

Aus dem Institut für Pathobiochemie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Eine mechanistische Analyse zur Aufnahme des A η - α -Peptids über das *Low density lipoprotein receptor-related protein 1*

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

André Kachlmeier
aus Mönchengladbach

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

06.12.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Literaturdiskussion.....	4
2.1 Morbus Alzheimer.....	4
2.2 Therapieansätze.....	5
2.3 Risikofaktoren.....	7
2.4 APP	8
2.5 Die Prozessierung von APP	8
2.6 Die Toxizität von Amyloid β	9
2.7 APP Prozessierung durch die η -Sekretase	11
2.8 Clearance über die Blut-Hirn-Schranke	13
2.9 LRP1	15
3 Material	18
3.1 Biologika und Biochemika	18
3.1.1 Zellen	18
3.1.2 Bakterien	19
3.1.3 Plasmide	19
3.1.4 Marker	20
3.1.5 Proteine	20
3.1.6 Enzyme	21
3.1.7 Antikörper.....	21
3.1.8 Primer.....	22
3.1.9 Antibiotika.....	23
3.2 Chemikalien.....	23

3.2.1 Kulturmedien	24
3.3 Kits	25
3.3.1 Pufferlösungen und Lösungsmittel	26
3.4 Laborgeräte	27
3.5 Verbrauchsmaterial	28
3.6 Software	28
4 Methoden	29
4.1 Zellbiologische Methoden	29
4.1.1 Zellkultur eukaryotischer Zellen.....	29
4.1.2 Transfektion	31
4.2 Molekularbiologische Methoden	38
4.2.1 Agarose-Gelelektrophorese	38
4.2.2 Klonierung	38
4.2.3 Aufreinigung	41
4.3 Mikrobiologische Methoden	42
4.3.1 Hitzeschocktransformation	42
4.3.2 DNA-Extraktion	42
4.4 Proteinbiochemische Methoden	43
4.4.1 Proteinextraktion	43
4.4.2 BCA Assay und photometrische Konzentrationsbestimmung	43
4.4.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
4.4.4 Coomassie Polyacrylamid-Gel Färbung	47
4.4.5 Western Blot.....	48
4.5 Statistische Auswertung	49
5 Ergebnisse.....	50
5.1 Erstellung stabiler Zelllinien.....	50
5.1.1 Klonierung artifizierlicher LRP1 Rezeptoren mit drei Liganden-bindenden Domänen	50
5.1.2 Erstellung stabiler Zelllinien mit dem Ziel der Überexpression von LRP1 und artifizierlichen LRP1 Varianten.....	53
5.1.3 Test auf Funktionalität der artifizierlichen LRP1 Konstrukte	55

5.2	Rezeptorvermittelte Endozytose von A η - α via LRP1 und artifiziellen LRP1 Varianten.....	56
5.2.1	Endozytose via LRP1.....	56
5.2.2	Endozytose via LRP1 Rezeptoren mit einer Liganden-bindenden Domäne	58
5.2.3	Endozytose via LRP1 Rezeptoren mit zwei Liganden-bindenden Domänen	59
5.2.4	Endozytose via LRP1 Rezeptoren mit drei Liganden-bindenden Domänen	61
6	Diskussion.....	63
6.1	Artifizielle LRP1 Varianten lösen die rezeptorvermittelte-Endozytose von A β aus	63
6.2	LRP1 ^{FL} in CHO 13-5-1 Zellen.....	65
6.2.1	LRP1 bindet A η - α und vermittelt die Aufnahme in CHO-Zellen.....	65
6.3	Artifizielle LRP1-Varianten in CHO 13-5-1-Zellen.....	66
6.3.1	LRP1 Minirezeptoren mit einer Liganden-bindenden Domäne lösen nicht die rezeptorvermittelte Endozytose von A η - α aus.....	66
6.3.2	LRP1 Minirezeptoren mit zwei Liganden-bindenden Domäne lösen nicht die rezeptorvermittelte Endozytose von A η - α aus.....	67
6.3.3	Drei Liganden-bindende Domänen von LRP1 ermöglichen die Endozytose von A η - α	68
6.4	Die Rolle der Liganden-bindenden Domänen bei der Interaktion zwischen LRP1 und A η - α	70
6.5	Einordnung der Methodik	71
6.6	Ausblick.....	73
7	Zusammenfassung	74
8	Anhang.....	94
8.1	Tabellen.....	94
8.2	Sequenzen	94
8.2.1	A η - α und A β	94

8.3	Vektorkarten	95
8.3.1	pLBCX Vektor	95
8.3.2	pLBCX + LRP1 Domäne I-III	95
8.3.3	pLBCX + LRP1 Domäne II-IV	96
8.4	DNA-Sequenzen.....	96
8.4.1	LRP1 Domäne I-III	96
8.4.2	LRP1 Domäne II-IV	105
8.5	Genehmigungen für Abbildungen aus Publikationen.....	116
	Publikationen	117
	Kongressbeiträge	118

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
ε	Extinktionskonstante
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
5'UTR	5'untranslated region
AS	Aminosäure
AD	Alzheimer's Disease
APP	Amyloid Precursor Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin Tri-Phosphat
BCA	Bichinolin-4-Carbonsäure
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	bovines Serumalbumin
Bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CAA	kongophile Amyloid Angiopathie
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CCV	clathrin coated vesicle
cDNA	complementary DNA
CFU	Kolonie bildende Einheit, =TU
CPM	Counts per minute
CuSo ₄	Kupfersulfat
Da	Dalton
d	Schichtdicke
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
d.h.	das heißt
DEPC	Diethyl dicarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonucleid Acid
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DNS	Desoxy-Ribonucleid Säure
E	Extinktion
E.coli	Escherischia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF-R	epidermal growth-factor-receptor
EtBr	Ethidiumbromid
ER	glattes Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazellulärmatrix
FAD	Familial Alzheimer's Disease
FCS	Fetales Kälberserum, =FBS
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCL	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HRP	horse radish peroxidase
i.d.R.	In der Regel
Kb	Kilobase
KO	Knockout
kDa	Kilodalton
l	Liter
LOAD	Late Onset Alzheimer's Disease
M	Molar (mol/l)
M. Alzheimer	Morbus Alzheimer
MCI	Mild cognitive impairment
mg	Milligramm
min.	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mol	Mol
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl statistischer Datenpunkte
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NaN ₃	Natriumazid
Nr.	Nummer
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug
p	p-Wert
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
s	Sekunde
s.	siehe
sog.	Sogenannte(r)/(s)
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	TBS + Tween20
u.A.	Unter Anderem
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen
U	Units
UTS	Untranslated region
v.a.	vor Allem
Vgl.	Vergleich
W	Watt
x g	Mal 9,81 m/s ²
z. B.	Zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der LRP1 Varianten.	2
Abbildung 2.1: Nicht-amyloidogener und amyloidogener Weg	9
Abbildung 2.2: APP Prozessierung durch die η -Sekretase	12
Abbildung 2.3: Vergleich der A β Produktion und Clearance	14
Abbildung 2.4: Darstellung von zwei Vertretern der LDL-Rezeptor Familie	15
Abbildung 3.1: Darstellung der Minirezeptorvarianten von LRP1	19
Abbildung 4.1: Die Auswertung des Titer Assays erfolgte via ImageJ	35
Abbildung 4.2: Coomassie Gelfärbung	47
Abbildung 5.1: Klonierung eines LRP1 Domäne I-III Konstrukts	50
Abbildung 5.2: Klonierung eines LRP1 Domäne II-IV Konstrukts	51
Abbildung 5.3: Klonierung von LRP1 D I-III	52
Abbildung 5.4: Klonierung von LRP1 D II-IV	52
Abbildung 5.5: Western Blots von Lysaten der stabilen Zelllinien	54
Abbildung 5.6: Funktionaler Test der erstellten Zelllinien	56
Abbildung 5.7: Uptake von A η - α in CHO K1, 13-5-1 und 13-5-1 + LRP1	57
Abbildung 5.8: Uptake von A η - α in CHO K1, 13-5-1, D I, D II, D III und D IV	58
Abbildung 5.9: Uptake von A η - α in CHO K1, 13-5-1, D I-II und D III-IV	60
Abbildung 5.10: Uptake von A η - α in CHO K1, 13-5-1, D I-III, D II-IV	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.	18
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme	19
Tabelle 3: Verwendete Plasmide	19
Tabelle 4: Verwendete Marker	20
Tabelle 5: Verwendete Proteine und Peptide	20
Tabelle 6: Verwendete Enzyme	21
Tabelle 7: Verwendete Restriktionsenzyme	21
Tabelle 8: Zur Detektion auf Western Blots verwendete Primärantikörper	22
Tabelle 9: Zur Detektion auf Western Blots verwendete Sekundärantikörper	22
Tabelle 10: Zur PCR und Sequenzierung verwendete forward Primer	22
Tabelle 11: Zur PCR und Sequenzierung verwendete reverse Primer	23
Tabelle 12: Verwendete Antibiotika	23
Tabelle 13: Verwendete Chemikalien	23
Tabelle 14: Verwendete Kulturmedien	24
Tabelle 15: Verwendete Pufferlösungen und Lösungsmittel	26
Tabelle 16: Verwendete Kits	25
Tabelle 17: Verwendete Geräte und Hilfsmittel	27
Tabelle 18: Verwendetes Verbrauchsmaterial	28
Tabelle 19: Verwendete Software.	28
Tabelle 20: Verdünnungsschema zur Bestimmung der Virustiter	35
Tabelle 21: PCR-Ansätze für eine 50 µl Reaktionslösung	40
Tabelle 22: Bedingungen bei der PCR	40
Tabelle 23: Ligation mit der NEB T4 Ligase für einen 30 µl Ansatz.	41
Tabelle 24: BSA Standardreihe für BCA-Assay	44
Tabelle 25: Zusammensetzung eines Polyacrylamid Gels	46
Tabelle 26: Titer der viralen Partikel	53
Tabelle 27: Bekannte Mutationen.	94

1 Einleitung und Zielsetzung

Für das Jahr 2040 werden ca. 81,4 Mio. demenzkranke Menschen weltweit prognostiziert (Chu 2012). Neben den persönlichen Schicksalen wird dies auch die Gesellschaft vor neue Herausforderungen stellen. So fehlt es bereits aktuell an finanziellen, aber auch personellen Ressourcen in der Pflege. Nach wie vor ist es nicht möglich, die Erkrankung kausal zu behandeln. Aufgrund dessen ist es von enormer Bedeutung, die der Erkrankung zu Grunde liegenden Pathomechanismen zu erforschen und zu verstehen.

Die Alzheimer Krankheit (AD, Alzheimer's Disease) wurde von Alois Alzheimer 1906 erstmals wissenschaftlich beschrieben. Dabei stellte Alzheimer den Fall der Auguste Deter vor, in dem er von einem „eigenartigen, schweren Krankheitsprozess der Hirnrinde“ (Alzheimer et al. 1995) berichtete. Auguste Deter entwickelte mit 51 Jahren zunächst unspezifische Symptome. So wurde sie grundlos eifersüchtig auf ihren Mann, verlor die Orientierung in der eigenen Wohnung und räumte, ohne Grund, Gegenstände von einem Ort zum anderen. Sie litt später unter manifesten Wahnvorstellungen und war weder zeitlich, räumlich, noch zur Person orientiert. Im letzten Stadium der Erkrankung lag die Patientin in fetaler Stellung im Bett und war inkontinent geworden. Auguste Deter's Gehirn wurde von Alzheimer post mortem untersucht und zeigte, neben arteriosklerotischen Veränderungen der Gefäße, eine senile Plaques, die wie man heute weiß durch den gestörten Abbau und die Akkumulation von Beta-Amyloid (A β , Amyloid β) in Deter's Gehirn entstanden war (Glenner und Wong 1984b; Masters et al. 1985).

Bei A β handelt es sich um ein Fragment des Amyloid Vorläufer Proteins (APP, Amyloid Precursor Protein), das durch die APP-Katalyse der β - und γ -Sekretasen freigesetzt wird. Bei der familiären Form des M. Alzheimer wird, im Vergleich zu gesunden Menschen, meist zu viel A β produziert (Bentahir et al. 2006).

Physiologisch unterliegt A β diversen Wegen der Beseitigung, wie z.B. der Prozessierung durch Enzyme, der Aufnahme in Neuronen, Astrozyten und Gliazellen, der Ablagerung als extrazelluläre Plaques sowie der Clearance (Beseitigung) über das lymphatische System und über die BHS (Blut-Hirn-Schranke) (Bu 2009). Unter anderem ergaben die Untersuchungen von Mawuenyega et al. 2010, dass die

Einleitung und Zielsetzung

Clearance von A β bei AD Patient:innen mehr zur Pathogenese der Erkrankung beiträgt als die Synthese.

An der Beseitigung von A β über die BHS ist insbesondere der Rezeptor LRP1 (Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1) beteiligt, dessen Expression bei den meisten AD Patient:innen reduziert ist (Kang et al. 2000). An der abluminalen (parenchymalen) Seite der BHS initiiert die LRP1-vermittelte Endozytose den quantitativ bedeutsamsten Weg, A β aus dem Gehirn zu transportieren. Dabei bindet A β an zwei der vier Liganden-bindenden Domänen des Rezeptors. So lagern Mäuse, deren Gen für LRP1 endothelspezifisch ausgeschaltet wurde, im Gehirn weitaus mehr A β an als wildtypische Mäuse (Storck et al. 2016).

2015 erschien eine Publikation von Willem et al., in der die alternative Prozessierung des APP durch die sog. η -Sekretase beschrieben wird.

Dieser Weg führt, kombiniert mit der Prozessierung durch die α -Sekretase, zur Entstehung von η -Amyloid- α (A η - α). Den Autoren zu Folge kann das Peptid, ebenso wie A β , eine Beeinträchtigung der Langzeitpotenzierung (Long term potentiation, LTP), also der synaptischen Plastizität, auslösen.

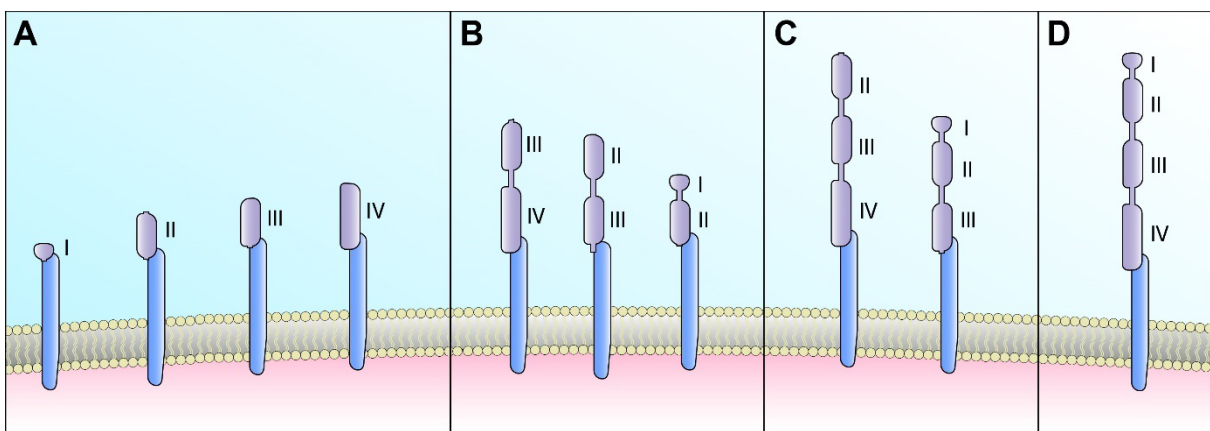


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der LRP1 Varianten.

Schematische Darstellung der (A) bereits vorhandenen Einzeldomänen- bzw. Minirezeptoren bzw. in dieser Arbeit zu erstellenden (B) Doppeldomänenrezeptoren und (C) Dreifachdomänenrezeptoren. In (D) wird das Protein LRP1 dargestellt (mit allen Liganden-bindenden Domänen). Vgl. 2.9 für weitere Erläuterungen. Die Liganden-bindenden Domänen sind jeweils mit römischen Zahlen versehen. Schematische Darstellung unter Vernachlässigung korrekter Proportionen und Proteinstrukturen.

Einleitung und Zielsetzung

Da das neu entdeckte Fragment einen Teil der Sequenz des A β beinhaltet, stellt sich die Frage, ob ebenfalls eine Interaktion mit LRP1 besteht. Ziel dieser Arbeit ist es daher, zu untersuchen, ob der Rezeptor A η - α binden und in Zellen aufnehmen kann. Sollte sich A η - α als Ligand für LRP1 erweisen, soll der funktionelle Mechanismus des Vorgangs geklärt werden. Dafür sollen die Liganden-bindenden Domänen des Rezeptors, die die Bindung mit dem Proteinfragment eingehen, bestimmt werden.

Konkret sollen zu diesem Zweck Zellmodelle etabliert werden, die entsprechend Abbildung 1.1 verschiedene Kombinationen der Liganden-bindenden Domänen des Rezeptors exprimieren und auf ihr Aufnahmeverhalten von A η - α hin untersucht werden. Die Erstellung der in-vitro Modelle erfordert, das Erbgut der Zellen durch virale Partikel zu verändern (4.1.2.2). Dabei sollen sowohl die Zellen als auch das Virus für spätere Experimente, die die Liganden-bindenden Domänen des Rezeptors betreffen, erneut verwendet werden können.

