sokabe (2007). "PREGS induces LTP in the hippocampal dentate gyrus of adult rats via the tyrosine phosphorylation of NR2B coupled to ERK/CREB [corrected] signaling." *J Neurophysiol* 98(3): 1538-48.
- Chung, H. J., Y. H. Huang, L. F. Lau and R. L. Huganir (2004). "Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand." *J Neurosci* 24(45): 10248-59.
- Collen, D. (1999). "The plasminogen (fibrinolytic) system." *Thromb Haemost* 82(2): 259-70.
- Cull-Candy, S., S. Brickley and M. Farrant (2001). "NMDA receptor subunits: diversity, development and disease." *Curr Opin Neurobiol* 11(3): 327-35.
- Cull-Candy, S. G. and D. N. Leszkiewicz (2004). "Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses." *Sci STKE* 2004(255): re16.
- Dargusch, R. and D. Schubert (2002). "Specificity of resistance to oxidative stress." *J Neurochem* 81(6): 1394-400.
- Das, S., Y. F. Sasaki, T. Rothe, L. S. Premkumar, M. Takasu, J. E. Crandall, P. Dikkes, D. A. Conner, P. V. Rayudu, W. Cheung, H. S. Chen, S. A. Lipton and N. Nakanishi (1998). "Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A." *Nature* 393(6683): 377-81.
- Davies, B. J., B. S. Pickard, M. Steel, R. G. Morris and R. Lathe (1998). "Serine proteases in rodent hippocampus." *J Biol Chem* 273(36): 23004-11.
- Davis, J. B. and P. Maher (1994). "Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line." *Brain Res* 652(1): 169-73.
- Dingledine, R., K. Borges, D. Bowie and S. F. Traynelis (1999). "The glutamate receptor ion channels." *Pharmacol Rev* 51(1): 7-61.
- Erreger, K., P. E. Chen, D. J. Wyllie and S. F. Traynelis (2004). "Glutamate receptor gating." *Crit Rev Neurobiol* 16(3): 187-224.
- Eugenin, E. A., J. E. King, A. Nath, T. M. Calderon, R. S. Zukin, M. V. Bennett and J. W. Berman (2007). "HIV-tat induces formation of an LRP-PSD-95-NMDAR-nNOS complex that promotes apoptosis in neurons and astrocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(9): 3438-43.

- Fernandez-Monreal, M., J. P. Lopez-Atalaya, K. Benchenane, M. Cacquevel, F. Dulin, J. P. Le Caer, J. Rossier, A. C. Jarrige, E. T. Mackenzie, N. Colloc'h, C. Ali and D. Vivien (2004a). "Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling." *J Biol Chem* 279(49): 50850-6.
- Fernandez-Monreal, M., J. P. Lopez-Atalaya, K. Benchenane, F. Leveille, M. Cacquevel, L. Plawinski, E. T. MacKenzie, G. Bu, A. Buisson and D. Vivien (2004b). "Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator?" *Mol Cell Neurosci* 25(4): 594-601.
- Fiore, F., N. Zambrano, G. Minopoli, V. Donini, A. Duilio and T. Russo (1995). "The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein." *J Biol Chem* 270(52): 30853-6.
- Furukawa, H., S. K. Singh, R. Mancusso and E. Gouaux (2005). "Subunit arrangement and function in NMDA receptors." *Nature* 438(7065): 185-92.
- Gotthardt, M., M. Trommsdorff, M. F. Nevitt, J. Shelton, J. A. Richardson, W. Stockinger, J. Nimpf and J. Herz (2000). "Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction." *J Biol Chem* 275(33): 25616-24.
- Guenette, S. Y., Y. Chang, B. T. Hyman, R. E. Tanzi and G. W. Rebeck (2002). "Low-density lipoprotein receptor-related protein levels and endocytic function are reduced by overexpression of the FE65 adaptor protein, FE65L1." *J Neurochem* 82(4): 755-62.
- Guenette, S. Y., J. Chen, P. D. Jondro and R. E. Tanzi (1996). "Association of a novel human FE65-like protein with the cytoplasmic domain of the beta-amyloid precursor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(20): 10832-7.
- Haberny, K. A., M. G. Paule, A. C. Scallet, F. D. Sistare, D. S. Lester, J. P. Hanig and W. Slikker, Jr. (2002). "Ontogeny of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor system and susceptibility to neurotoxicity." *Toxicol Sci* 68(1): 9-17.
- Hajjar, K. A., A. T. Jacovina and J. Chacko (1994). "An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II." *J Biol Chem* 269(33): 21191-7.
- Hajjar, K. A., L. Mauri, A. T. Jacovina, F. Zhong, U. A. Mirza, J. C. Padovan and B. T. Chait (1998). "Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain. Direct modulation by homocysteine." *J Biol Chem* 273(16): 9987-93.
- Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." *Nature* 418(6894): 244-51.