Die Ergebnisse der mechanistischen Analyse sollen schließlich dabei helfen, die Pathogenese der Alzheimer Krankheit besser zu verstehen und mögliche Ansatzpunkte für Therapieverfahren zu detektieren, respektive eventuelle Kontraindikationen bisheriger Therapieansätze aufzudecken.

2 Literaturdiskussion

2.1 Morbus Alzheimer

Der Begriff der Neurodegeneration beschreibt den Untergang von Neuronen. Oft ist dabei der Untergang zentralnervöser Neuronen gemeint. Die Folge ist der Funktionsverlust der ausgefallenen Nervenzellen. Bekannte Vertreter neurodegenerativer Erkrankungen sind Multiple Sklerose, Morbus Parkinson, Chorea Huntington sowie M. Alzheimer.

Letztgenannte ist zusätzlich, mit ca. 60%, die häufigste Form der Demenz. Der M. Alzheimer ist benannt nach seinem Erstbeschreiber Alois Alzheimer, der 1906 den Fall der Auguste Deter beschrieb (Alzheimer et al. 1995). Dabei beschrieb er die Symptome der Patientin und den Verlauf der Erkrankung. Alzheimer erforschte mikroskopisch Hirnschnitte und beschrieb Auffälligkeiten wie arteriosklerotische Gefäßveränderungen und senile Plaques, deren typischer Bestandteil das Amyloid β ($A\beta$) ist, wie später bekannt wurde (Glennner und Wong 1984b, Masters et al. 1985). Ebenfalls wurden längliche Veränderungen an Neuronen beschrieben, welche heute ebenfalls bekannt sind als intrazelluläre, neuro-fibrilläre Bündel (neurofibrillar tangles). Diese entwickeln sich im Inneren der Neurone durch Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins. Dieses Protein ist unter physiologischen Bedingungen an der Stabilisierung des Zytoskeletts beteiligt und führt im hyperphosphorylierten Zustand zur sog. Tauopathie (Mandelkow et al. 2007).

M. Alzheimer lässt sich in zwei Formen einteilen: Familiär (FAD, Familial Alzheimer's Disease) und sporadisch (LOAD, Late Onset Alzheimer's Disease).

Beim FAD bricht die Erkrankung früher aus, etwa zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr. Zu Grunde liegen sehr häufig Mutationen in den Genen „Präsenilin-1“ (Chromosom 14), Präsenilin-2 (Chromosom 1) und/ oder APP (Amyloid Precursor Protein, Chromosom 21). Letzteres erklärt das signifikant häufigere Vorkommen des FAD bei Menschen mit Trisomie 21 gegenüber der Normalbevölkerung (Masters et al. 1985, Glennner und Wong 1984a). Der Anteil der familiären Fälle der Erkrankung ist mit ca. 5% jedoch weitaus geringer als der LOAD. Bei der ab dem 65. Lebensjahr ausbrechenden Erkrankung wird von einem multifaktoriell bedingten Pathomechanismus ausgegangen. Beiden Formen gemeinsam ist die Degeneration von Neuronen, speziell in Neocortex und Hippocampus (Sisodia 1999), was eine Atrophie dieser Hirnregionen zur Folge hat.

Literaturdiskussion

Die Betroffenen erleben die ersten Symptome i.d.R. erst, wenn die Krankheit bereits einen Großteil der Neurone degeneriert hat. Dies macht frühes Erkennen und Intervenieren zu einem Problem der Behandlung, da abgestorbene Neuronen unwiederbringlich sind. AD PatientInnen kommen mit Voranschreiten der Erkrankung immer weniger ohne Hilfe aus. Neben der Erforschung der molekularen Pathomechanismen spielen daher auch Versorgungs- und Pflegeforschung eine wachsende Rolle. Während 2005 weltweit ca. 24,3 Mio. Menschen weltweit mit der Erkrankung lebten, werden für 2040 Zahlen um 81,4 Mio. prognostiziert. Diese Zahlen sind auch mit dem demographischen Wandel zu erklären, also einer alternden Gesellschaft.

Die Erkrankung lässt sich in drei Phasen einteilen: Eine präklinische Phase, die milde kognitive Beeinträchtigung (MCI, mild cognitive impairment) und schließlich das Vollbild der Demenz.

In der Präklinischen Phase müsste eine Therapie bereits ansetzen, um den Untergang der Neurone und damit eine spätere Demenz zu verhindern. Entgegen dieser Annahme wird jedoch auch konstatiert, eine Behandlung während der Phase des MCI wäre verfrüht, da nur 50% aller Menschen mit MCI anschließend auch an AD leiden (Gauthier et al. 2006).

Eine gezielte Diagnostik ist unumgänglich. So wird aktuell an einem Bluttest geforscht, der bereits geringe Level von A β erkennen kann (Schindler et al. 2019). Auch kann der Liquor auf Tau, A β und APP untersucht werden. Tau scheint zur Früherkennung jedoch insgesamt ungeeigneter zu sein, da Tauopathien erst in späteren Phasen beginnen und kein alzheimerspezifisches Merkmal darstellen (z.B. auch bei frontotemporaler Demenz) (Palmqvist et al. 2019). Der Nutzen einer solchen Frühdiagnostik wäre, Studien und Therapien bereits in der präklinischen Phase der Erkrankung stattfinden lassen zu können.

2.2 Therapieansätze

Acetylcholinesterase-Inhibitoren (AChE-I) sollen den Verlust von Neuronen kompensieren. Durch längere Verfügbarkeit von Acetylcholin, einem bedeutsamen Neurotransmitter im synaptischen Spalt, sollen Symptome reduziert werden. Die Erkrankung kann so jedoch nicht aufgehalten werden. Die Medikamente bringen ab

Literaturdiskussion

einer gewissen Dosierung außerdem erhebliche, periphere unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) mit sich (Mehta et al. 2017).

Da die Ablagerungen von A β im Gehirn mit Entzündungsreaktionen einhergeht, wurden bereits mehrfach Versuche unternommen, den Erkrankungsverlauf durch NSAIDs positiv zu beeinflussen (Heneka et al. 2011; Meister et al. 2013). Zuletzt erklärten jedoch die Forscher um Meyer et al. 2019 die INTREPAD-Studie für gescheitert, in der Naproxen (ein NSAID) über einen längeren Zeitraum Proband:innen verabreicht wurde, die zwar noch nicht an M. Alzheimer litten, jedoch ein potentes Risiko hatten, im Verlauf die Erkrankung zu entwickeln. ProbandInnen, die Naproxen erhielten, entwickelten in der Studie entgegen den Erwartungen sogar häufiger ein MCI als Teilnehmende der Kontrollgruppe.

Auch A β selbst ist ein Angriffspunkt der AD-Therapie: Menschen, die ein hohes Alter erreichten und dabei keine senilen Plaques entwickelten, besitzen häufig Antikörper, die ein Aggregieren von A β verhindern sollen.

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass jene Antikörper die A β -Ablagerungen im Gehirn verringern (Budd Haeberlein et al. 2017; Panza et al. 2016). Die beiden Firmen Biogen und Eisai begannen daraufhin die EMERGE und ENGAGE Studien (Phase-3-Studien), die jedoch abgebrochen wurden als klar wurde, dass die erwarteten Ergebnisse nicht mehr erreicht werden konnten.

Um die Produktion von A β zu verringern, werden immer wieder Versuche unternommen, die an der Entstehung beteiligten Enzyme zu inhibieren.

Dabei ist bislang vor allem die β -Sekretase BACE-1 (Beta Site Cleaving Enzyme 1) im Fokus (Vassar et al. 1999). Verubecestat sollte BACE-1 inhibieren und so zu niedrigeren A β Leveln im Gehirn führen. Auch diese Forschung scheiterte zuletzt (Egan et al. 2019; Egan et al. 2018). Gründe für das Scheitern der von Merck geförderten Studien waren neben den UAW wie z.B. Schlafstörungen, Gewichtsverlust und Stürzen, die Wirkungslosigkeit des Medikaments.

Kritiker sehen im Scheitern der Studien einen Beweis für die Widerlegung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese (Panza et al. 2019).

2.3 Risikofaktoren

Ein insgesamt gesunder Lebensstil soll das Risiko der Erkrankung senken, wie neuere Untersuchungen bestätigten. Dementsprechend gilt ein ungesunder Lebensstil als unspezifischer Risikofaktor für die Erkrankung (Lourida et al. 2019, Rabin et al. 2019). Unter allen Risikofaktoren bleibt hohes Alter der wichtigste (Hebert et al. 2003; Ferri et al. 2005). Daneben gelten auch Diabetes Mellitus und Bluthochdruck als gesichert. Es ist davon auszugehen, dass die meisten das Gefäßsystem und den Lipidstoffwechsel schädigenden Risikofaktoren auch das Risiko erhöhen, an M. Alzheimer zu erkranken (Lu et al. 2009). Zur Entstehung der Erkrankung tragen jedoch auch konkretere Risikofaktoren bei.

Dazu gehören genetische Risikofaktoren, allen voran APOE4, eines von drei möglichen Allelen von APOE (Chromosom 19). Apo E (Apolipoprotein E) ist ein Glykoprotein von 34 kDa Größe. Exprimiert wird es vor allem in Astrozyten und der Leber. Es ist involviert in den physiologischen Lipidstoffwechsel. Bei Vorhandensein eines Allels des APOE4 Gens (Vgl. Apolipoprotein-E-Polymorphismus) ist das Risiko für M. Alzheimer im Vergleich zu APOE3 3,7-fach, bei beiden Allelen sogar bis zu 12-fach erhöht (sog. Gendosis-Effekt). Darüber hinaus wird der messbare Beginn der Erkrankung bereits früher erreicht. Etwa 1,7% der Gesamtbevölkerung sind dabei homozygote Träger des Gens.

APOE4 führt zu Schäden an der BHS und bei Bindung mit A β , im Vergleich zu APOE2 und APOE3, zu einer schlechteren Bindung an LRP1, den wichtigsten Rezeptor für die Clearance des A β über die BHS (Nelson et al. 2016; Bertram und Tanzi 2008; Durmaz et al. 2019) (2.9).

Das an Synapsen und in Endothelzellen lokalisierte Phosphatidylinositol-binding Clathrin Assembly protein (Picalm) wird durch das Gen PICALM kodiert, welches in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) als weiterer Risikofaktor für M. Alzheimer ausgemacht werden konnte (Baig et al. 2010). Das Protein ist bei der Clathrin-vermittelten Endozytose von Bedeutung und involviert in den Transport und die Clearance von A β über die BHS. Ein Mangel des Proteins führt dementsprechend zu einer beeinträchtigten A β Clearance. (Storck et al. 2018; Zhao et al. 2015).

2.4 APP

Im Zentrum des M. Alzheimer steht ein Typ 1 transmembranäres Protein namens APP, dessen physiologische Funktionen vielfältig zu sein scheinen, jedoch noch nicht abschließend geklärt sind. Zu diesen werden unter anderem neuronale Stammzellentwicklung, Schutzfunktion von Neuronen sowie die Beteiligung am Sprossen neuer Axone gezählt. Wahrscheinlich spielt es auch eine Rolle im Aufbau von Synapsen. Dem Protein werden sowohl extra- als auch intrazelluläre Funktionen zugeschrieben und es soll involviert sein in diverse Signaltransduktionswege (Dawkins und Small 2014; Müller-Hill und Beyreuther 1989). Ubiquitär kommen verschiedene Strukturisomere des Proteins vor, in Neuronen zum Beispiel das APP695. Die Länge der Isoformen liegt zwischen 639 und 770 Aminosäuren (AS). Der Großteil des Proteins ist extrazellulär und besteht aus zwei Ektodomänen. Der 100 AS lange, C-terminale Anteil des Proteins beinhaltet die Sequenz von A β und weist eine hohe Aggregationsfreudigkeit auf (Dyrks et al. 1988).

Lokalisiert werden kann das Protein vor allem in der Plasmamembran, im Trans Golgi Netzwerk (TGN) und im Endosom (Yamazaki et al. 1996; Selkoe et al. 1996; Kang et al. 1987). Dort findet auch der Großteil der Prozessierung statt (García-González et al. 2019).

2.5 Die Prozessierung von APP

Bekannt wurde das Protein nicht durch seine Eigenfunktion, sondern durch die Produkte seiner Prozessierung. Zu nennen ist insbesondere A β , welches namensgebend für das Vorläuferprotein ist. APP unterliegt diversen Wegen der Prozessierung, membranständiges insbesondere dem Shedding (proteolytisches Abtrennen extrazellulärer Domänen) durch Metalloproteasen der Extrazellulärmatrix. Die Prozessierungsmöglichkeiten sind vielfältig, wobei bislang zwei Wege eine wichtige Rolle beim M. Alzheimer spielten: Der amyloidogene und der nicht-amyloidogene Weg (Abbildung 2.1).

Beim nicht-amyloidogenen Weg führt der Schnitt der α -Sekretasen (ADAM-10, ADAM-17, ADAM-9) zur extrazellulären Freisetzung von sAPP- α (lösliches APP- α , soluble APP- α) und dem Verbleib von CTF- α (C-terminales Fragment- α , auch C83) in der Zellmembran. Die Sequenz von A β wird bei dieser Art der Prozessierung zertrennt. Dieser Weg beschreibt einen neuroprotektiven Weg der APP-Prozessierung (Kojro und Fahrenholz 2005; Mattson et al. 1993).

Literaturdiskussion

Die kombinierte Katalyse durch die β - und γ -Sekretase führt im amyloidogenen Weg mittels C- und N-terminalen Schnitten der $A\beta$ -Sequenz zur Freisetzung des Moleküls (Abbildung 2.1). Die Fähigkeit der γ -Sekretase, auch an benachbarten Stellen zu schneiden, führt zur Freisetzung verschiedener $A\beta$ Spezies, die zwischen 39 und 43 AS lang sind und sich in ihrer Toxizität unterscheiden. Auch im amyloidogenen Weg entstehen membranständige und lösliche Zwischenprodukte, deren Beteiligung im extrazellulären (sAPP) sowie intrazellulären (AICD, CTF) Stoffwechsel noch nicht abschließend geklärt ist, wobei die intrazellulären Fragmente genmodulierende Funktionen zu haben scheinen (Nunan und Small 2000).

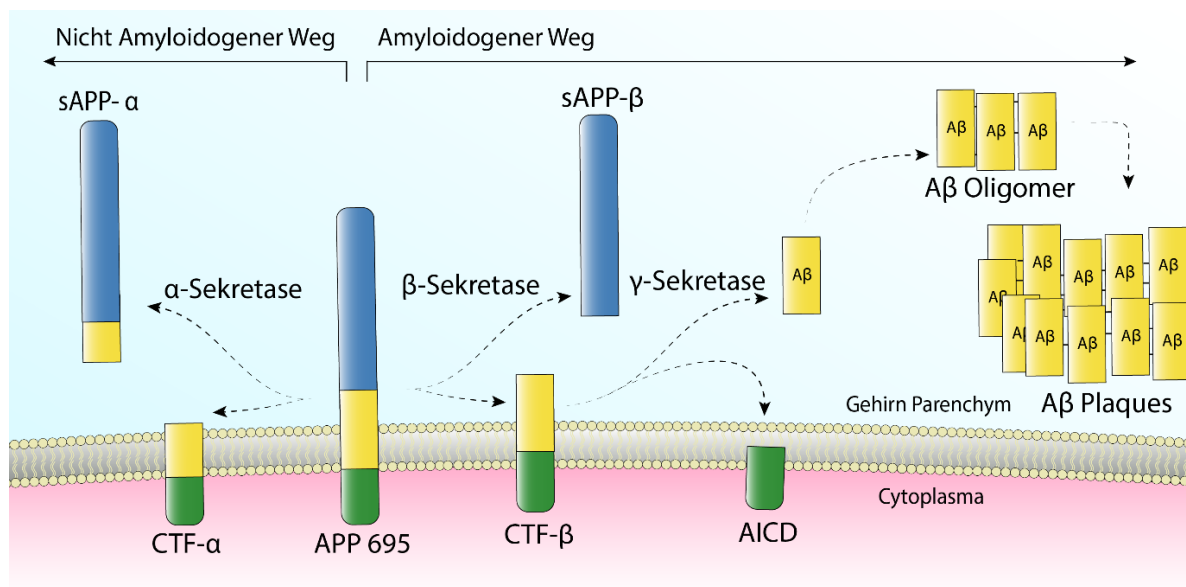


Abbildung 2.1: Nicht-amyloidogener und amyloidogener Weg der APP Prozessierung.

Links: Die Katalyse des APP durch die α -Sekretase führt zur Freisetzung von sAPP- α und dem Verbleib von CTF- α in der Membran. Die Sequenz von $A\beta$ wird zertrennt. Rechts: Die Prozessierung des Proteins durch die β - und γ -Sekretasen führt zur Freisetzung von $A\beta$. Dieses akkumuliert bei Überfluss mit weiteren $A\beta$ Molekülen in Oligomeren und schließlich Plaques. Neben $A\beta$ entstehen bei diesem Weg sAPP- β , CTF- β und AICD (amyloid intracellulär domain). Schematische Darstellung unter Vernachlässigung korrekter Proportionen und Proteinstrukturen.