- Harris-White, M. E. and S. A. Frautschy (2005). "Low density lipoprotein receptor-related proteins (LRPs), Alzheimer's and cognition." *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4(5): 469-80.
- Herz, J. and H. H. Bock (2002). "Lipoprotein receptors in the nervous system." *Annu Rev Biochem* 71: 405-34.
- Herz, J., D. E. Clouthier and R. E. Hammer (1992). "LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation." *Cell* 71(3): 411-21.
- Herz, J., D. E. Couthier and R. E. Hammer (1993). "Correction: LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation." *Cell* 73(3): 428.
- Herz, J., M. Gotthardt and T. E. Willnow (2000). "Cellular signalling by lipoprotein receptors." *Curr Opin Lipidol* 11(2): 161-6.
- Herz, J., U. Hamann, S. Rogne, O. Myklebost, H. Gausepohl and K. K. Stanley (1988). "Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor." *Embo J* 7(13): 4119-27.
- Herz, J., R. C. Kowal, J. L. Goldstein and M. S. Brown (1990). "Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment." *Embo J* 9(6): 1769-76.
- Hirai, H., J. Kirsch, B. Laube, H. Betz and J. Kuhse (1996). "The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12): 6031-6.
- Hollmann, M. and S. Heinemann (1994). "Cloned glutamate receptors." *Annu Rev Neurosci* 17: 31-108.
- Hommel, M., E. Kumral and J. Bogousslavsky (1995). "[Thrombolytic therapy in ischemic cerebrovascular accidents]." *Schweiz Rundsch Med Prax* 84(38): 1025-31.
- Hu, K., J. Yang, S. Tanaka, S. L. Gonias, W. M. Mars and Y. Liu (2006). "Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression." *J Biol Chem* 281(4): 2120-7.
- Hu, Q., L. Wang, Z. Yang, B. H. Cool, G. Zitnik and G. M. Martin (2005). "Endoproteolytic cleavage of FE65 converts the adaptor protein to a potent suppressor of the sAPPalpha pathway in primates." *J Biol Chem* 280(13): 12548-58.
- Husi, H. and S. G. Grant (2001). "Isolation of 2000-kDa complexes of N-methyl-D-aspartate receptor and postsynaptic density 95 from mouse brain." *J Neurochem* 77(1): 281-91.

- Jeon, H., W. Meng, J. Takagi, M. J. Eck, T. A. Springer and S. C. Blacklow (2001). "Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair." *Nat Struct Biol* 8(6): 499-504.
- Jiang, Q., Z. Gu, G. Zhang and G. Jing (2000). "N-methyl-D-aspartate receptor activation results in regulation of extracellular signal-regulated kinases by protein kinases and phosphatases in glutamate-induced neuronal apoptotic-like death." *Brain Res* 887(2): 285-92.
- Kang, D. E., C. U. Pietrzik, L. Baum, N. Chevallier, D. E. Merriam, M. Z. Kounnas, S. L. Wagner, J. C. Troncoso, C. H. Kawas, R. Katzman and E. H. Koo (2000). "Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway." *J Clin Invest* 106(9): 1159-66.
- Kanterewicz, B. I., L. T. Knapp and E. Klann (1998). "Stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases by reactive oxygen species and nitric oxide in hippocampus." *J Neurochem* 70(3): 1009-16.
- Kim, E., M. Niethammer, A. Rothschild, Y. N. Jan and M. Sheng (1995). "Clustering of Shaker-type K<sup>+</sup> channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases." *Nature* 378(6552): 85-8.
- Kim, M. J., A. W. Dunah, Y. T. Wang and M. Sheng (2005). "Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking." *Neuron* 46(5): 745-60.
- Kounnas, M. Z., R. D. Moir, G. W. Rebeck, A. I. Bush, W. S. Argraves, R. E. Tanzi, B. T. Hyman and D. K. Strickland (1995). "LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation." *Cell* 82(2): 331-40.
- Kounnas, M. Z., R. E. Morris, M. R. Thompson, D. J. FitzGerald, D. K. Strickland and C. B. Saelinger (1992). "The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A." *J Biol Chem* 267(18): 12420-3.
- Krapivinsky, G., L. Krapivinsky, Y. Manasian, A. Ivanov, R. Tyzio, C. Pellegrino, Y. Ben-Ari, D. E. Clapham and I. Medina (2003). "The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1." *Neuron* 40(4): 775-84.
- Krieger, M. and J. Herz (1994). "Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)." *Annu Rev Biochem* 63: 601-37.
- Kristensen, T., S. K. Moestrup, J. Gliemann, L. Bendtsen, O. Sand and L. Sottrup-Jensen (1990). "Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the alpha 2-macroglobulin receptor." *FEBS Lett* 276(1-2): 151-5.

- Laatsch, A., S. Ragozin, T. Grewal, U. Beisiegel and H. Joerg (2004). "Differential RNA interference: replacement of endogenous with recombinant low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)." *Eur J Cell Biol* 83(3): 113-20.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- Lalonde, R. and C. C. Joyal (1993). "Effects of ketamine and L-glutamic acid diethyl ester on spatial and nonspatial learning tasks in rats." *Pharmacol Biochem Behav* 44(3): 539-45.
- Laube, B., H. Hirai, M. Sturgess, H. Betz and J. Kuhse (1997). "Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit." *Neuron* 18(3): 493-503.
- Lee, H. K. (2006). "Synaptic plasticity and phosphorylation." *Pharmacol Ther* 112(3): 810-32.
- Lee, M. K., C. Pardoux, M. C. Hall, P. S. Lee, D. Warburton, J. Qing, S. M. Smith and R. Derynck (2007). "TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA." *Embo J* 26(17): 3957-67.
- Li, Y., M. P. Marzolo, P. van Kerkhof, G. J. Strous and G. Bu (2000). "The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein." *J Biol Chem* 275(22): 17187-94.
- Li, Y., P. van Kerkhof, M. P. Marzolo, G. J. Strous and G. Bu (2001). "Identification of a major cyclic AMP-dependent protein kinase A phosphorylation site within the cytoplasmic tail of the low-density lipoprotein receptor-related protein: implication for receptor-mediated endocytosis." *Mol Cell Biol* 21(4): 1185-95.
- Lillis, A. P., I. Mikhailenko and D. K. Strickland (2005). "Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability." *J Thromb Haemost* 3(8): 1884-93.
- Lintzel, J., I. Franke, I. B. Riedel, H. C. Schaller and W. Hampe (2002). "Characterization of the VPS10 domain of SorLA/LR11 as binding site for the neuropeptide HA." *Biol Chem* 383(11): 1727-33.
- Liu, C. X., S. Musco, N. M. Lisitsina, S. Y. Yaklichkin and N. A. Lisitsyn (2000). "Genomic organization of a new candidate tumor suppressor gene, LRP1B." *Genomics* 69(2): 271-4.
- Liu, D., T. Cheng, H. Guo, J. A. Fernandez, J. H. Griffin, X. Song and B. V. Zlokovic (2004). "Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C." *Nat Med* 10(12): 1379-83.

- Lopez-Atalaya, J. P., B. D. Roussel, D. Levrat, J. Parcq, O. Nicole, Y. Hommet, K. Benchenane, H. Castel, J. Leprince, D. To Van, R. Bureau, S. Rault, H. Vaudry, K. U. Petersen, J. S. Santos, C. Ali and D. Vivien (2008). "Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity." *J Cereb Blood Flow Metab* 28(6): 1212-1221.
- Loukinova, E., S. Ranganathan, S. Kuznetsov, N. Gorlatova, M. M. Migliorini, D. Loukinov, P. G. Ulery, I. Mikhailenko, D. A. Lawrence and D. K. Strickland (2002). "Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF." *J Biol Chem* 277(18): 15499-506.
- Lutz, C., J. Nimpf, M. Jenny, K. Boecklinger, C. Enzinger, G. Utermann, G. Baier-Bitterlich and G. Baier (2002). "Evidence of functional modulation of the MEKK/JNK/cJun signaling cascade by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)." *J Biol Chem* 277(45): 43143-51.
- Madani, R., S. Hulo, N. Toni, H. Madani, T. Steimer, D. Muller and J. D. Vassalli (1999). "Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice." *Embo J* 18(11): 3007-12.
- Makarova, A., S. E. Williams and D. K. Strickland (2004). "Proteases and lipoprotein receptors in Alzheimer's disease." *Cell Biochem Biophys* 41(1): 139-78.
- Marschang, P., J. Brich, E. J. Weeber, J. D. Sweatt, J. M. Shelton, J. A. Richardson, R. E. Hammer and J. Herz (2004). "Normal development and fertility of knockout mice lacking the tumor suppressor gene LRP1b suggest functional compensation by LRP1." *Mol Cell Biol* 24(9): 3782-93.
- Matys, T. and S. Strickland (2003). "Tissue plasminogen activator and NMDA receptor cleavage." *Nat Med* 9(4): 371-2; author reply 372-3.
- May, P. and J. Herz (2003). "LDL receptor-related proteins in neurodevelopment." *Traffic* 4(5): 291-301.
- May, P., A. Rohlmann, H. H. Bock, K. Zurhove, J. D. Marth, E. D. Schomburg, J. L. Noebels, U. Beffert, J. D. Sweatt, E. J. Weeber and J. Herz (2004). "Neuronal LRP1 functionally associates with postsynaptic proteins and is required for normal motor function in mice." *Mol Cell Biol* 24(20): 8872-83.
- May, P., J. Herz and H.H. Bock (2005). "Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling." *Cell Mol Life Sci* 62(19-20): 2325-38
- Medina, M. G., M. D. Ledesma, J. E. Dominguez, M. Medina, D. Zafra, F. Alameda, C. G. Dotti and P. Navarro (2005). "Tissue plasminogen activator mediates amyloid-induced neurotoxicity via Erk1/2 activation." *Embo J* 24(9): 1706-16.