2.6 Die Toxizität von Amyloid β

$A\beta$ entsteht in allen Menschen und das bereits pränatal (Estus et al. 1992; Golde et al. 1992). Daher wird von einer physiologischen Funktion ausgegangen, die jedoch weiterhin unbekannt ist.

Physiologisch wird v.a. $A\beta_{1-40}$ produziert, wobei dieses auch mit der kongophilen Amyloid Angiopathie (CAA) assoziiert ist.

M. Alzheimer ist bevorzugt mit einer langen Variante des Peptids: $A\beta_{1-42/43}$ assoziiert.

Literaturdiskussion

Sowohl $A\beta_{1-40}$ als auch $A\beta_{1-42/43}$ weisen zytotoxische Eigenschaften auf. Letztgenanntes ist mengenmäßig weniger vertreten, allerdings viel aggregationsfreudiger. Es treibt die Bildung seniler Plaques voran (Jarrett und Lansbury 1993), was vor allem an den hydrophoben Eigenschaften der zusätzlichen Aminosäuren liegt (Gravina et al. 1995).

Bei der FAD sind Mutationen im APP Gen und den PSEN-1 und PSEN-2 Genen häufig. Folgen dieser Mutationen wurden im Anhang dieser Arbeit hinterlegt (Tabelle 27).

$A\beta$ erscheint in löslicher und unlöslicher Form. In den Gehirnen von AD Patientinnen und Patienten findet sich post mortem mehr lösliches $A\beta$ und unter den löslichen Varianten signifikant mehr $A\beta_{1-42/43}$ als $A\beta_{1-40}$. (Podlisny et al. 1998; Kuo et al. 1996).

Auch in weiteren Studien wurde den längeren Varianten eine höhere Toxizität zugeschrieben als $A\beta_{1-40}$, weshalb davon ausgegangen wurde, dass letzteres die physiologische Form sei, während die längeren Varianten pathologische Konsequenzen mit sich brächten. Entnommene Proben von FAD Patienten stützten diese These letzten Endes nicht (Small und McLean 1999).

Studien konnten aufdecken, dass $A\beta$ in vitro zum Absterben von Neuronen führt. Demonstriert wurde, dass $A\beta$ Monomere eine wachstumsfördernde Wirkung auf die Neuronen haben. Sobald sich jedoch Dimere und Oligomere formiert hatten, setzte die neurotoxische Wirkung ein (Pike et al. 1991).

Es gibt Theorien, die $A\beta$ zuschreiben, die Kalzium-Homöostase zu stören (Mattson et al. 1992) und andere, die ihm eine negative Beeinflussung der Na^+/K^+ -ATPase attestieren (Mark et al. 1995).

Weitere Studien sehen Kupfer und Zink als aggregationsfördernde Metalle im Fokus des Pathomechanismus. Ebenfalls sollen reaktive Sauerstoff Spezies (Reactive Oxygen Species, ROS) (Esmieu et al. 2019) eine Rolle spielen.

Ein indirekter Mechanismus der Toxizität wird ebenfalls diskutiert: So könnte $A\beta$ in Mikroglia Vorgänge induzieren, die dann auf Neurone wirken (Combs et al. 1999).

Die Gruppe um Geula et al. machte 1998 die Entdeckung, dass die Injektion reifer $A\beta$ Spezies in die Gehirne älterer Rhesus Affen zwar neurotoxisch wirkt, die Injektion bei jungen Affen jedoch zu nur sehr geringen neurotoxischen Effekten führt.

Dies ließ Grund zur Annahme, dass M. Alzheimer multifaktoriell bedingt ist und dass weitere, altersassoziierte Merkmale ausgeprägt sein müssen, um die Toxizität durch $A\beta$ zu ermöglichen (Small und McLean 1999). Die verminderte Expression des

Literaturdiskussion

Clearance-Rezeptors LRP1 im Gehirn ist dabei ein solches Merkmal älterer Menschen (Kang et al. 2000).

Neuere Erkenntnisse belegen eine von den löslichen Proteinen ausgehende Toxizität, weshalb nicht mehr den Plaques per se die Toxizität zugeschrieben wird. Sie stellen demnach lediglich ein Symptom der Erkrankung, bzw. einer hohen A β -Last, dar.

2.7 APP Prozessierung durch die η -Sekretase

Die Familie der Matrix Metalloproteinasen (MMP) gehört zur Enzymklasse 3 (Hydrolasen) und umfasst 23 humane bzw. 24 murine Enzyme, die, je nach Struktur und Substratspezifität, in weitere Untergruppen einteilbar sind (Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, MT-MMPs). Bei letztgenannten handelt es sich um membranständige Varianten der Enzyme (membrane type). Zu den Substraten der MMPs zählen etliche Moleküle der Extrazellulärmatrix (EZM), die beteiligt sind an zellulärer Differenzierung, Migration, Regulierung von Wachstumsfaktoren, Apoptose, Angiogenese, Inflammation und Signalisierung. MMPs werden auch von Leukozyten genutzt, um die BHS durchlässig zu machen und die Leukozytenmigration zu ermöglichen (Zhang et al. 2010).

Auch LRP1 wird durch das Enzym MT1-MMP reguliert (Lehti et al. 2009).

MT-MMPs enthalten eine als Furin-ähnliche-Erkennungsstelle (Furin-like enzyme recognition motif) bezeichnete Sequenz, die von Serinproteasen des Subtilisin-Typs erkannt werden. Letztgenannte führen so zur Überführung des Proenzym in die katalytisch aktive Form. Weiter werden die Enzyme aktiviert durch Radikale, die z.B. nach Hypoxie auftreten. Die kurze Halbwertszeit, endogene Inhibitoren (TIMPs, Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases), sowie die Aufnahme in Zellen führen zu einer Homöostase der Enzyme. Während die Blockade durch TIMPs dabei reversibel ist, kann α 2M (α -2-Makroglobulin), ein Ligand für LRP1, das Enzym irreversibel binden und so dauerhaft hemmen.

Auf zwei Weisen soll MT5-MMP (MMP-24) in die Entstehung des M. Alzheimer involviert sein: Durch die Aktivierung pro-inflammatorischer Wege und durch Prozessierung von APP (Baranger et al. 2016a). Letzteres führt zu neuartigen Fragmenten (Baranger et al. 2016b). Die auch als η -Sekretase bezeichnete Metalloproteinase findet sich in Zellen des Nervensystems und ist auch in Amyloid-Plaques präsent, was eine Beteiligung an der Pathogenese des M. Alzheimer

Literaturdiskussion

weiter nahelegt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass sich bei Abwesenheit der η -Sekretase in 5xFAD-Mäusen die $A\beta$ -Level drastisch reduzierten und dementsprechend kognitive Funktionsstörungen geringer ausfielen (Baranger et al. 2017). Auf der anderen Seite führt die Katalyse von APP zu einem sAPP- η und einem CTF- η Fragment. Letzteres kann im Anschluss sowohl durch die β - als auch die α -Sekretase prozessiert werden. Während aus der Katalyse von η - und β -Sekretase ein Fragment namens Amyloid η - β ($A\eta$ - β) hervorgeht, führen die kombinierten Schnitte von η - und α -Sekretase zu neurotoxischen Amyloid η - α ($A\eta$ - α) Fragmenten, welche Schäden an Synapsen verursachen und die LTP in vivo beeinträchtigen (Abbildung 2.2) (Willem et al. 2015; Tyan und Koo 2015; Mensch et al. 2021). Medikamente, die in die Enzym-Homöostase der APP-Prozessierung eingreifen, waren bis dahin ein vielversprechender Ansatzpunkt einer möglichen Alzheimer-Therapie. Die Arbeitsgruppe um Willem et al. konnte jedoch demonstrieren, dass die Inhibition der an der $A\beta$ -Freisetzung beteiligten Enzyme zu einem Anstieg der $A\eta$ - α Level führte.

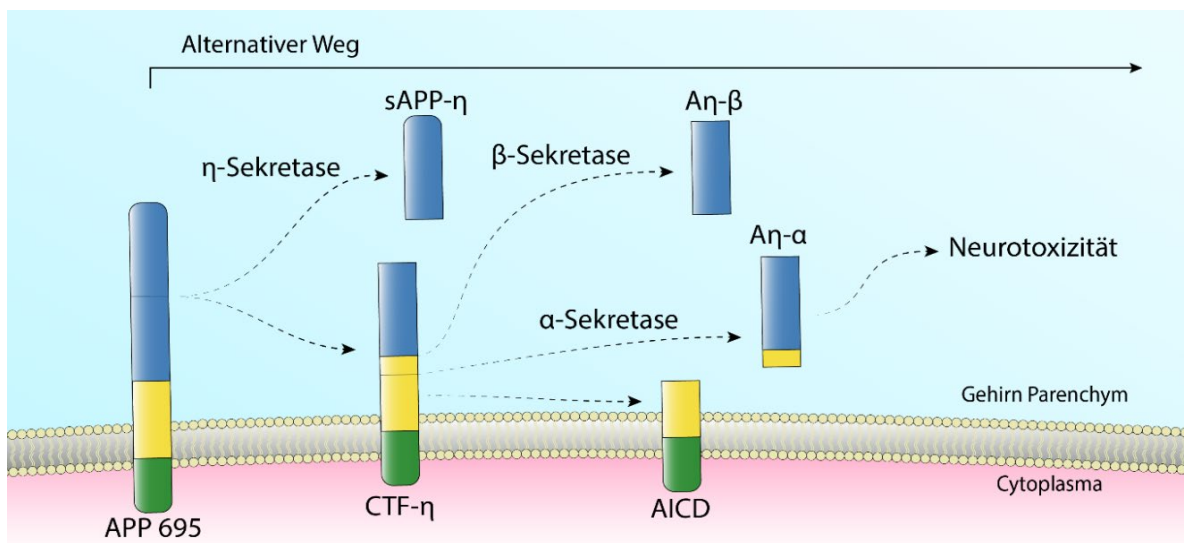


Abbildung 2.2: APP Prozessierung durch die η -Sekretase als alternativer Weg

Ausgehend von APP695 führt die gekoppelte Prozessierung von η - und β -Sekretase zu $A\eta$ - β . Erfolgt die Prozessierung jedoch durch η - und α -Sekretasen, entstehen die toxischen $A\eta$ - α Moleküle. Bei beiden Varianten der Prozessierung entstehen membranständige Fragmente (CTF- η , AICD) bzw. ein lösliches Molekül (sAPP- η). Schematische Darstellung unter Vernachlässigung korrekter Proportionen und Proteinstrukturen.

$A\eta$ - α ist nicht aggregationsfreudig, resp. formiert es keine Plaques. Allerdings haben immunhistochemische Untersuchungen ergeben, dass es im Hof der senilen Plaques erscheint. Der Weg der Prozessierung kann durch Inhibition der β -Sekretase getriggert werden (Willem et al. 2015).

Literaturdiskussion

Fernab dieser Betrachtung des $A\eta$ - α , haben einige Forscher die η -Sekretase selbst im Fokus. So konnten García-González et al. zeigen, dass sowohl die aktive als auch die inaktive Form des Enzyms (MT5-MMP) zu einem Anstieg der $A\beta$ -Levels führt. Die Freisetzung von sAPP η -Fragmenten (Vgl. Abbildung 2.2) führt laut Paumier et al. bereits zur Akkumulation von $A\beta$ -Spezies im Gehirn.

2.8 Clearance über die Blut-Hirn-Schranke

Der Pathologie des M. Alzheimer liegt ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Clearance von $A\beta$ zu Grunde (Hardy und Selkoe 2002).

Dies wurde zuletzt gestützt durch die Ergebnisse einer Studie von Mawuenyega et al. aus dem Jahr 2010. Markierte Aminosäuren wurden Probanden mit und ohne M. Alzheimer injiziert. Anschließend wurden die Raten der Produktion mit denen der Clearance verglichen. Dabei wurde sowohl $A\beta_{1-40}$ als auch $A\beta_{1-42}$ untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine Differenz von 30% bei der Clearance von $A\beta$ im Vergleich von Probanden mit M. Alzheimer und gesunden Patienten (Abbildung 2.3).

Aus diesen Ergebnissen leitet sich die Fragestellung nach den Mechanismen und Ursachen der verminderten Clearance ab.

Unter der BHS versteht man die Barriere zwischen dem Blut der Peripherie und des Gehirns, die durch die Endothelzellen der Hirnkapillare gebildet wird.

Besagte Endothelzellen, Perizyten, Astrozyten und Basalmembran bilden zusammen die sog. Neurovaskuläre Einheit. Dabei induzieren Astrozyten und Perizyten die Ausbildung der BHS bzw. ihrer molekularen Korrelate in den Endothelzellen.

Endothelzellen der BHS haben mehr Mitochondrien als Endothelzellen der Peripherie. Grund dafür ist der enorme Energiebedarf ATP-abhängiger Transportmechanismen, wie z.B. dem P-Glykoprotein (P-gp, ABCB1). Die Aufnahme von $A\beta$ aus dem Hirnparenchym in die Endothelzellen der BHS geschieht v.a. via LRP1. $A\beta$ wird intrazellulär vom abluminalen zum luminalen Pol der Zelle bewegt und durch P-gp ins Blut gepumpt (Storck et al. 2018).

Literaturdiskussion

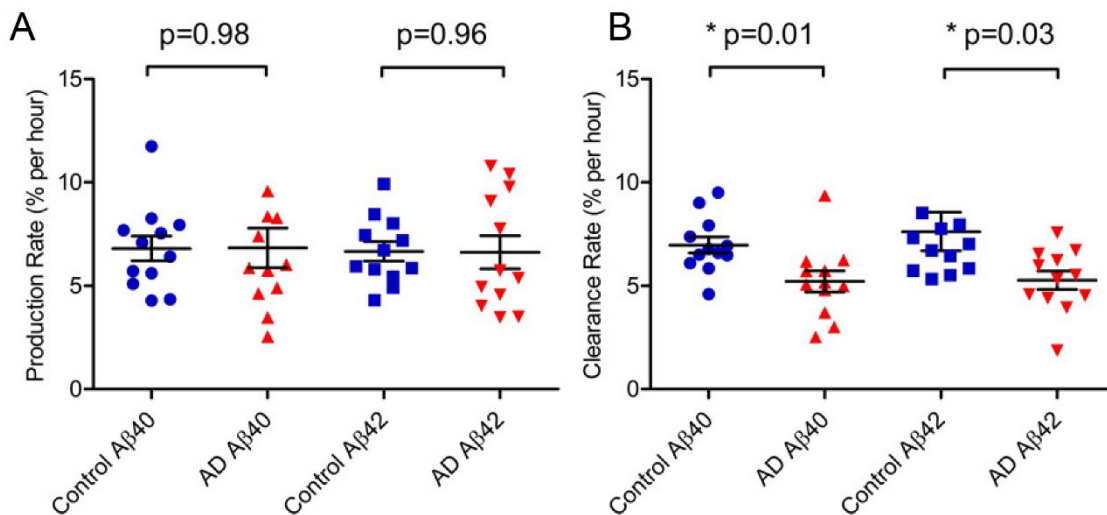


Abbildung 2.3: Vergleich der Aβ Produktion und Clearance von M. Alzheimer Patienten und Menschen ohne M. Alzheimer

Beobachtet wurden Unterschiede in **(A)** durchschnittlicher, fraktionierter Produktionsrate und **(B)** durchschnittlicher, fraktionierter Clearancerate von jeweils Aβ₁₋₄₀ und Aβ₁₋₄₂.

Der angegebene p-Wert attestiert bei **(A)** signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bei einem Konfidenzintervall von 95%. Bei der Produktion **(B)** besteht kein signifikanter Unterschied der Gruppen. Übernommen und verändert von Mawuenyega et al. 2010 nach freundlicher Genehmigung von „THE AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE“ (8.5).

APOE hat für die Clearance von Aβ eine besondere Bedeutung. So kann der APOE-Aβ-Komplex besonders gut via LRP1 beseitigt werden. In unkomplexierter Form jedoch konkurrieren APOE und Aβ um die Bindung an LRP1 (Shinohara et al. 2017). M. Alzheimer korreliert mit einer Degeneration der BHS. Bereits Alois Alzheimer bemerkte bei seinen Untersuchungen von post mortem Gehirnen arteriosklerotische Veränderungen der Hirngefäße. Tatsächlich sind Schäden am Gefäßsystem mit einem höheren Risiko für M. Alzheimer vergesellschaftet. Es entsteht ein Teufelskreis: Die Ablagerung von Aβ in der Basalmembran der neurovaskulären Einheit resultiert aus dem Überfluss des Peptids und führt auch zur weiteren Degeneration der BHS im Rahmen der CAA (Magaki et al. 2018; Carare et al. 2013).