- Melchor, J. P., R. Pawlak and S. Strickland (2003). "The tissue plasminogen activator-plasminogen proteolytic cascade accelerates amyloid-beta (Abeta) degradation and inhibits Abeta-induced neurodegeneration." *J Neurosci* 23(26): 8867-71.
- Moestrup, S. K., J. Gliemann and G. Pallesen (1992). "Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues." *Cell Tissue Res* 269(3): 375-82.
- Moestrup, S. K., T. L. Holtet, M. Etzerodt, H. C. Thogersen, A. Nykjaer, P. A. Andreasen, H. H. Rasmussen, L. Sottrup-Jensen and J. Gliemann (1993). "Alpha 2-macroglobulin-proteinase complexes, plasminogen activator inhibitor type-1-plasminogen activator complexes, and receptor-associated protein bind to a region of the alpha 2-macroglobulin receptor containing a cluster of eight complement-type repeats." *J Biol Chem* 268(18): 13691-6.
- Monard, D. (1988). "Cell-derived proteases and protease inhibitors as regulators of neurite outgrowth." *Trends Neurosci* 11(12): 541-4.
- Morimoto, B. H. and D. E. Koshland, Jr. (1990). "Induction and expression of long- and short-term neurosecretory potentiation in a neural cell line." *Neuron* 5(6): 875-80.
- Neels, J. G., B. M. van Den Berg, A. Lookene, G. Olivecrona, H. Pannekoek and A. J. van Zonneveld (1999). "The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties." *J Biol Chem* 274(44): 31305-11.
- Nicole, O., F. Docagne, C. Ali, I. Margaille, P. Carmeliet, E. T. MacKenzie, D. Vivien and A. Buisson (2001). "The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling." *Nat Med* 7(1): 59-64.
- Nicoll, R. A. and R. C. Malenka (1995). "Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus." *Nature* 377(6545): 115-8.
- Niethammer, M., E. Kim and M. Sheng (1996). "Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases." *J Neurosci* 16(7): 2157-63.
- Novak, S., T. Hiesberger, W. J. Schneider and J. Nimpf (1996). "A new low density lipoprotein receptor homologue with 8 ligand binding repeats in brain of chicken and mouse." *J Biol Chem* 271(20): 11732-6.
- Nykjaer, A., D. Dragun, D. Walther, H. Vorum, C. Jacobsen, J. Herz, F. Melsen, E. I. Christensen and T. E. Willnow (1999). "An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3." *Cell* 96(4): 507-15.

- Orth, K., T. Willnow, J. Herz, M. J. Gething and J. Sambrook (1994). "Low density lipoprotein receptor-related protein is necessary for the internalization of both tissue-type plasminogen activator-inhibitor complexes and free tissue-type plasminogen activator." *J Biol Chem* 269(33): 21117-22.
- Otto, I. M., T. Raabe, U. E. Rennefahrt, P. Bork, U. R. Rapp and E. Kerkhoff (2000). "The p150-Spir protein provides a link between c-Jun N-terminal kinase function and actin reorganization." *Curr Biol* 10(6): 345-8.
- Pang, P. T. and B. Lu (2004a). "Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF." *Ageing Res Rev* 3(4): 407-30.
- Pang, P. T., H. K. Teng, E. Zaitsev, N. T. Woo, K. Sakata, S. Zhen, K. K. Teng, W. H. Yung, B. L. Hempstead and B. Lu (2004b). "Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity." *Science* 306(5695): 487-91.
- Parathath, S. R., S. Parathath and S. E. Tsirka (2006). "Nitric oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood-brain barrier in tPA-dependent excitotoxic injury in mice." *J Cell Sci* 119(Pt 2): 339-49.
- Pawlak, R., A. M. Magarinos, J. Melchor, B. McEwen and S. Strickland (2003). "Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior." *Nat Neurosci* 6(2): 168-74.
- Pawlak, R., J. P. Melchor, T. Matys, A. E. Skrzypiec and S. Strickland (2005). "Ethanol-withdrawal seizures are controlled by tissue plasminogen activator via modulation of NR2B-containing NMDA receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(2): 443-8.
- Pawlak, R., N. Nagai, T. Urano, D. Napiorkowska-Pawlak, H. Ihara, Y. Takada, D. Collen and A. Takada (2002). "Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice." *Neuroscience* 113(4): 995-1001.
- Perez-Otano, I., C. T. Schulteis, A. Contractor, S. A. Lipton, J. S. Trimmer, N. J. Sucher and S. F. Heinemann (2001). "Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors." *J Neurosci* 21(4): 1228-37.
- Pietrzik, C. U., T. Busse, D. E. Merriam, S. Weggen and E. H. Koo (2002). "The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing." *Embo J* 21(21): 5691-700.
- Pietrzik, C. U., I. S. Yoon, S. Jaeger, T. Busse, S. Weggen and E. H. Koo (2004). "FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein." *J Neurosci* 24(17): 4259-65.