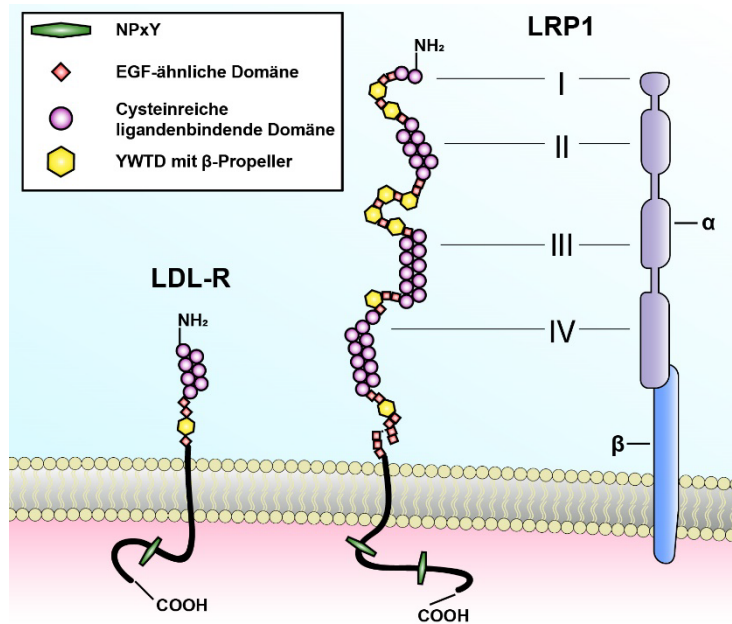


Abbildung 2.4: Darstellung von zwei Vertretern der LDL-Rezeptor Familie: LDL-R und LRP1. Letzterer wird rechts in vereinfachter, für diese Arbeit ausreichender Form, dargestellt. Dabei wird er reduziert auf zwei Bestandteile: Die β -Kette und die α -Kette, welche 4 Liganden-bindende Domänen beinhaltet. Schematische Darstellung unter Vernachlässigung korrekter Proportionen und Proteinstrukturen.

2.9 LRP1

Bei LRP1 handelt es sich um ein Protein der LDL-Rezeptor (Low Density Lipoprotein) -Familie. Die Gruppe ist benannt nach ihrem zuerst entdeckten Vertreter: Dem LDL-Rezeptor. Entdeckt wurde er in der Leber als wichtiges, in den Lipidstoffwechsel involviertes Molekül. Daneben sind mittlerweile zahlreiche Liganden für den Rezeptor bekannt. Aufgebaut ist das Molekül aus einer Liganden-bindenden Domäne, die in den Extrazellularraum ragt und

einem transmembranären bis intrazellulären C-Terminus, der eine intrazelluläre NPxY-Domäne aufweist. Nach Phosphorylierung des Tyrosins im NPxY Motiv wird die Rezeptor-vermittelte Endozytose eingeleitet (Shinohara et al. 2017).

Mutationen können hier u.a. zu Hypercholesterinämien führen, da zirkulierendes Cholesterin nicht mehr in die Zellen aufgenommen wird und im Gefäßsystem verbleibt, wodurch Arteriosklerose entstehen kann (Jeon et al. 2001).

Verbunden werden die Abschnitte über eine YWTD β -Propeller Sequenz und drei flankierende, EGF-ähnliche (Epithelial Growth Factor) Domänen (Abbildung 2.4)

Diese EGF-ähnlichen Muster treten vor allem in membranständigen Proteinen auf und sind 30 bis 40 AS lang. Die Muster bestehen aus sechs Cystein-Resten, welche Disulfidbrücken ausbilden. Typisch ist das Auftreten in sogenannten Repeats, also Wiederholungen, in denen die Sequenz eine funktionelle Einheit bilden. Auch die Liganden-bindenden Domänen der LDL-Rezeptoren sind aus Cystein-reichen Wiederholungen (CR-Repeats) aufgebaut.

Im sauren Milieu des Endosoms erfolgt eine Ca^{2+} -abhängige Bindung der β -Propeller Domäne an die Liganden-bindende Domäne. Daran sind auch die EGF-ähnlichen Regionen beteiligt (Rudenko et al. 2002). Bei diesem Vorgang werden am Rezeptor

Literaturdiskussion

gebundene Liganden freigegeben. Die β -Propeller Domänen regulieren vermutlich auch die Faltung der extrazellulären Portion des Rezeptors und sorgen für die korrekte Darstellung an der Zelloberfläche. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass ohne β -Propeller Domänen keine Liganden-Bindung von RAP (Receptor-associated Protein) oder α 2M stattfinden kann (Sun et al. 2005)

Zur LDL-Rezeptor-Familie gehört auch LRP1 (LDL Receptor-related Protein 1), welches sowohl Transport- als auch Signalfunktionen hat.

LRP1 ist der Vertreter der LDL-R Familie, der mit den meisten weiteren Proteinen interagieren kann. Die Phosphorylierung durch Kinasen macht so Interaktionen mit intrazellulären Proteinen wie FE65 und PSD-95 möglich. Das distale NPxY Motiv initiiert darüber hinaus über eine Signalkaskade die Endozytose des Rezeptors (Martin et al. 2008; Li et al. 2000). Auch mit dem Zytoskelett steht das Protein in Interaktion (May et al. 2002). Im Gegensatz zum LDL-R führt ein KO (genetischer Knockout) bei Mäusen zum Tode in utero (Herz et al. 1992). Erst 1998 gelang es der Arbeitsgruppe um Rohlmann et al., LRP1 gewebespezifisch auszuschalten. Mittlerweile sind BHS-spezifische KO-Mäuse verfügbar (Storck et al. 2016).

Nach der Expression von LRP1 als 600 kDa Einheit erfolgt noch im endoplasmatischen Retikulum die Bindung an das Chaperon RAP. Durch eine Konformationsänderung des Proteins gehen die Liganden-bindenden Domänen des Rezeptors keine Bindung ein, bevor LRP1 die Zellmembran erreicht. Dadurch wird die Bindung an intrazelluläre Liganden verhindert (Neels et al. 1999). Im TGN wird das Protein von der Serin-Protease Furin prozessiert. Daraus gehen zwei Moleküle hervor, die nicht-kovalent miteinander verbunden bleiben. Das kleinere Molekül wird als β -Kette bezeichnet und stellt den intrazellulären bis Membran-durchspannenden Teil des Rezeptors dar. Der Abschnitt von 85 kDa Masse enthält die NPxY Motive (Abbildung 2.4). Die β -Kette wird im Rahmen der regulierten, intramembranösen Proteolyse (RIP) zertrennt, um im Nucleus als Transkriptionsfaktor zu dienen - zum Beispiel für IFN- γ (Kinoshita et al. 2003).

Die α -Kette von 515 kDa atomarer Masse weist vier Liganden-bindende Domänen auf. Dabei unterscheiden sich die Domänen strukturell, sodass unterschiedliche Domänen bzw. Kombinationen von Domänen für die Bindung bestimmter Liganden verantwortlich sind (Moestrup et al. 1993). Die Domänen weisen zwei (Domäne I), acht (Domäne II), zehn (Domäne III) und elf (Domäne IV) CF-Regionen

Literaturdiskussion

(cysteinreiche Regionen, Vgl. Abbildung 2.4) auf. Auffällig ist dabei die funktionelle Ähnlichkeit der zweiten und vierten Domäne, weshalb häufig von einer Homologie gesprochen wird. Tatsächlich binden die meisten Liganden für LRP1 an Domäne II und IV. So auch A β (Neels et al. 1999).

Zu den Liganden des Rezeptors zählen z.B. α 2M, ApoE, gewebespezifischer Plasminogenaktivator (tPA, tissue plasminogen activator), Clotting-Faktoren, Lipasen und APP. Letzteres kann mit LRP1 sowohl intra- (via FE65) als auch extrazelluläre Bindungen eingehen (May et al. 2002) und daher die Produktion von A β durch LRP1 beeinflusst werden (Kounnas et al. 1995; Pietrzik et al. 2002; Pietrzik et al. 2004).

LRP1 ist ebenfalls der Rezeptor, der mit 50% am meisten A β aus dem Hirnparenchym in die Endothelzellen der BHS aufnimmt. Die übrigen 50% des A β teilen sich auf andere Rezeptoren und Mechanismen auf (Storck et al. 2016).

Aktuelle Forschungsergebnisse attestieren LRP1 eine Doppelrolle im Kontext des M. Alzheimer: Bei LRP1-Defizienz ist zwar die Clearance von A β eingeschränkt. Gleichzeitig ist jedoch auch der amyloidogene Stoffwechselweg der APP Prozessierung reduziert und vice versa (van Gool et al. 2019).

Durch die bereits erwähnten Enzyme ADAM10 und ADAM17 unterliegt auch LRP1 dem Shedding. Bemerkenswerterweise wird das Shedding durch erhöhte A β Level stimuliert. Das lösliche sLRP1 kann daraufhin A β binden und zur Leber transportieren (Liu et al. 2009).

3 Material

3.1 Biologika und Biochemika

3.1.1 Zellen

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Zelltyp / Ursprung	Referenz
CHO K1	Chinesische Hamster Ovarien	PUCK et al. 1958
CHO 13-5-1	Chinesische Hamster Ovarien	FitzGerald et al. 1995
CHO 13-5-1 LRP1 DOM I	Chinesische Hamster Ovarien	Rabiej et al. 2016
CHO 13-5-1 LRP1 DOM II	Chinesische Hamster Ovarien	Rabiej et al. 2016
CHO 13-5-1 LRP1 DOM III	Chinesische Hamster Ovarien	Rabiej et al. 2016
CHO 13-5-1 LRP1 DOM IV	Chinesische Hamster Ovarien	Rabiej et al. 2016
HEK-GP2-293	Humane Embryo Niere	Clontech, Mountain View, USA
HEK-293T	Humane Embryo Niere	Cannon und Strittmatter 1993

3.1.1.1 CHO-Zellen

Bei den CHO-Zellen handelt es sich um epitheliale Zellen des Ovars chinesischer Hamster (Chinese Hamster Ovar).

Aus der CHO K1 Linie wurde, durch chemische Behandlung und anschließende Selektion mit dem Pseudomonas Exotoxin, die CHO 13-5-1 Linie gewonnen. Diese weist im Vergleich zur wildtypischen K1 Linie kein funktionsfähiges LRP1 mehr auf.

Die Zelllinien D I, D II, D III und D IV wurden nach dem Vorbild von Willnow et al. 1994 in früheren Arbeiten erstellt (Herr et al. 2017; Rabiej et al. 2016).

Es wurde ein Western Blot der Zellen angefertigt und in Abbildung 3.1 dargestellt.

Material

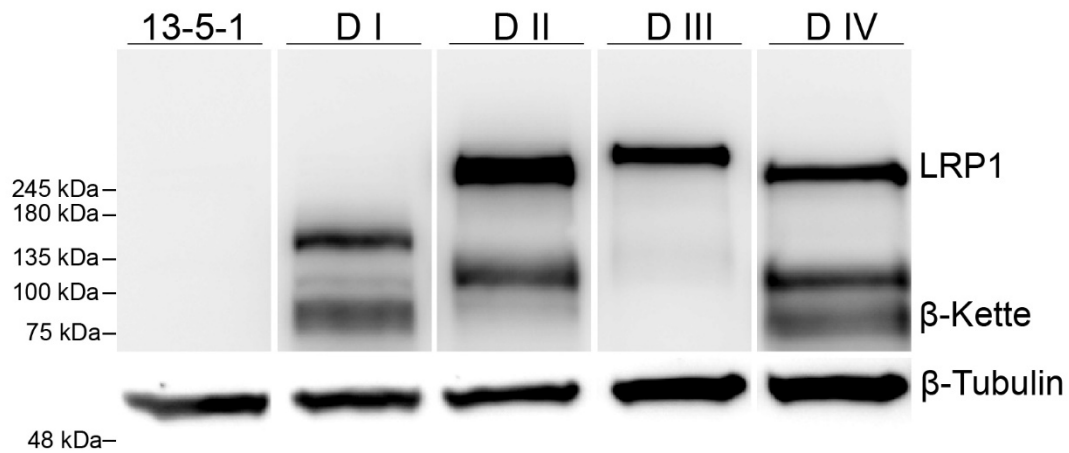


Abbildung 3.1: Darstellung der Minirezeptorvarianten von LRP1

Western Blot von CHO 13-5-1 Zellen, die kein LRP1 exprimieren, sowie den Minirezeptorvarianten Domäne I (**D I**), Domäne II (**D II**), Domäne III (**D III**) und Domäne IV (**D IV**). Der Western Blot wurde mit dem r@LRP1 (1704) (oben), sowie mit dem m@Tubulin (unten) Antikörper behandelt.

3.1.1.2 HEK-Zellen

HEK steht für Human Emryonic Kidney. HEK 293T bezeichnet dabei eine wildtypische Zelllinie.

HEK-GP2-293 ist eine Zelllinie, die aus der HEK-293T Zelllinie abgeleitet wurde. Dabei wurden die Zellen stabil mit den Genen „pol“ und „gag“ ausgestattet und sind in Kombination mit dem Vektor pLBCX zur Verpackung viraler Partikel fähig (4.1.2.2).

3.1.2 Bakterien

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Gentyp	Hersteller
DH5α	fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	NEB, Frankfurt a.M.

3.1.3 Plasmide

Tabelle 3: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Resistenz
LRP1-Full-Length	pcDNA3.1	Ampicillin/ Kanamycin
VSV-G	pcDNA3.1	Ampicillin/ Kanamycin
LRP1-Full-Length	pLBCX	Ampicillin/ Blastocidin
LRP1-DOMI-II	pLBCX	Ampicillin/ Blastocidin
LRP1-DOMIII-IV	pLBCX	Ampicillin/ Blastocidin

Material

Für alle Klonierungsarbeiten wurde der pLBCX-Vektor der Firma Clontech verwendet. Mithilfe des Plasmids konnten Viren produziert werden, die zur Transduktion entsprechender Zielzellen eingesetzt wurden. Dabei waren folgende Bestandteile des Plasmids essenziell:

- **pCMV IE**: Promotor des humanen Cytomegalovirus (CMV)
- **Ψ**: Verpackungssignal viraler Partikel
- **AMP^r**: Resistenzgen zur Bakterienkolonien-Selektion (4.3.1)
- **Blasti^r**: Resistenzgen zur Selektion der mit dem Virus infizierten Zellen
- **MCS**: Multiple Cloning Site

Weitere, zur Überexpression eingesetzte Plasmide, können Tabelle 3 entnommen werden.

3.1.4 Marker

Für die SDS-PAGE (4.4.3) wurden der Prism Ultra Prestained Protein Ladder sowie der PageRuler Prestained Protein Ladder verwendet. Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde der 1kb DNA Ladder verwendet.

Tabelle 4: Verwendete Marker

Name	Beschreibung	Hersteller
1 kb DNA ladder	0,5 – 10 kB	NEB, Frankfurt a.M.
PageRuler Prestained Protein Ladder	10-180 kDa	ThermoFisher, Waltham, USA
Prism Ultra Prestained Protein Ladder	11-245 kDa	Abcam, Cambridge, UK

3.1.5 Proteine

Tabelle 5: Verwendete Proteine und Peptide

Name	Beschreibung	Hersteller	Referenz
¹²⁵ I-Aβ	Amyloid-beta Protein (1-42) (Human) – Iod-125 markiert	Phoenix Pharmaceuticals, INC.	Storck et al. 2016
Aη-α (GST)	Amyloid-eta Peptid mit GST Tag	Labor C.Pietrzik, Mainz	-
Aη-α	Amyloid-eta Peptid	Labor C.Haass, München	Willem et al. 2015

Material

3.1.6 Enzyme

Tabelle 6: Verwendete Enzyme

Name	Funktion	Puffer	Temperatur	Hersteller
Q5 Polymerase	Polymerase für PCR	Q5 Reaction Buffer	98°C	NEB, Frankfurt a.M.
Phusion HF Polymerase	Polymerase für PCR	Phusion HF bzw. GC Buffer	98°C	NEB, Frankfurt a.M.
T4 Ligase	Ligation	T4 Puffer	RT	NEB, Frankfurt a.M.
Trypsin	Biochemisches Detachment	EDTA	RT	GIBCO/BRL, Eggenstein

Tabelle 7: Verwendete Restriktionsenzyme

Name	Schnittstelle (5' → 3')	Puffer	Temperatur	Hersteller
<i>Bam</i> HI HF	GGATCC (sticky end)	NEB CutSmart®	37°C	NEB, Frankfurt a.M.
<i>Eco</i> RI-HF	GAATTC (sticky end)	NEB CutSmart®	37°C	NEB, Frankfurt a.M.
<i>Eco</i> RV-HF	GATATC (blunt end)	NEB CutSmart®	37°C	NEB, Frankfurt a.M.
<i>Xho</i> I	CTCGAG (sticky end)	NEB CutSmart®	37°C	NEB, Frankfurt a.M.
<i>Not</i> I	GCGGCCGC (sticky end)	NEB CutSmart®	37°C	NEB, Frankfurt a.M.
<i>Asc</i> I	GGCGGCC (sticky end)	NEB CutSmart®	37°C	NEB, Frankfurt a.M.

3.1.7 Antikörper

Neue Antikörper Stocks wurden nach Ankunft aliquotiert und bei -20°C konserviert. Sofern vom Hersteller nicht anders empfohlen, wurden monoklonale Primärantikörper mit 10 ml TBS-T (Tris-buffered saline + Tween20, Tabelle 16), polyklonale Primärantikörper mit 10 ml TBS-T + 5% Magermilchpulver, in einem 15 ml Reaktionsgefäß angesetzt.