- Pinson, K. I., J. Brennan, S. Monkley, B. J. Avery and W. C. Skarnes (2000). "An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice." *Nature* 407(6803): 535-8.
- Qian, Z., M. E. Gilbert, M. A. Colicos, E. R. Kandel and D. Kuhl (1993). "Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation." *Nature* 361(6411): 453-7.
- Qiu, Z., D. K. Strickland, B. T. Hyman and G. W. Rebeck (2002). "alpha 2-Macroglobulin exposure reduces calcium responses to N-methyl-D-aspartate via low density lipoprotein receptor-related protein in cultured hippocampal neurons." *J Biol Chem* 277(17): 14458-66.
- Qureshi, N. (1996). "Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke." *N Engl J Med* 334(21): 1406.
- Ravichandran, K. S. (2001). "Signaling via Shc family adapter proteins." *Oncogene* 20(44): 6322-30.
- Roebroek, A. J., S. Reekmans, A. Lauwers, N. Feyaerts, L. Smeijers and D. Hartmann (2006). "Mutant Lrp1 knock-in mice generated by recombinase-mediated cassette exchange reveal differential importance of the NPXY motifs in the intracellular domain of LRP1 for normal fetal development." *Mol Cell Biol* 26(2): 605-16.
- Rohlfmann, A., M. Gotthardt, R. E. Hammer and J. Herz (1998). "Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants." *J Clin Invest* 101(3): 689-95.
- Rozakis-Adcock, M., J. McGlade, G. Mbamalu, G. Pelicci, R. Daly, W. Li, A. Batzer, S. Thomas, J. Brugge, P. G. Pelicci and et al. (1992). "Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases." *Nature* 360(6405): 689-92.
- Sambrook, J. a. R., D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. "Calcium phosphate-mediated transfection of eucaryotic cells with plasmid DNAs"*. Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samson, A. L. and R. L. Medcalf (2006). "Tissue-type plasminogen activator: a multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity." *Neuron* 50(5): 673-8.
- Schlessinger, J. (2002). "Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor." *Cell* 110(6): 669-72.
- Seeds, N. W., S. Haffke, K. Christensen and J. Schoonmaker (1990). "Cerebellar granule cell migration involves proteolysis." *Adv Exp Med Biol* 265: 169-78.

- Sheehan, J. J. and S. E. Tsirka (2005). "Fibrin-modifying serine proteases thrombin, tPA, and plasmin in ischemic stroke: a review." *Glia* 50(4): 340-50.
- Sheng, M. (2001a). "Molecular organization of the postsynaptic specialization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13): 7058-61.
- Sheng, M. (2001b). "The postsynaptic NMDA-receptor--PSD-95 signaling complex in excitatory synapses of the brain." *J Cell Sci* 114(Pt 7): 1251.
- Sheng, M. and D. T. Pak (2000). "Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins." *Annu Rev Physiol* 62: 755-78.
- Siao, C. J. and S. E. Tsirka (2002). "Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II." *J Neurosci* 22(9): 3352-8.
- Sprengel, R., B. Suchanek, C. Amico, R. Brusa, N. Burnashev, A. Rozov, O. Hvalby, V. Jensen, O. Paulsen, P. Andersen, J. J. Kim, R. F. Thompson, W. Sun, L. C. Webster, S. G. Grant, J. Eilers, A. Konnerth, J. Li, J. O. McNamara and P. H. Seeburg (1998). "Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo." *Cell* 92(2): 279-89.
- Steigerwald, F., T. W. Schulz, L. T. Schenker, M. B. Kennedy, P. H. Seeburg and G. Kohr (2000). "C-Terminal truncation of NR2A subunits impairs synaptic but not extrasynaptic localization of NMDA receptors." *J Neurosci* 20(12): 4573-81.
- Stephenson, F. A. (2001). "Subunit characterization of NMDA receptors." *Curr Drug Targets* 2(3): 233-9.
- Stolt, P. C. and H. H. Bock (2006). "Modulation of lipoprotein receptor functions by intracellular adaptor proteins." *Cell Signal* 18(10): 1560-71.
- Strack, S. and R. J. Colbran (1998). "Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/ calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl- D-aspartate receptor." *J Biol Chem* 273(33): 20689-92.
- Strickland, D. K., J. D. Ashcom, S. Williams, W. H. Burgess, M. Migliorini and W. S. Argraves (1990). "Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor." *J Biol Chem* 265(29): 17401-4.
- Strickland, D. K. and S. Ranganathan (2003). "Diverse role of LDL receptor-related protein in the clearance of proteases and in signaling." *J Thromb Haemost* 1(7): 1663-70.
- Sweatt, J. D. (2001). "The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory." *J Neurochem* 76(1): 1-10.