Verdünt wurde zunächst nach Herstellerangaben. Waren die Signale zu stark bzw. zu schwach, wurde davon abgewichen. Den Primärantikörper-Lösungen wurde jeweils zu 0,02% NaN₃ zugesetzt. Das Azid-Ion wird als Konservierungsmittel eingesetzt und verhindert mikrobiellen Befall. Das aktive Zentrum der Cytochrom C Oxidase wird blockiert und dadurch der Elektronentransport der Atmungskette behindert. Der Effekt entspricht einer Vergiftung mit Cyanid und ist für aerob energiegewinnende

Material

Organismen, also auch für Menschen, ein universelles Gift. Daher wurde sehr vorsichtig mit NaN_3 gearbeitet.

Tabelle 8: Zur Detektion auf Western Blots verwendete Primärantikörper

Name	Antigen	Spezies	Verdünnung	Hersteller/ Referenz
r@Aktin	B-Aktin	Kaninchen	1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
m@B411E2	LRP1 Domänen II und IV	Maus	1:10.000	Labor C.Pietrzik
r@LRP1 (1704)	LRP1 C-Terminus (β -Kette)	Kaninchen	1:10.000	Labor C.Pietrzik
m@Tubulin	Tubulin	Maus	1:1000	Merck, Darmstadt
m@9E10	c-myc	Maus	1:5000	Labor C.Pietrzik
m@flag	DYKDDDDK	Maus	1:1000	ThermoFisher, Waltham, USA
m@GST	Glutathion-S-Transferase (GST)	Maus	1:1000	ThermoFisher, Waltham, USA
rat@2E9	A η - α	Ratte	1:1000	Willem et al. 2015

Sekundärantikörper wurden in der Lösung angesetzt, die auch zum Blockieren der Nitrozellulosemembran verwendet wurde.

Tabelle 9: Zur Detektion auf Western Blots verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	1:5000	Jackson Lab
Anti-Ratte-IgG	Ziege	1:5000	Jackson Lab
Anti-Maus-IgG	Esel	1:5000	Jackson Lab

3.1.8 Primer

Tabelle 10: Zur PCR und Sequenzierung verwendete forward Primer

Name	Schnittstelle	Sequenz (5' \rightarrow 3')
LRP1 lead	XhoI	CCGCTCGAGCGGATGCTGACCCCGCCGTTGCT
LRP1 DII	Ascl	GGCGCGCCAGTTGGCACCAACAAATGCCG
LRP1 β	Ascl	GGCGCGCCAACCTCTGAGTACCAGGTCCTGTA
pLBCX	-	CGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTAT
M13	-	TGTA AACGACGGCCAGT

Material

Tabelle 11: Zur PCR und Sequenzierung verwendete reverse Primer

Name	Schnittstelle	Sequenz (5' → 3')
LRP1 lead	Ascl	GGCGCGCCAGGGGCGTCGATAG
DIII	Ascl	GGCGCGCCCAGCCTTGACGCTGTGGGGGT
LRP1 β	NotI	GCCGAGGCGGCCGCCTATGCCAAGGGGTCCCCTA
pLPCX	-	ACCTACAGGTGGGGTCTTTCATTCCC

3.1.9 Antibiotika

Tabelle 12: Verwendete Antibiotika

Name	Hersteller
Ampicillin	Merck, Darmstadt
Blasticidin	Invivogen, San Diego, USA
Gentamycin	GIBCO/BRL, Eggenstein
Kanamycin	GIBCO/BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin (P / S)	GIBCO/BRL, Eggenstein
Plasmocin	Invivogen, San Diego, USA

3.2 Chemikalien

Tabelle 13: Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller
Acrylamid 40% (29:1) / Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	GIBCO/BRL, Eggenstein
APS	Sigma, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
BSA	Pierce, Rockford, USA
CaCl ₂	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blau	Merck, Darmstadt
dNTPs	New England Biolabs
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FCS	GIBCO/BRL, Eggenstein
6x Gel Loading Dye, Blau	New England Biolabs
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
NP40	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KCL	Merck, Darmstadt
Lipofectamin2000	Invitrogen, Carlsbad, USA
Magermilchpulver	Ralphs, Compton, USA
MgCl ₂	GIBCO/BRL, Eggenstein
Methanol	Roth, Karlsruhe
NaN ₃	Merck, Darmstadt
NaCl	B.Braun, Meisungen

Material

NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Merck, Darmstadt
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Poly-L-Ornithin	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Q5 High GC Enhancer	New England Biolabs
Q5 Polymerase Puffer	New England Biolabs
SDS	BioRad, München
SuperSignal Substrat für HRP	Pierce, Rockford, USA
TEMED	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Tris-Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

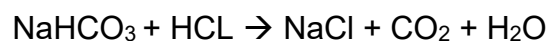
3.2.1 Kulturmedien

Die verwendeten Zellkulturmedien wurden vom Hersteller steril filtriert und auf Endotoxine getestet. Im Labor wurden sie bei 4°C gelagert.

Tabelle 14: Verwendete Kulturmedien

Zellkulturmedium	Verwendet für	Hersteller
α-MEM (α-Minimum Essential Medium Eagle)	CHO-Zellen	Gibco/BRL
HAM'S F-10	CHO-Zellen	Gibco/BRL
HAM'S F-12	CHO-Zellen	Gibco/BRL
DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium Eagle)	HEK-Zellen	Gibco/BRL
Opti-MEM	Transfektionen	Gibco/BRL
LB-Medium	Bakterienkultur	Merck

Die Medien verwenden das NaHCO₃-Puffersystem:



Daraus ergibt sich die Anforderung an Inkubatoren, CO₂ abgeben zu können. Andernfalls konnte durch Zugabe des HEPES-Puffers ein CO₂-freier Inkubator genutzt werden. Den Medien war außerdem Phenolrot zugesetzt. Dadurch wurden gravierendere pH-Abweichungen makroskopisch sichtbar. Komplettmedien enthielten immer 10% FBS aktiv und 1% Penicillin / Streptomycin.

Der Ansatz der Medien erfolgte unter der sterilen Werkbank.

Material

DMEM Komplettmedium

500 ml DMEM

50 ml FBS aktiv

5 ml Penicillin (10.000 U/ml), Streptomycin (10.000 µg/µl)

5 ml Natriumpyruvat 100 mM

Alpha-MEM Komplettmedium

500 ml α-MEM

50 ml FBS aktiv

5 ml Penicillin (10.000 U/ml), Streptomycin (10.000 µg/µl)

HAM'S F10 Komplettmedium

500 ml F10

50 ml FBS aktiv

5 ml Penicillin (10.000 U/ml), Streptomycin (10.000 µg/µl)

HAM'S F12 Komplettmedium

500 ml F12

50 ml FBS aktiv

5 ml Penicillin (10.000 U/ml), Streptomycin (10.000 µg/µl)

Medium für Transfektionen

500 ml Opti-MEM

3.3 Kits

Tabelle 15: Verwendete Kits

Name	Hersteller
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche
Xtra Midi EF	NucleoBond

Material

3.3.1 Pufferlösungen und Lösungsmittel

Tabelle 16: Verwendete Pufferlösungen und Lösungsmittel

Name	Zusammensetzung
Blotting Puffer	In ddH_2O 192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 20% v/v Methanol
CutSmart Buffer	NEB, Frankfurt a.M.
NP40 Lyse-Puffer	50 mM Tris-Base pH 8.0 150 mM NaCl 0.02% w/v NaN_3 1% NP40
PBS	In ddH_2O 13.7 mM NaCl 0,27 mM KCL 1.0 mM NaH_2PO_4 0.18 mM KH_2PO_4
Ponceau-S	In ddH_2O 5% Essigsäure 0.1% v/v Ponceau S
RIPA Lyse-Puffer	50mM Tris 1% v/v NP40 0,5% w/v Na-Deoxycholat 0,1% w/v SDS 1mM Natriumorthovanadat 1x Protease Inhibitor 1x Phosphatase Inhibitor
4x Sammelgel-Puffer pH 6.8	In ddH_2O 0.6 M Tris-HCL 0.4% w/v SDS
4x Trenngel-Puffer pH 8.8	In ddH_2O 1,5 M Tris-HCL 0,4 % w/v SDS
TBS pH 7,4	In ddH_2O 1,37 M NaCl 27 nM KCL 0,25 M Tris-Base
TBS-T pH 7,4	1x TBS 0,05 % v/v Tween20
10x TAE-Puffer	In ddH_2O 0,4 M Tris 0,01 M EDTA 1% v/v Essigsäure

3.4 Laborgeräte

Tabelle 17: Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Name	Hersteller
Agarose Gel Elektrophorese System	Biorad, München
Agarose Gel Imager	INTAS, Göttingen
CO ₂ -Inkubator	ThermoFisher, Waltham, USA
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Flachbettschüttler	Infors, Boltmingen, Schweiz
Wallac Wizard 2 2470 automatic gamma-counter	PerkinElmer, Waltham, USA
-80°C Gefrierschrank	Liebherr, Biberach an der Riß
-20°C Gefrierschrank	Liebherr, Biberach an der Riß
4°C Kühlschranks	Liebherr, Biberach an der Riß
Heizrüttler	Eppendorf, Hamburg
LAS3000	Fujifilm, Japan
Lichtmikroskop	Zeiss, Göttingen
Magnetrührer RCT	IKA, Staufen
Mikrotiterplatten Photometer	Anthos, Friesoythe
Mini Protean III, Elektrophorese System	Biorad, München
Mini Protean III, Western Blotting System	Biorad, München
NanoDrop One C	ThermoScientific, Waltham, USA
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
pH-Meter	Inolab, Weilheim
Pipetten 1µl-1ml	Gilson
Pipettierhilfe Accu-Jet	VWR, Darmstadt
Protan Nitrocellulose Membranen	Schleicher&Schuell, Dassel
Thermocycler Tpersonal	Biometra, Göttingen
Sterile Hood SterilGrad	Nunc, Wiesbaden
Vortex-Genie 2	Bender&Hobein AG, Zürich
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad GFL 1086	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Hettrich Universal 32	Hettrich, Tuttlingen
Zentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Hereaus Fresco	Kendro, Langenselbold
Zentrifuge Sorvall RC5B	Kendro, Langenselbold
Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckman Coulter, Brea, USA

Material

3.5 Verbrauchsmaterial

Tabelle 18: Verwendetes Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller
Aluminiumfolie	Aro, Metro
Cellophanfolie	BioRad, München
Einweghandschuhe semperguard	Semperit, Wien
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Eppendorf-Reaktionsgefäße 2 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Frischhaltefolie	Aro, Metro
Glaspipetten 1 ml - 20 ml	VWR, Darmstadt
Gewebekulturschalen (Ø 3 cm, 6 cm, 10 cm)	TPP, Trasadingen Schweiz
Mikrotest Platten 96-well	Sarstedt, Nümbrecht
Multiwell Platten 6-, 12-, 24-, 48-Well	Sarstedt, Numbrecht
Nitrocellulose-Transfermembran	Hartenstein, Würzburg
Parafilm® American National Can™	Neeah, USA
Petrischalen ø 6 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen ø 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen ø 15 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 µl-1000 µl	Starlab, Ahrensburg
Kryoröhrchen	Apogent, Wiesbaden
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter, Minisart, 0,2 mm Nitrocellulose	Sartorius, Göttingen
sterile Plastikröhrchen 15 ml	Greiner, Nürtingen
sterile Plastikröhrchen 50 ml	Sarstedt, Braunschweig
Zellschaber	TPP, Trasadingen Schweiz
Zentrifugenröhrchen	TPP, Trasadingen Schweiz

3.6 Software

Tabelle 19: Verwendete Software

Name	Hersteller
ADAP	Anthos
Citavi 6	Swiss Academic Software
Excel 2016	Microsoft
Finch TV v.1.14	Digital World Biology
Illustrator CC 2019	Adobe
ImageJ	Open Source by Wayne Rasband
Labfolder	Labfolder
LAS-3000	FujiFilm
Power Point 2016	Microsoft
Prism 4	GraphPad
SnapGene® Viewer 3.2.1	GSL Biotec LLC
Word 2016	Microsoft
Gamma Counter Wizard ²	PerkinElmer

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Zellkultur eukaryotischer Zellen

Es wurden immortalisierte, adhärenente, eukaryontische Zellen kultiviert, die aus verschiedenen Tieren stammten (s. 3.1.1.). Die Kultivierung fand standardmäßig in 10 cm Petrischalen statt.

Die Schalen wurden in einem Inkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ gehalten. Die Zeiten außerhalb des Inkubators wurden so gering wie nötig gehalten. Die Schalen wurden grundsätzlich nur mit neuen Handschuhen berührt und die Deckel nur unter der sterilen Werkbank abgenommen. Die Medien der Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf Kontamination durch Mykoplasmen untersucht.

Die sterile Werkbank, sowie alle verwendeten Materialien bzw. Werkzeuge, die nicht steril verpackt waren, wurden vor und nach dem Arbeiten mit einer 70% Ethanol Lösung desinfiziert. Es wurden gestopfte Pipettenspitzen bzw. Glaspipetten verwendet. Diese und weitere Verbrauchsmaterialien wurden vor Gebrauch autoklaviert.

CHO K1-, CHO 13-5-1- und alle daraus abgeleiteten Zelllinien wurden unter gleichen Bedingungen in Kultur gehalten. Zur Kultur der CHO-Zelllinien wurde α -MEM, alternativ HAMS F-12 verwendet. HEK- und -Zelllinien wuchsen in DMEM (s. 3.2.1). Die Medien und Supplemente wurden vor der Behandlung der Zellen in ein 37°C Wasserbad gegeben.

MEF- und HEK-Zellen wurden in Schalen gehalten, die zuvor mit Poly-D-Lysin bzw. Poly-Ornithin inkubiert, resp. gecoatet wurden.

4.1.1.1 Medienwechsel

Je nach Konfluenz der Zellen wurde das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt, sofern nicht passagiert wurde.

Dazu wurden 3 ml PBS (phosphate-buffered saline, Tabelle 16) zu den Zellen gegeben. Bei den CHO-Zellen wurden die Schalen mehrfach geschwenkt, bei allen anderen wurden die Schalen nur vorsichtig geneigt.

Das PBS wurde sorgfältig abgesaugt und 10 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben.

Methoden

4.1.1.2 Zellpassage adhärenter Zellen

Die verschiedenen Zelllinien wuchsen unterschiedlich schnell: So teilten sich CHO K1 Zellen weniger häufig als CHO 13-5-1-Zellen.

Die Zellen wurden mit 3 ml PBS gewaschen. Nach dem Absaugen wurden die Zellen für ca. 5 min. bei 37°C mit 1 ml einer einfach konzentrierten Trypsin- / EDTA-Lösung inkubiert.

Nach Zugabe von 9 ml kompletten Mediums wurde die Lösung mehrfach auf- und abpipettiert. Es wurden 0,5 - 1 ml der Zellsuspension in eine frische Petrischale gegeben und mit Nährmedium auf 10 ml aufgefüllt.

4.1.1.3 Zählen und Aussaat von Zellen

Gezählt wurde mit der Neubauer Zählkammer. Die Zellen wurden wie in 4.1.1.2 passagiert. 20 µl Zellsuspension und 180 µl Trypanblau wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Nachdem die Zellzählplatte mit einem Deckglas versehen wurde, konnte ein Teil der 200 µl Lösung an den unteren Rand des Abdeckgläschens pipettiert werden. Im Bereich der 4 großen Quadrate wurde mithilfe eines Klickers unter dem Mikroskop gezählt.

Mit folgender Rechnung wurde die Zellzahl bestimmt:

$$\frac{x}{4} * 100 = \text{Zellen}/\mu\text{l}$$

Anhand der Konzentrationen pro Mikroliter wurde die gewünschte Zellzahl ausgesät.

Es wurde entweder in 6-, 12-, oder 48- Well-Platten ausgesät.

Die Anzahl der auszusäenden Zellen variierte je nach Zelllinie etwas, generell wurde jedoch nach der Fläche der Wells berechnet und ausgesät.

Die Well-Platten wurden zur Aussaat auf ein mit Ethanol durchtränktes Papier gestellt. Dadurch wurde die eventuelle Eigenladung des Plastiks der Schalen neutralisiert und die Zellen setzten sich gleichmäßiger ab.

4.1.1.4 Kryokonservierung

Um Zellen für einen unbestimmten Zeitraum zu konservieren, wurden diese in flüssigen Stickstoff gegeben. Die Zellen wurden wie in 4.1.1.2 beschrieben vereinzelt und anschließend für 4 min. bei 180 x g pelletiert. Das überstehende Medium wurde abgesaugt, ohne das Pellet zu beschädigen. Das Pellet wurde in 2 ml frisch

Methoden

angesetztem Kompletmedium, das 10% DMSO enthielt, gelöst. Je 1 ml Zellsuspension wurden in ein beschriftetes Kryoröhrchen gegeben. Die Gefäße wurden in eine Box gegeben, die raumtemperiertes Isopropanol enthielt. Diese wurde bei -80°C inkubiert. Nach 5 Tagen wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank überführt.

Um die Zellen erneut zu kultivieren, wurden sie im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und 9 ml warmes Kompletmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden für 4 min. bei 180 x g pelletiert und das Medium abgesaugt. In 10 ml neuem Kompletmedium wurde das Pellet resuspendiert und die Zellsuspension ausplattiert.

4.1.2 Transfektion

Unter der Transfektion versteht man das Einbringen fremder DNA in eukaryontische Zellen. Die Zellen sind so gezwungen, die eingebrachte DNA zu transkribieren. Proteine werden dadurch über-exprimiert. Somit können Zellen als Modellsysteme genutzt werden, proteinabhängige Vorgänge zu untersuchen.

Die Gene wurden zuvor in Vektoren integriert, siehe 4.2.2.

4.1.2.1 Transiente Transfektion

Bei transienten Transfektionen wird Plasmid-DNA in Zellen eingebracht. Diese wird ca. 24 h nach einbringen der DNA für einen Zeitraum von ca. 48 h abgelesen und die entsprechenden Proteine in dieser Zeit über-exprimiert.

Die Expressionsmaxima unterscheiden sich je nach Zelltyp, Transfektions-Reagenz und Vektor. Für jedes Vorhaben müssen die Optima neu ermittelt werden.

Die Zielzellen wurden ausgesät, sodass am Tag der Transfektion eine Konfluenz zwischen 50% und 70% vorlag.

Die Zellen erhielten nach vorsichtigem Waschen mit 3 ml PBS ein serum- sowie P / S-freies Medium. Das Transfektionsmedium verblieb für 4-6 h auf den Zellen.

Als Transfektionsreagenzien wurden Polyethylenimin (PEI) und das lipidbasierte Reagenz Lipofectamine 2000 verwendet.

4.1.2.1.1 Transfektion via PEI

PEI Transfektionen sind weniger zelltoxisch und zeigen bei einfachen Transfektionen von siRNA sowie Plasmid DNA eine hohe Effizienz. PEI dient als Fällungsmittel der DNA. Es setzt sich um die DNA und maskiert die negative Eigenladung. Der nun nach

Methoden

außen positiv geladene DNA-PEI Komplex lagert sich an die anionische Zellmembran und kann endozytiert werden. Es handelt sich darüber hinaus um eine kostengünstige Variante.

Es wurden für 10 cm Schalen folgende Ansätze erstellt:

Ansatz A

300 µl Opti-MEM – Volumen der Plasmid DNS

10 µg Plasmid-DNA

Ansatz B

260 µl NaCl 0,9%

40 µl Polyethylenimin 1 µg/µl

Die beiden Ansätze wurden für 10 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden beide Ansätze zusammengegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Es folgte ein kurzes abzentrifugieren mit der Tischzentrifuge. Der Ansatz wurde erneut für 15 Minuten bei RT inkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben.

4.1.2.1.2 Transfektion via Lipofectamine 2000

Die kationischen Lipide in Lipofectamine 2000 bilden zusammen mit der negativ geladenen DNA einen liposomalen Komplex, der gut endozytiert werden kann.

Bei der Verwendung von Lipofectamine 2000 wurden für 10 cm Schalen folgende Ansätze erstellt:

Ansatz A

500 µl Opti-MEM – Volumen der Plasmid DNS

8 µg Plasmid-DNA

Ansatz B

480 µl Opti-MEM

20 µl Lipofectamine 2000

Die beiden Ansätze wurden für 5 min. bei RT inkubiert, gemischt und für weitere 20 min. bei RT inkubiert, bevor das Gemisch auf die Zellen gegeben wurde.

4.1.2.2 Stabile Transfektion

Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurden Retroviren erstellt. HEK GP2-293 Zellen wurden dafür als virusproduzierendes System verwendet. Mit den viralen Partikeln wurden die Zielzellen, CHO 13-5-1, schließlich transduziert. Dazu wurden die HEK-Zellen am Vortag in eine 10 cm Schale ausgesät, sodass am Folgetag eine Konfluenz von 50-70% vorlag. Mittels PEI (s. 4.1.2.1.1) wurden die Zellen transient transfiziert.

Methoden

Zeitgleich mit der Plasmid-DNA wurde das VSV-G Gen zur Pseudotypisierung eingebracht.

Ansatz A wurde jeweils für pcDNA3.1+VSV-G und die DNA im pLBCX-Vektor angesetzt. Ansatz B wurde unverändert zwei Mal angesetzt.

Alle folgenden Schritte wurden unter S2-Sicherheitsbedingungen ausgeführt.

Das umfasst neben dem Tragen von Kittel, Handschuhen, Schutzbrille und Unterarmüberziehern das korrekte Entsorgen des Abfalls, sowie das Desinfizieren des verwendeten Materials und der Arbeitsflächen.

Das Transfektionsmedium wurde für 24 h belassen, die Zellen wurden anschließend mit 3 ml PBS gewaschen. 10 ml komplettes Wachstumsmedium (DMEM +FCS +P/S) wurden hinzugegeben.

Am folgenden Tag wurde das Medium abgesaugt, mit 3 ml PBS gewaschen und 5 ml neues Medium hinzugegeben. Dieses Medium wurde nun für 36 h mit viralen Partikeln angereichert. Nach Ablauf der Zeit wurden die 5 ml vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 4 min. bei 1200 x g und eine Filtrierung der Lösung.

Das Medium wurde sofort auf sterile 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei -80°C eingefroren. Zum Auftauen wurde ein Gefäß entnommen und in das 37°C warme Wasserbad gestellt.

Parallel wurden die Zielzellen, CHO 13-5-1, in eine 6 cm Schale ausgesät, sodass am Folgetag eine Konfluenz von 50-70% entstand.

Die Zellen wurden 2 Stunden vor der Transfektion mit einer 25 µM Chloroquin-Lösung behandelt. Zelluläre DNAsen wurden so ihres pH-Optimums beraubt. Sofern der Virustiter nicht zuvor bestimmt wurde, wurden die Zielzellen mit 2 ml der Viruslösung und 1 ml Wachstumsmedium ohne Antibiotika für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurden 6 µg/µl Polybrene hinzugegeben. Diese Konzentration wurde zuvor durch eine Killing Curve bestimmt.

Methoden

4.1.2.2.1 Killing Curve und Selektion

Eine Killing Curve wurde für jedes Selektionsvorhaben neu erstellt.

In dieser wird den Zielzellen, mit Ausnahme einer Negativkontrolle, in verschiedenen Konzentrationen das entsprechende Antibiotikum zugefügt.

Das Medium wird so lange erneuert, bis keine Zellen mehr sterben.

Die richtige Konzentration zur Selektion ist jene, welche über den Zeitraum von ca. 14 Tagen zum Tod aller Zellen führte. Dies wird mit der Negativkontrolle verglichen.

Eine Killing Curve sollte für jede Charge des Antibiotikums neu erstellt werden.

Die Selektionsphase begann nach Transduktion der Zellen. Für die CHO 13-5-1 Zellen ergab sich eine Konzentration von 7 µg/ml Blastocidin. Die Selektion wurde in der 6 cm Schale gestartet. Waren die Zellen bereits zu dicht gewachsen, wurden diese zunächst in eine größere Schale passagiert. Nach Abschluss der Selektion wurde ein Teil der Zellen kryokonserviert. Um eine Kultur von homogen über-exprimierenden Zellen zu erhalten, wurden die Zellen der erstellten Mischkolonien wie in 4.1.1.3 gezählt und jeweils eine halbe Zelle pro Schale in einer 48-Well Platte ausgesät. Dies wurde nach 3-7 Tagen in Form von Kolonien sichtbar. Wenn sich exakt eine Zellkolonie von überführbarer Größe gebildet hatte, wurde diese Platte trypsiniert und die Zellen in zwei 6 cm Schalen überführt. Eine Platte wurde kryokonserviert, die andere zur Kontrolle via SDS-PAGE und Immun-Western Blot pelletiert. Nach Vergleich im Western Blot wurden die geeigneten Klone ausgewählt, wieder aufgetaut und konnten für Versuche verwendet werden.

4.1.2.2.2 Virustiter Bestimmung

Der Virustiter ist das Maß für die Potenz eines Virus. Er beschreibt die minimal benötigte Menge eines gelösten Partikels in einem Volumen, die gerade noch funktionsfähig ist. Titer sind nur innerhalb des gleichen Tests miteinander vergleichbar, da selbst die Einheiten je nach Testprinzip variieren. In der Medizin bleibt der Titer daher oft dimensionslos.

Mit Hilfe des Virustiters kann vor einer Transduktion in etwa geplant werden, wieviel Viruslösung nötig ist, um jede einzelne Zielzelle zu transduzieren.

Zunächst wurden die Zielzellen der CHO 13-5-1 -Linie gezählt und 7000 Zellen in 9,45 ml Alpha-MEM gelöst. Die Zelllösung wurde zu 1,35 ml in 6-Well-Platten gegeben, sodass 1000 Zellen pro Well ausgesät wurden. Die folgenden Schritte wurden wie 4.1.2.2 unter S2-Bedingungen durchgeführt.

Methoden

War das Virus kryokonserviert, wurde es für 10 min. in das 37° C warme Wasserbad gestellt. Entsprechend Tabelle 20 wurde die Lösung unter S2-Bedingungen zu den Zellen gegeben.

Tabelle 20: Verdünnungsschema zur Bestimmung der Virustiter

Verdünnung	aus vorherigem [µl]	Medium [µl]	Virus [µl]	Zellsuspension [ml]	Finale Verdünnung
Negativkontrolle	-	900	150	1,35	-
1:10	100	900	150	1,35	1:100
1:100	100	900	150	1,35	1:1.000
1:1.000	100	900	150	1,35	1:10.000
1:10.000	100	900	150	1,35	1:100.000
1:100.000	100	900	150	1,35	1:1.000.000

Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 24h, bevor die Antibiotikaselektion begann. Diese wurde für 14 Tage, bis zum Sterben der letzten Zellen der Negativkontrolle, durchgeführt. Die Konzentration richtete sich nach der vorher angelegten Killing Curve. Nach der Antibiotikaselektion erfolgte ein Waschschriff mit 3 ml PBS. Anschließend wurden die Zellen mit je 1 ml Kristall Violett 0,1 % durch 0,22 µm Filter für 10 min. bei RT inkubiert. Danach wurde drei Mal sehr vorsichtig mit PBS gewaschen.

Alle Wells mit Koloniewachstum wurden zur Zählung verwendet.

Es wurden Fotos der 6-Well-Platten gemacht und diese mit Hilfe der Software ImageJ analysiert.

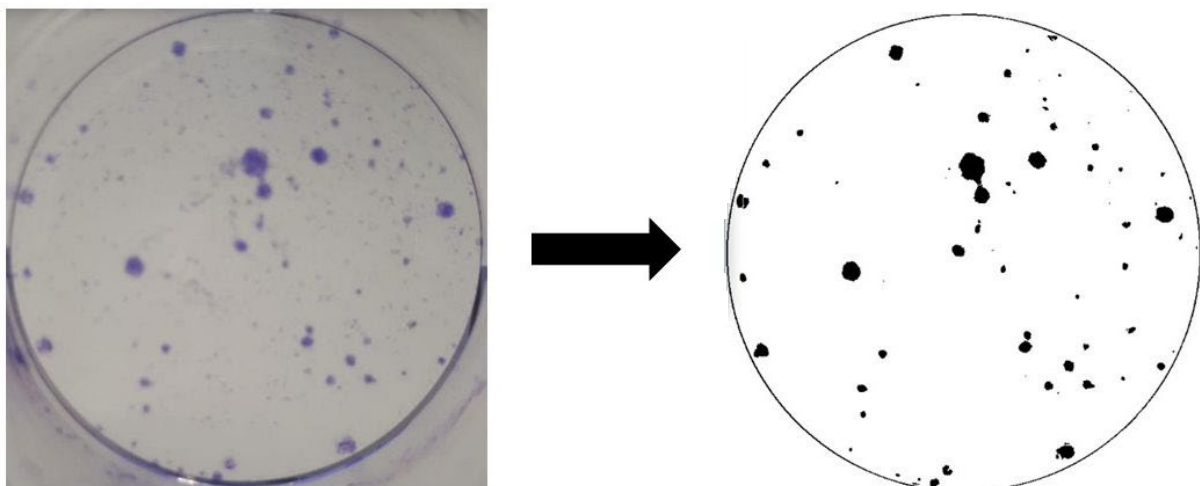


Abbildung 4.1: Die Auswertung des Titer Assays erfolgte via ImageJ

Links: Verwendetes Foto einer 6-Well Platte eines Virus Titer Assays. Lilafarbene Einfärbung der Zellkolonien durch die Behandlung mit Kristall Violett 0,1%. Rechts: Binäre Darstellung in ImageJ. Es wurden nur Kolonien einer festgelegten Größe in die Auswertung mit einbezogen. Die Zählung erfolgte semiautomatisch.

Methoden

Die Titer-Bestimmung dauerte über 2 Wochen, daher wurde bereits parallel die Transduktion wie in 4.1.2.2 durchgeführt.

Mit folgender Formel wurden die Titer bestimmt:

$$\frac{\text{Kolonien}}{\text{Volumen}} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{CFU}}{\text{ml}}$$

4.1.2.3 Endozytose Experimente

LRP1 kann, nach Bindung von Liganden, deren Endozytose vermitteln. Dabei gelangen sowohl Ligand als auch Rezeptor in das Innere der Zelle und durchlaufen, abhängig von Rezeptor-Typ und Ligand, höchst unterschiedliche Wege.

Ziel dieser Arbeit war es, die Endozytose-Eigenschaften von LRP1 zu studieren. Dazu wurden verschiedene Experimente durchgeführt.

4.1.2.3.1 In Vitro Endozytose

Um die Endozytose-Eigenschaften von Zellen quantitativ zu bestimmen, wurden verschiedene Zelllinien miteinander verglichen.

Die zu untersuchenden Zellen wurden jeweils zwei Mal, also im Doppelansatz ausgesät, sodass am Folgetag eine Konfluenz von ca. 90% herrschte. Die Zellen wurden zunächst fünf Mal mit 37°C warmem PBS gewaschen und für 1 h mit einem serumfreien Hungermedium inkubiert. Durch diese Hungersituation erhöht sich generell die Dichte an Rezeptoren an der Extrazellulär-Membran. Nach dem Aushungern der Zellen wurde den Zellen erneut serumfreies Medium zugegeben. Dieses wurde frisch vor jedem Endozytose-Experiment angesetzt und enthielt nur das Peptid, dessen Aufnahme beobachtet werden sollte.

Die Aufnahmezeit lag zwischen 1 h und 6 h. Nach Ablauf der Zeit wurde der Überstand eines Wells in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen und das Experiment auf Eis gestoppt. Die Zellen wurden entsprechend 4.4 weiterverarbeitet und analysiert.

4.1.2.3.2 Endozytose von A β -I¹²⁵

Um bereits physiologische Konzentrationen und kleinste Unterschiede messbar zu machen, wurden radiomarkierte Moleküle verwendet .

So wurden mit I¹²⁵ assoziierte Moleküle verwendet. Durch die Messung der Gamma-Strahlung konnten Rückschlüsse auf die Menge des aufgenommenen Peptids getroffen werden. Die Vorgehensweise wurde bereits zuvor von Storck et al. 2016 bzw.

Methoden

Pflanzner et al. 2011 beschrieben. Die Halbwertszeit von I^{125} wurde mit der vom Hersteller angegebenen Konzentration für $A\beta$ - I^{125} an einem bestimmten Tag verrechnet, sodass die aktuelle Konzentration kalkuliert werden konnte. Die Zellen wurden gezählt und gleichartig in 24-Well-Platten ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen fünf Mal mit PBS gewaschen und für 1h in Hungermedium, das lediglich 0,002% BSA enthielt, kultiviert. Durch die BSA Zugabe wurde unspezifische Bindung reduziert.

Die folgenden Schritte wurden im Isotopenlabor durchgeführt.

Dem serumfreien Medium für den Aufnahme-Versuch wurde neben dem radiomarkierten Protein und 0,002 % BSA auch HEPES zugesetzt, da der Inkubator im Radioaktivlabor keine CO_2 -Versorgung bot.

Das Medium wurde für 1h bei $37^\circ C$ auf den Zellen belassen. Nach Abschluss der Aufnahme wurde der Überstand eines Wells aufgefangen und später mit den anderen Proben als Input gemessen. Die Wells wurden auf Eis gestellt, um weitere Aufnahme und Rezeptorrecycling zu stoppen. Es folgten fünf Waschungen mit kaltem PBS. Anschließend wurde zwei Mal für 5 min. mit je 800 μl saurem PBS (pH2) gewaschen und die Volumina aufgefangen. Diese wurden direkt zur Messung in den Gamma Counter Wizard² gegeben. Mit diesem Schritt wurden quantitativ die Proteine bestimmt, die an der Zelloberfläche am Rezeptor gebunden waren (Vgl. 2.9).

Auf die Wells wurden nun je 400 μl einer 0,2 M NaOH- Lösung gegeben. Diese wurde für 10 min. auf den Wells belassen. Anschließend wurde die Lösung auf- und abpipettiert und in beschrifteten 2 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen. Dazu gegeben wurden 400 μl PBS pH 7,4, mit denen die Wells noch einmal gespült wurden.