- Tamai, K., M. Semenov, Y. Kato, R. Spokony, C. Liu, Y. Katsuyama, F. Hess, J. P. Saint-Jeannet and X. He (2000). "LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction." *Nature* 407(6803): 530-5.
- Teesalu, T., A. Kulla, A. Simisker, V. Siren, D. A. Lawrence, T. Asser and A. Vaheri (2004). "Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system." *Thromb Haemost* 92(2): 358-68.
- Tissir, F. and A. M. Goffinet (2003). "Reelin and brain development." *Nat Rev Neurosci* 4(6): 496-505.
- Tomimatsu, Y., S. Idemoto, S. Moriguchi, S. Watanabe and H. Nakanishi (2002). "Proteases involved in long-term potentiation." *Life Sci* 72(4-5): 355-61.
- Trommsdorff, M., J. P. Borg, B. Margolis and J. Herz (1998). "Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein." *J Biol Chem* 273(50): 33556-60.
- Trommsdorff, M., M. Gotthardt, T. Hiesberger, J. Shelton, W. Stockinger, J. Nimpf, R. E. Hammer, J. A. Richardson and J. Herz (1999). "Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2." *Cell* 97(6): 689-701.
- Tsirka, S. E., A. Gualandris, D. G. Amaral and S. Strickland (1995). "Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator." *Nature* 377(6547): 340-4.
- Ulery, P. G. and D. K. Strickland (2000). "LRP in Alzheimer's disease: friend or foe?" *J Clin Invest* 106(9): 1077-9.
- Wang, X., S. R. Lee, K. Arai, S. R. Lee, K. Tsuji, G. W. Rebeck and E. H. Lo (2003). "Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator." *Nat Med* 9(10): 1313-7.
- Willnow, T. E. (1999a). "The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism." *J Mol Med* 77(3): 306-15.
- Willnow, T. E., J. Hilpert, S. A. Armstrong, A. Rohlmann, R. E. Hammer, D. K. Burns and J. Herz (1996a). "Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8460-4.
- Willnow, T. E., J. M. Moehring, N. M. Inocencio, T. J. Moehring and J. Herz (1996b). "The low-density-lipoprotein receptor-related protein (LRP) is processed by furin in vivo and in vitro." *Biochem J* 313 ( Pt 1): 71-6.
- Willnow, T. E., K. Orth and J. Herz (1994). "Molecular dissection of ligand binding sites on the low density lipoprotein receptor-related protein." *J Biol Chem* 269(22): 15827-32.

- Willnow, T. E., A. Rohlmann, J. Horton, H. Otani, J. R. Braun, R. E. Hammer and J. Herz (1996c). "RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors." *Embo J* 15(11): 2632-9.
- Yepes, M., M. Sandkvist, E. G. Moore, T. H. Bugge, D. K. Strickland and D. A. Lawrence (2003). "Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein." *J Clin Invest* 112(10): 1533-40.
- Yun, M., L. Keshvara, C. G. Park, Y. M. Zhang, J. B. Dickerson, J. Zheng, C. O. Rock, T. Curran and H. W. Park (2003). "Crystal structures of the Dab homology domains of mouse disabled 1 and 2." *J Biol Chem* 278(38): 36572-81.
- Zhuo, M., D. M. Holtzman, Y. Li, H. Osaka, J. DeMaro, M. Jacquin and G. Bu (2000). "Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation." *J Neurosci* 20(2): 542-9.

## 9. Anhang

**Tabelle 8:** LRP1 Liganden (aus Lillis et al., J Thromb Haemost, 2005)

---

Proteins involved in lipoprotein metabolism
apoE
Chylomicron remnants
Hepatic lipase
Lipoprotein lipase
$\beta$ -VLDL
Sphingolipid activator protein
Proteases and protease/inhibitor complexes
Activated $\alpha_2$ -M*
Aprotinin
PAI-1
$\alpha_2$ -M* protease complexes
Pregnancy zone protein-protease complexes
pro-uPA
uPA
uPA/PAI-1
tPA
tPA/PAI-1
Thrombin/PAI-1
Thrombin/anti-thrombin III
Thrombin/heparin cofactor II
Thrombin/protease nexin-1
Neuroserpin
Neuroserpin/tPA
Elastase/ $\alpha_1$ -anti-trypsin
C1s/C1q inhibitor
Protease/protein C inhibitor
MMP-9
MMP-13
TSP-2/MMP-2
Tissue factor pathway inhibitor
Factor VIIa/tissue factor pathway inhibitor
Factor VIIIa
Factor IXa
Factor XIa/protease nexin-1
$\beta$ -amyloid precursor protein
Matrix proteins
Thrombospondin-1
Thrombospondin-2
Fibronectin
Intracellular proteins
RAP
HIV Tat protein
Calreticulin
Growth factors
PDGF
Midkine
Connective tissue growth factor
Transforming growth factor- $\beta$
Others
Circumsporozoite protein
Gentamicin
Lactoferrin
Polymyxin B
Ricin A
<i>Pseudomonas</i> exotoxin A
Saposin
Complement C3
Rhinovirus
Collectins (via calreticulin)