Es wurden 800 μl einer 100% TCA Lösung zu dem Lysat gegeben, um die Proteine zu fällen. Die Reaktionsgefäße wurden fünf Mal invertiert und für 3 min. auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 12.000 x g für 10 min. wurde der Überstand abgesaugt und die Pellets im Gamma Counter Wizard² gemessen. Gemessen wurde jede Probe drei Mal für 60 s. Ausgewertet wurden die Zerfälle pro Minute (CPM, counts per minute). Verwendet wurde ausschließlich $A\beta$ - I^{125} der Firma Phoenix

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA nach ihrer Länge, wobei die negativ geladene DNA zur positiven Anode wanderte.

Beim Gießen eines Gels wurde ein Kamm installiert, welcher nach Erhärtung des Gels Taschen zum Auftragen der Proben hinterließ. Den Gelen wurde 0,5 µg/ml EtBr beigemischt. EtBr interkaliert mit der DNA. Die Einstrahlung von UV-Licht führte so zur Fluoreszenz. Die Lichtintensität ist dabei direkt proportional zur Konzentration der DNA. Zum Gießen der Gele wurde 1x TAE (Tris-Acetat-EDTA, Tabelle 16) -Puffer verwendet. Für ein kleines Gel 50 ml, für ein großes Gel 150 ml. Es wurde eine Agarosekonzentration gewählt, bei der die zu untersuchenden DNA-Fragmente gut dargestellt werden konnten. Entsprechend wurden zwischen 0,5 % und 2 % Agarose zum Puffer gegeben. Die Lösung wurde in einem Erlenmeyer Kolben in einer Mikrowelle erhitzt. Dabei wurden mehrmals 600 W für ca. 10 s gewählt, bis die Agarose komplett im Puffer gelöst war. Nach kurzem abkühlen bei RT wurde die Lösung in eine Gelkammer gegeben. EtBr wurde an dieser Stelle dazugegeben und mit der Lösung vermischt. Der Kamm wurde entsprechend der benötigten Taschenanzahl ausgewählt und in das Gel gesteckt. Es folgten ca. 15 min., in denen das Gel erkaltete und sich verfestigte. Der Kamm wurde anschließend vorsichtig entfernt und die Proben wurden geladen. Dabei wurden die Proben mit Gel Loading Dye zu einfacher Konzentration vermengt. Die elektrische Spannung wurde mit ca. 120 V angelegt, bis die Lauffront unten im Gel angekommen war.

4.2.2 Klonierung

Unter dem Begriff der Klonierung versteht man die identische Vervielfältigung von DNA-Molekülen. Dabei wird DNA in einen Vektor eingebracht. Klonierungen wurden angefertigt, um rekombinantes Protein von Zellen exprimieren zu lassen und anschließende Untersuchungen zu ermöglichen. Zunächst musste ein Expressionsvektor ausgewählt werden, in den die DNA integriert werden sollte. In dieser Arbeit wurde der pLBCX Vektor verwendet (8.3.1). Die Integration in den pLBCX Vektor war dabei essenziell nötig, da dieses Plasmid für die Erstellung viraler Partikel via HEK GP2 Zellen benötigt wird. Als Template wurde pcDNA3.1.LRP1 verwendet. Zur Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts wurde die PCR (4.2.2.2) angewandt.

Methoden

Durch Restriktionsverdau und anschließende Ligation wurde die DNA in den Expressionsvektor eingebracht. Da die auf diese Weise generierte Menge an Plasmid sehr gering war, musste im Anschluss eine bakterielle Transformation erfolgen, bei der enorme Mengen an Plasmid-Kopien entstanden. Zwischenschritte der Klonierung wurden via Agarose-Gelelektrophorese gemonitort.

Die Konzentration der Plasmide war zunächst äußerst gering, sodass nach einer Aufreinigung die bakterielle Transformation durchgeführt wurde (4.3.1).

4.2.2.1 Primerdesign

Mithilfe des Programms SnapGene Viewer wurden Primer designt und Klonierungsarbeiten geplant. Primer wurden entweder zur Sequenzierung oder zur Klonierung erstellt. Dabei wurde die Produktion in Auftrag gegeben. Primer zur Sequenzierung benötigten keine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym. Für Klonierungen mussten DNA-Fragmente mit Restriktionsenzymen behandelt werden können. Die DNA-Sequenz wurde in SnapGene Viewer gesucht. Für Anfang und Ende wurden ein forward- und ein reverse-Primer kreiert. Diese sollten nicht nur direkt an der komplementären DNA binden können, sondern auch über einen überstehenden Teil verfügen, der eine entsprechende Schnittstelle für zuvor ausgewählte Restriktionsenzyme darstellt. Um das Leseraster nicht zu beeinflussen, wurden nötigenfalls zusätzliche Basenpaare eingebracht.

4.2.2.2 PCR

PCR ist die Abkürzung für Polymerase Chain Reaction (zu Deutsch: Polymerase Kettenreaktion). Das enzymabhängige Verfahren dient der Vervielfältigung expliziter DNA-Abschnitte. Das Prinzip der Methode setzt sich aus drei Bestandteilen zusammen:

1. Denaturierung: Durch Erhitzen trennen sich beide DNA-Stränge voneinander und liegen anschließend als Einzelstränge vor.
2. Primer Anlagerung (Annealing): Durch Abkühlen lagern sich die hinzugegebenen Primer an die entsprechenden Abschnitte der DNA an. In dieser Arbeit wurde das Annealing stets bei 72°C durchgeführt. Dies wurde aufgrund des hohen GC-Gehalts der verwendeten Primer gewählt.
3. Elongation. Von 5'- in 3'-Richtung synthetisiert die Polymerase nun den Komplementärstrang.

Methoden

Im Anschluss wurden die Schritte in gleicher Reihenfolge so oft wiederholt wie gewünscht. Dadurch wurden die DNA-Fragmente exponentiell vervielfältigt. Neben der Polymerase wurden ein entsprechender Puffer sowie dNTPs (Desoxy-Nukleosid-Triphosphat, Tabelle 13) hinzugegeben. Es wurden zwei verschiedene Polymerasen verwendet. Die Bedingungen unterschieden sich außerdem je nach Primer und DNA-Länge.

Tabelle 21: PCR-Ansätze für eine 50 µl Reaktionslösung

Reagenzien	Phusion HF Polymerase	Q5 Polymerase
DEPC H ₂ O	28,5 µl	23 µl
5x Phusion HF Buffer	10 µl	-
Phusion HF Polymerase	0,5 µl	-
5x Q5 reaction buffer	-	10 µl
5x Q5 GC Enhancer	-	10 µl
Q5 DNA Polymerase	-	0,5 µl
dNTPs	1 µl	1 µl
Forward Primer 10 µM	2,5 µl	2,5 µl
Reverse Primer 10 µM	2,5 µl	2,5 µl
DNA-Matritze 1 µg/µl	5 µl	-
DNA-Matritze 2,5 ng/µl	-	0,5 µl

Tabelle 22: Bedingungen bei der PCR

Schritte	Phusion HF Polymerase	Q5 Polymerase
Denaturierung initial	95°C: 30 s – 180 s	98°C: 30 s – 180 s
Denaturierung repetitiv	95°C: 15 s	98°C: 10 s
Annealing	72°C: 20 s	72°C: 20 s
Elongation	72°C: 50 s pro kB	72°C: 50 s pro kB
Zyklen	30	30
Finale Elongation	72°C: 300 s	72°C: 300 s

} 30x

4.2.2.3 Restriktionsverdau

Um DNA-Fragmente in einen Vektor zu integrieren, mussten sowohl Vektor als auch Fragment einem Restriktionsverdau unterzogen werden. Dabei wurden die Primer bereits so gewählt, dass sie den entsprechenden Restriktionsenzymen die benötigten Schnittstellen boten. Fragment und Vektor wurden mit den gleichen Enzymen verdaut. New England Biolabs gab für seine Enzyme entsprechende Temperaturoptima sowie Wirkdauern aus und ob zwei Enzyme unter den gleichen Konditionen verwendet werden konnten. Durch den Verdau entstanden blunt-ends oder sticky-ends. Es wurde in dieser Arbeit immer der NEB CutSmart Puffer verwendet.

4.2.2.4 Ligation

Wurden Vektor und DNA-Fragment durch Restriktionsenzyme verdaut, folgte die Ligation. Die Ligase verband dabei die korrespondierenden Enden von Vektor und Fragment miteinander, sodass ein funktionsfähiges Plasmid generiert wurde.

Von großer Bedeutung war das Konzentrationsverhältnis von Vektor zu Fragment. Um die Gefahr der Selbst-Ligation des Vektors zu minimieren, wurde i.d.R. ein Massenverhältnis von 3:1 berechnet.

Meist wird die Ligation in Teilschritten durchgeführt (Obermoeller-McCormick et al. 2001). In dieser Arbeit wurde die Ligation der einzelnen Bestandteile in einem Schritt durchgeführt. Ligiert wurde über Nacht bei RT.

Tabelle 23: Ligation mit der NEB T4 Ligase für einen 30 µl Ansatz.

Reagenzien	Volumen [µl]
T4 Ligase Buffer 10x	3 µl
T4 Ligase	1,5 µl
Vektor	1 Teil
DNA-Fragment	3 Teile
DEPC-H ₂ O	30 µl – 4,5 µl – Volumen Vektor und Fragment

4.2.3 Aufreinigung

Um die Effizienz nachfolgender Restriktionsverdauung oder anderer, enzymabhängiger Prozesse zu erhöhen, folgte auf die PCR eine Aufreinigung. Dabei wurde das PCR-Produkt von Salzen und Chelatoren der PCR-Puffer befreit, die Enzyme hätten behindern können.

Die Aufreinigung der PCR Produkte erfolgte mit dem NucleoSpin Extract II Kit der Firma Clontech. Dabei wurde nach den Herstellerempfehlungen gearbeitet.

Ebenfalls wurden Fragmente nach Exzision aus einem Agarose-Gel aufgereinigt. Auch hier wurde nach den Empfehlungen des Herstellers gearbeitet. Nach der Aufreinigung wurden stets die Konzentrationen der DNA mittels NanoDrop One C (Tabelle 17) bestimmt.

4.3 Mikrobiologische Methoden

4.3.1 Hitzeschocktransformation

Bei der Transformation werden kompetente Zellen, resp. zur DNA-Aufnahme befähigte Bakterien, verwendet, um DNA zu vervielfältigen. Die DNA liegt dabei als Plasmid vor und wird, entsprechend dem exponentiellen Wachstum der Bakterien, vervielfältigt. Verwendet wurden DH5 α -Zellen (s. Tabelle 2). Diese wurden zu 40 μ l bei -80°C gelagert und kurz vor der Transformation herausgenommen. 7 μ l der Plasmid-DNA wurden dazu gegeben und durch leichtes, mehrmaliges Schlagen gegen das Reaktionsgefäß mit den Bakterien vermischt. Es folgte eine Inkubation für 20 min. auf Eis. Für 50 s wurde das Gefäß in ein Wasserbad bei 42°C gegeben, nach Ablauf der Zeit zügig wieder auf Eis gestellt und dort für 2 min. belassen. Durch den Hitzeschock bei 42°C sollten die Bakterienwände porös werden und die DNA-Aufnahme ermöglichen. 400 μ l LB-Medium (lysogeny broth, Tabelle 14) wurden hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde nun für 2 h bei 37°C in einem Thermo-Schüttler inkubiert, anschließend für 1 min. bei 6000 RPM zentrifugiert. 350 μ l des Überstandes wurden vorsichtig entnommen und verworfen. Das am Boden des Reaktionsgefäßes entstandene Pellet wurde in den verbliebenen Überstand resuspendiert. Mit sterilen Spateln wurde die Lösung auf vorbereitete, Antibiotikahaltige LB-Agarplatten gegeben und ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Antibiotikum wurde entsprechend dem auf dem Plasmid vorhandenen Resistenzgen ausgewählt und gewährleistete, dass lediglich Kolonien auf der Platte wuchsen, die das Plasmid zuvor aufgenommen hatten.

Im Folgenden wurde eine Vorkultur angesetzt. Dafür wurden 6 ml Antibiotikahaltigen LB-Mediums für eine gewachsene Bakterienkolonie verwendet. Die Kolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in das Medium gegeben. Der Kolben wurde für 8 h bei 37°C im Thermoschüttler inkubiert. Im Anschluss wurden 4 ml der Vorkultur in 200 ml antibiotikahaltiges LB-Medium gegeben. Diese Hauptkultur wurde erneut für 8 h bei 37°C auf dem Thermoschüttler inkubiert.

4.3.2 DNA-Extraktion

Die Vervielfältigung der Plasmid-DNA fand mit der Transformation statt. Um die Plasmide jedoch zur Transfektion verwenden zu können, mussten sie aus den Bakterien isoliert werden.

Methoden

Um den Erfolg einer Klonierung zu beurteilen, wurde eine Mini-Präparation durchgeführt. Auf diese Weise wurde die Plasmid-DNA vervielfältigt, um sie in einem Agarosegel darstellbar zu machen. Verwendet wurde das High Pure Plasmid Isolation Kit (Tabelle 15). Es wurde entsprechend den Herstellerangaben gearbeitet.

Zur abschließenden Gewinnung höherer Mengen an Plasmid-DNA wurde das Kit NucleoBond Xtra Midi EF (Tabelle 15) verwendet. Es wurde entsprechend den Herstellerempfehlungen gearbeitet. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mit dem NanoDrop One C bei 260 nm bestimmt.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Proteinextraktion

Zunächst wurden die Zellen auf Eis inkubiert, um weitere biochemische Prozesse nach Abschluss des Experiments weitestgehend zu unterbinden. Die Zellen wurden fünf Mal mit 4°C PBS gewaschen, wobei die Menge nach Schalengröße variieren konnte.

Nach Endozytose-Experimenten wurden die Zellen noch zwei Mal mit pH2 PBS gewaschen. Dadurch lösten sich oberflächlich gebundene Liganden von LRP1 (2.9). Die Zellen wurden mit einem Plastikschaber in PBS abgekratzt und in 1,5 ml bzw. 2 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen. Es folgte eine Zentrifugation für 4 min. bei 4°C und 7000 RPM, wodurch die Zellen pelletiert wurden. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die Pellets, je nach Größe, mit 30-500 µl eines Lyse-Puffers inkubiert. Es fanden entweder NP40-, oder RIPA-Puffer Anwendung (Tabelle 16). Diesen wurde ein Protease-Inhibitor in 50-facher Verdünnung hinzugegeben.

Durch Vibration wurden die Pellets im Lyse-Puffer gelöst und für 20 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 20 min. bei 4°C und 14.000 RPM zentrifugiert.

Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C konserviert.

4.4.2 BCA Assay und photometrische Konzentrationsbestimmung

Nach der Extraktion der Proteine wurde die Gesamtproteinkonzentration des Lysats bestimmt. Dies geschah mit dem BCA Protein Assay Kit (Tabelle 15), basierend auf der Methode von Smith et al. 1985.

Bei der sog. Biuret-Reaktion werden, in alkalischer Lösung, Cu^{2+} -Ionen durch die Peptidbindungen der Proteine chelatiert und dabei zu Cu^+ reduziert. Cu^+ komplexiert mit BCA und bildet einen chromatogenen Farbkomplex. Dieser entspricht in seiner

Methoden

Intensität der Menge an Protein und kann makroskopisch durch einen Farbumschlag der hellgrünen Lösung nach lila beobachtet werden. Durch Messung der Lösungen in einem Photometer bei 562 nm konnte die Beobachtung objektiviert und die Konzentration bestimmt werden. Der BSA Standard diente dabei zur Eichung (Tabelle 24).

Tabelle 24: BSA Standardreihe für BCA-Assay

Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	H ₂ Odd [μl]	BSA Standard 1 mg/ ml [μl]
0	25	0
100	22	2,5
200	20	5
300	17,5	7,5
400	15	10
500	12,5	12,5

Das Kit bestand aus zwei Komponenten: Lösung A (BCA) und Lösung B (CuSO₄). Für jeden Versuch wurden die beiden Lösungen frisch miteinander vermengt, wobei Lösung B 1:50 mit Lösung A gemischt wurde. Die Gesamtmenge richtete sich nach der Anzahl der Proben zzgl. der Standardreihe aus 6 Proben.

Das Zell-Lysat wurde, 1:10 in ddH₂O (doppelt deionisiertes Wasser) verdünnt, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt. Eine Standardreihe aus aufsteigenden Konzentrationen einer BSA Lösung (0-500 ng/ μl) wurde entsprechend Tabelle 24 in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. 500 μl der BCA Lösung wurden jeweils in die Reaktionsgefäße pipettiert. Nach kurzem abzentrifugieren mit der Tischzentrifuge wurden die Proben für 30 min. bei 60°C auf dem Thermoschüttler inkubiert und geschüttelt.

Das Prinzip der Photometrie basiert auf dem Gesetz von Lambert und Beer, nach welchem gilt:

$$E = c * d * \epsilon.$$

Die Extinktion wird beeinflusst von der Wellenlänge. Anhand der ermittelten Konzentration konnte von jeder Probe die gleiche Proteinmenge bzw. Konzentration zur weiteren Analyse verwendet werden.