---

**Tabelle 9:** Die Kernproteine der LDL-Rezeptor Genfamilie und ihre biologischen Funktionen (aus May et al., CMLS, 2005)

Receptor	Expression	Biological functions	Ligands
LDLR	ubiquitous, e.g. hepatocytes, macrophages, central nervous system	cholesterol homeostasis	apolipoprotein E, apolipoprotein B, LDL
LRP1 (LRP)	expression by a wide range of cell types and tissues, e.g. hepatocytes, neurons, vascular smooth muscle cells, macrophages, trophoblast, embryonic tissues	endocytosis of a broad range of ligands, including protease/protease inhibitor complexes etc. (see ligands), chylomicron remnant receptor, regulation of PDGF receptor signaling, regulation of calcium currents, phagocytosis of apoptotic cells, embryonic development	apolipoprotein E, chylomicron remnants, $\alpha$ 2-macroglobulin, amyloid precursor protein (APP), tPA, protease/protease inhibitor complexes, lipoprotein lipase, PDGF, TGF $\beta$
VLDLR	developing and adult brain, heart and endothelial cells, adipose tissue	neuronal migration; synaptic transmission	apolipoprotein E, Reelin, lipoprotein lipase, tissue factor pathway inhibitor
ApoER2	Developing and adult brain, testis	neuronal migration, synaptic transmission, male fertility	apolipoprotein E, Reelin
Megalin	apical plasma membrane of absorptive and secretory epithelia (e.g. renal proximal tubule), thyroid and parathyroid gland, tropho-ectoderm, visceral yolk sac, neuroectoderm	vitamin/nutrient supply; calcium homeostasis, recovery of excreted low-mole-cular weight proteins and vitamin D/vitamin D binding protein complexes, uptake and transcytosis of thyroglobulin; PTH internalization, regulation of BMP-4 signaling	apolipoprotein B, Apolipoprotein E, Apolipoprotein J, Apolipoprotein H, albumin, cubilin, retinol-binding protein, Vitamin D-binding protein, sonic hedgehog, BMP-4
LRP1b	restricted expression pattern (central nervous system)	unknown	synaptotagmin, laminin receptor precursors
MEGF7	restricted expression pattern; embryogenesis, adult CNS	unknown	unknown

## 9.1. Abkürzungsverzeichnis

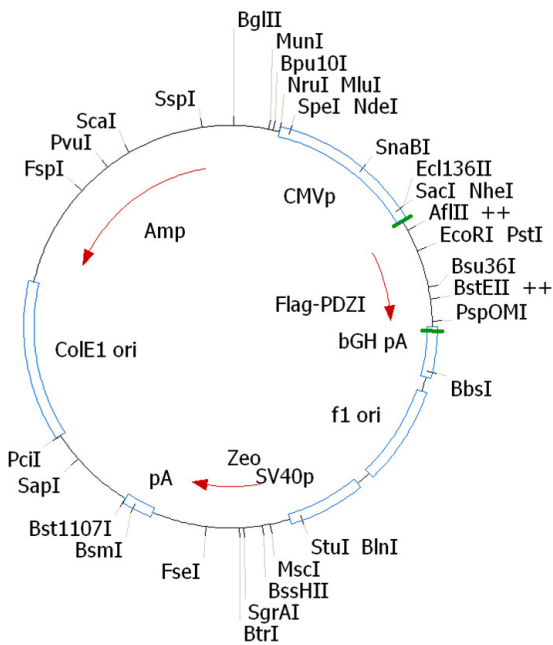
Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius
$\alpha_2$ M	alpha-2-Macroglobulin
A $\beta$	Amyloid $\beta$ -Peptid
ApoE	Apolipoprotein E
bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
ctrl	control
DIV	days in vitro
dsRNA	doppelsträngige RNA
E18	Embryonaltag 18
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Endoplasmatisches Reticulum
GST	Glutathion S Transferase
h	Stunde
HRP	Horse Radish Peroxidase
kDa	Kilodalton
LDL	Low Density Lipoprotein
LRP1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAP Kinase Kinase
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	mikromolar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
MWCO	Ausschlußgröße für Molekulargewicht
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA Rezeptor
NR	NMDA Rezeptor Untereinheit
nt	Nukleotid

---

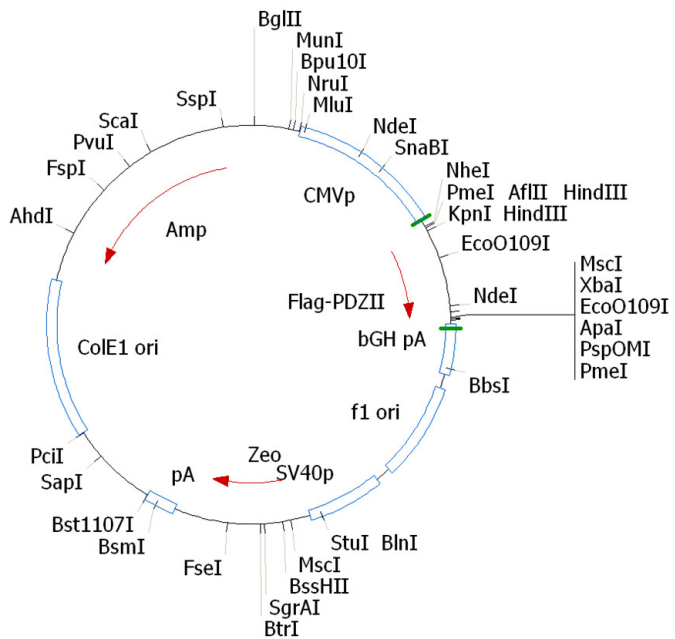
ORF	open reading frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	Plasminogenaktivator Inhibitor
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PDZ	PSD-95/Dlg/ ZO-1
PSD	post synaptic density
PTB	Phosphotyrosinbindedomäne
RAP	Receptor-associated Protein
RISC	RNA-induced Silencing Complex
RMCE	Recombinase-mediated Cassette Exchange
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNAi	RNA Interferenz
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
sec	Sekunde
siRNA	small interfering RNA
shRNA	short hairpin RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
tPA	Tissue-type Plasminogenaktivator
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
uPA	Urokinase-type Plasminogenaktivator
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VLDL	Very-Low Density Lipoprotein
vs.	versus
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem



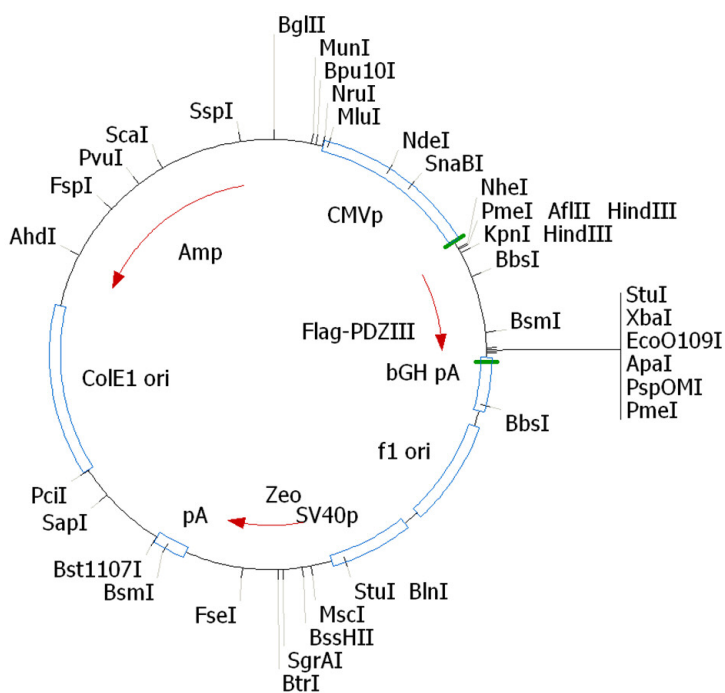
## 9.2. Vektorkarten



**pcDNA 3.1 (+) zeo flag  
PSD-95 PDZ I  
5325bp**



**pcDNA 3.1 (+) zeo flag  
PSD-95 PDZ II  
5322 bp**



**pcDNA 3.1 (+) zeo flag  
PSD-95 PDZ III  
5340bp**

### 9.3. Publikationen

Martin A.M., Kuhlmann C., Trossbach S., Jaeger S., Waldron E., Roebroek A., Luhmann H.J., Laatsch A., Weggen S., Lessmann V. and Pietrzik C.U. (2008). "The functional role of the second NPxY motif of the LRP1  $\beta$ -chain in tPA-mediated activation of NMDA receptors." *J Biol Chem* 283(18): 12004-13.

Waldron E., Heilig C., Schweitzer A., Nadella N., Jaeger S., Martin A.M., Weggen S., Brix K. and Pietrzik C.U. (2008). "LRP1 modulates APP trafficking along early compartments of the secretory pathway." *Neurobiol Dis*, Article in press

Waldron E., Isbert S., Kern A., Jaeger S., Martin A.M., Hébert S.S., Behl C., Weggen S., De Strooper B., Pietrzik C.U. (2008). "Increased AICD generation does not result in increased nuclear translocation or activation of target gene transcription." *Exp Cell Res*, Article in press

## **9.4. Danksagung**

## 9.5. Lebenslauf

## 9.6. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Mainz, den

---