4.4.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE ist eine essenzielle Methode der Proteinanalytik, basierend auf den Ergebnissen von Laemmli 1970. SDS (Sodium dodecyl sulfate) ist ein Detergens, welches zur Denaturierung von Proteinen und zur negativen Ladung von Proteinen führt.

Die Negativierung der Proteinladung ist essenziell, damit alle Proteine im elektrischen Feld zur positiven Anode wandern. Um eine Auftrennung nach Proteingröße zu gewährleisten, wurde zwischen Kathode und Anode ein Polyacrylamidgel platziert, welches die Proteine passieren mussten. Die Proteine blieben entsprechend ihrer Größe im molekularen Netz hängen, sodass große Proteine weiter oben, kleine Proteine weiter unten im Gel zum Stillstand kamen.

Die Gele setzten sich aus zwei Komponenten zusammen: Die Proteine wurden auf das großporige Sammelgel geladen. Anschließend passierten sie das kleinporige Trenngel. Um die Proteingröße entsprechend der Höhe im Gel deuten zu können, wurden auf jedes Gel Marker bekannter Größen aufgetragen. Diese waren farblich markiert und makroskopisch sichtbar.

4.4.3.1 Gießen der Gele

Die Gele für die SDS-PAGE wurden selbst gegossen. Dazu wurde das Gelsystem der Firma BioRad verwendet. Zuerst wurden die Glasplatten, entsprechend der gewünschten Dicke (0,75, 1,0 oder 1,5 mm) ausgewählt und mit 70% Ethanol gereinigt. Die Platten wurden in einen Halter eingesetzt, dieser wurde in einen Ständer geklemmt. Die Basisplatten der Ständer wurden mit einer dünnen Schicht Silikongel vorbehandelt. Die Lösungen wurden in 15 ml bzw. 50 ml Reaktionsgefäßen angesetzt und direkt aus diesen zwischen die Glasplatten gegossen. Zuletzt kamen zu den Lösungen jeweils APS und TEMED dazu, um die Reaktion zu starten.

TEMED fungiert als Katalysator. APS wurde dabei zersetzt, wodurch Sulfatradikale frei wurden. Das Trenngel wurde zuerst und bis zu einer Höhe von 2,5 cm unterhalb der Oberkante gegossen. Direkt nach dem Gießen wurde eine dünne Schicht 100% Isopropanol darüber pipettiert und das Gemisch für 10 min. bei RT inkubiert.

Methoden

Tabelle 25: Zusammensetzung eines Polyacrylamid Gels

Reagenzien	8% Trenngel	10% Trenngel	12% Trenngel	14% Trenngel	4% Sammelgel
ddH ₂ O	5,5 ml	5 ml	4,5 ml	4 ml	1,563 ml
40% Acrylamid (29:1)	2 ml	2,5 ml	3 ml	3,5 ml	312 µl
Trenngel-Puffer pH 8.8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
Sammelgel-Puffer pH 6.8	-	-	-	-	625 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	25 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	2,5 µl

Nach weiteren 10 min. wurde das Isopropanol abgeschüttet, das Gel mit ddH₂O gespült und mit einem Filterpapier vorsichtig getrocknet. Das Sammelgel wurde direkt auf das Trenngel gegossen. Direkt nach dem Eingießen wurde der Gelkamm, entsprechend der gewünschten Zahl an Wells (10-15), luftblasenfrei eingesetzt. Nach weiteren 10 min. war auch das Sammelgel fest und der Kamm konnte entnommen und die Taschen mit SDS-Puffer gespült werden.

Die Gele wurden nie am gleichen Tag gegossen, an dem sie zur Elektrophorese verwendet wurden, da die Polymerisation nicht unmittelbar nach Erhärten des Gels abgeschlossen ist. Die Gele wurden in nasse Zellulose eingewickelt und in Plastiktüten verschlossen bei 4°C gelagert.

4.4.3.2 Vorbereitung der Proben

Es wurden, je nach Fragestellung, unterschiedliche Mengen Protein auf die Gele aufgetragen. Wurde der Überstand aufgetragen, wurde dabei so viel Volumen wie möglich verwendet.

Zusammen mit Rotiload, einem SDS-Puffer mit blauem Farbstoff und β-Mercaptoethanol, wurden die Proben für 5 min. bei 95°C gekocht. Dabei wurde Rotiload einfach konzentriert dazugegeben. Durch die Temperaturerhöhung verloren die Proteine ihre Quartärstruktur. Durch SDS und β-Mercaptoethanol wurde auch die Sekundär- und Tertiärstruktur aufgehoben.

Methoden

4.4.3.3 Bedingungen bei der SDS-PAGE

Die gekochten Proben wurden mit Ladespitzen in die Wells pipettiert. Dies geschah vorsichtig, sodass keine Luftblasen die Proben wieder aus den Wells heben konnten. Es wurde zunächst für ca. 30 min. eine Spannung von 100V angelegt. Sobald eine einheitliche Lauffront sichtbar war, wurde auf 150V erhöht, bis die Lauffront ca. 0,5 cm vor Ende des Gels ankam. Das Gel wurde samt Glasplatten aus der Kammer entnommen. Mit einem Metallhebel wurden die Platten voneinander getrennt und das Gel konnte vorsichtig entnommen werden. I.d.R. wurden die Überreste des Gelkamms abgetrennt.

4.4.4 Coomassie Polyacrylamid-Gel Färbung

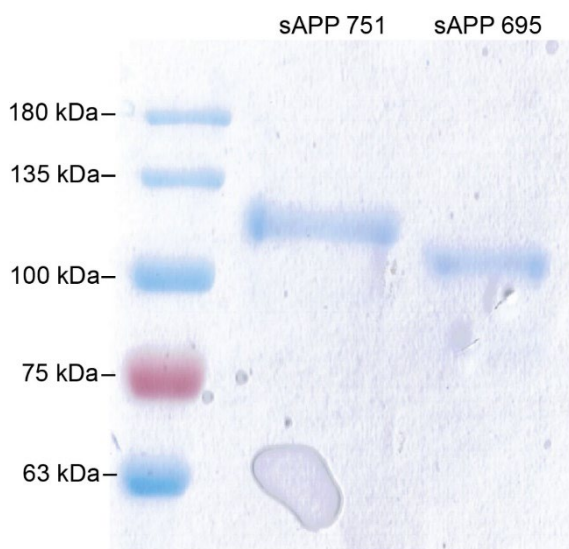


Abbildung 4.2: Coomassie Gelfärbung am Beispiel der Proteinlösungen sAPP 751 und sAPP 695

Getestet wurde, ob die jeweiligen Lösungen rein waren. Es waren außer den erwarteten Banden keine weiteren zu erkennen. Daher konnte hier von reinen Proteinlösungen ausgegangen werden. (Marker: Abcam Prism Ultra Protein Ladder)

Behälter befand sich die Coomassie Färbelösung. Durch die Essigsäure verringerte sich der pH-Wert der Lösung, wodurch der negativ geladene Farbstoff besser an die positiv geladenen Proteine binden konnte. Nach einer Inkubation über 1 h wurde für 10 min. in 10%-Essigsäure inkubiert.

Es folgten zwei weitere Schritte, in denen entfärbt wurde. Für 1 h wurde eine Entfärbelösung aus 20% Ethanol und 7% Essigsäure, über Nacht eine 10% Essigsäure

Der Coomassie-Farbstoff färbt Proteine in Polyacrylamid Gelen bläulich ein. Durch Coomassie Gelfärbungen lassen sich auf dem Gel vorhandene Proteine ohne Western Blotting (4.4.5) und anschließende Immundetektion nachweisen. Da alle auf dem Gel vorhandenen Proteine dargestellt werden, handelt es sich um ein unspezifisches Verfahren. Die Färbemethode wurde verwendet, um die Reinheit von Proteinlösungen zu ermitteln.

Das Gel wurde vorsichtig aus der Kammer entnommen und in einen gedeckelten Behälter gegeben. In diesem

Methoden

Lösung auf dem Gel belassen. Der Behälter wurde in den Inkubationszeiten kontinuierlich geschwenkt.

Die Auswertung des Gels erfolgte eingeschweißt in einer Folie auf einem Computerscanner.

4.4.5 Western Blot

Edwin Southern gilt als der Erfinder der Blotting Technik. 1975 entwickelte er das nach ihm benannte Southern Blotting. Mit diesem Verfahren ließ sich DNA nachweisen.

In Anlehnung daran entstanden der Northern Blot (RNA Nachweis) und der Western Blot (Protein Nachweis), sowie Northwestern und Southwestern Blot (Interaktion von RNA bzw. DNA und Proteinen).

Beim Western Blot wurden durch die Anlage einer elektrischen Spannung die Proteine eines Polyacrylamid Gels auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Transferierte Proteine wurden durch die anschließende Antikörperbehandlung sichtbar gemacht.

Bei 4°C wurden 30 V für einen Zeitraum von 10 h angelegt. Nach Ablauf der Zeit wurde die Membran mit d_2H_2O von Rückständen befreit und kurz mit Ponceau S (Tabelle 16) inkubiert. Dadurch wurden alle Proteinbanden sichtbar gemacht, wodurch die Gleichmäßigkeit des Aufladens der Proben beurteilt werden konnte. Im Anschluss wurde die Membran für 30 min. bei 40°C mit TBS-T + 5% Magermilchpulver inkubiert, um unspezifische Bindung zu vermindern.

4.4.5.1 Antikörperbehandlung und Auswertung der Western Blots

Proteine besitzen Epitope. Diese werden von spezifischen Antikörpern erkannt und gebunden. Dabei erfolgte die Inkubation der Western Blots zunächst über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei RT mit einem Primärantikörper, der die Epitope der Proteine binden konnte. Es folgten 5-10 min. Inkubation in TBS-T auf einem Schüttler, was zwei Mal wiederholt wurde. Anschließend wurde der Blot für 1 h mit einem Sekundärantikörper behandelt. Dieser war gegen die Antikörper des Tieres gerichtet, aus dem die Primärantikörper stammten. Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym HRP (horse radish peroxidase) assoziiert.

Nach Ablauf der Zeit erfolgten erneut drei Waschschriffe für 5-10 min. in TBS-T.

Allen Antikörpern wurde 0,02 % NaN_3 zugefügt.

Das mit den Sekundärantikörpern assoziierte HRP sorgte, nach Zugabe des Substrats Luminol für das Sichtbar werden der entsprechenden Proteinbanden. Um

Methoden

Bandenintensitäten zu objektivieren, wurden diese mit dem Programm ImageJ ausgelesen und in Exceldateien ausgewertet. Bei jedem Western Blot wurde eine Ladekontrolle angefertigt. Dafür wurden entweder m@Tubulin oder r@Aktin Antikörper verwendet.

4.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden in Excel gesammelte und normierte Daten mit dem Programm Prism weiterverarbeitet.

Verglichen wurden Mittelwerte in Prozent gegen einen hypothetischen Wert von 100%. Zum Vergleich zweier Gruppen miteinander wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Wurden mehr als zwei Gruppen auf eine Zielvariable beobachtet, wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA; Analysis Of Variance) mit post-hoc Tukey's Test (bzw. Tukey-Kramer Test bei ungleichen Gruppengrößen) verwendet. Post-hoc Tests wurden angewandt, wenn sich in ANOVA gemessene Ergebnisse signifikant voneinander unterschieden.

Es wurde für beide Verfahren von einer Normalverteilung der Messwerte in der jeweiligen Grundgesamtheit ausgegangen.

Die Nullhypothese der einfachen Varianzanalysen enthielt die Aussage, dass zwischen den beobachteten Gruppen kein Unterschied bestand.

Konfidenzintervalle von 95% und Werte von $p < 0,05$ attestierten einen signifikanten Unterschied.

Ergebnisse

5 Ergebnisse

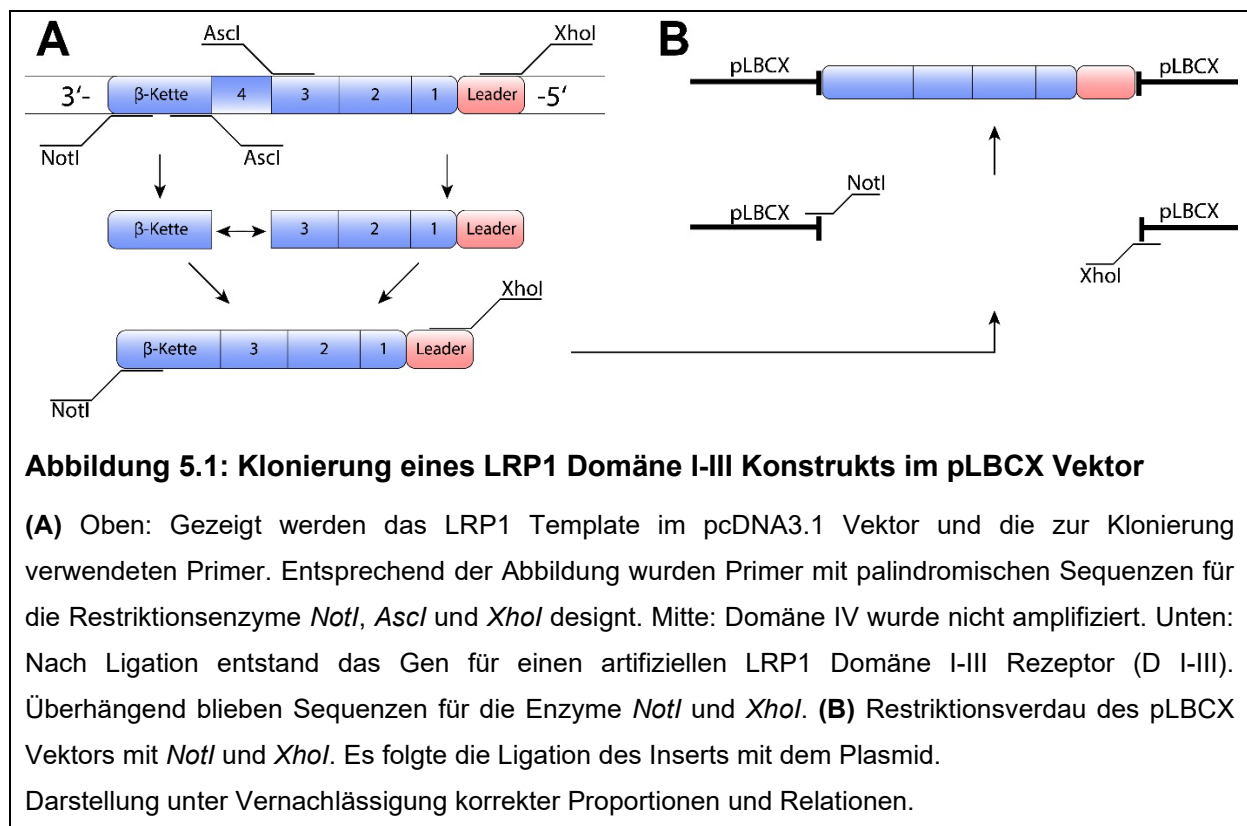
Für A β ist die Interaktion mit LRP1 bereits vorbeschrieben (Shibata et al. 2000). Dabei kann das Peptid an Domäne II und IV des Rezeptors binden. Dieser leitet daraufhin die Endozytose ein.

Um zu erfassen, ob LRP1 auch die Zellaufnahme von A η - α einleitet bzw. welche Liganden-bindenden Domänen für die Bindung zuständig sind, wurden verschiedene Zelllinien auf ihr quantitatives Aufnahme-Verhalten hin untersucht.

5.1 Erstellung stabiler Zelllinien

5.1.1 Klonierung artifiziieller LRP1 Rezeptoren mit drei Liganden-bindenden Domänen

Die Klonierungsarbeit für das Domäne I-III Konstrukt (D I-III) wurde entsprechend Abbildung 5.1 geplant und durchgeführt.



Es wurde die β -Kette mit Primern amplifiziert, die die palindromischen Erkennungssequenzen der Enzyme *NotI* und *AscI* enthielten. Parallel dazu wurde ein Abschnitt amplifiziert, der sowohl die Domänen I-III der α -Kette als auch die Leader

Ergebnisse

Sequenz enthält. Die Primer integrierten entsprechend der Abbildung die Erkennungssequenzen für die Enzyme *AscI* und *XhoI*.

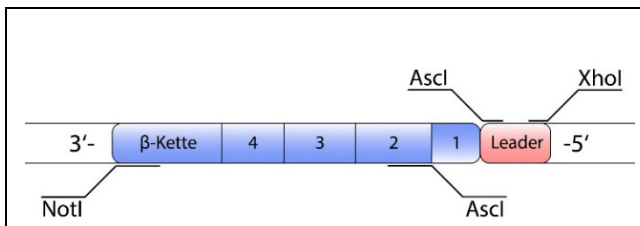


Abbildung 5.2: Klonierung eines LRP1 Domäne II-IV Konstrukts im pLBCX Vektor

Es wurden Primer mit palindromischen Sequenzen für die Restriktionsenzyme *NotI*, *AscI* und *XhoI* designiert. Domäne I wurde nicht amplifiziert. Domäne I wurde nicht amplifiziert. Darstellung unter Vernachlässigung korrekter Proportionen und Relationen.

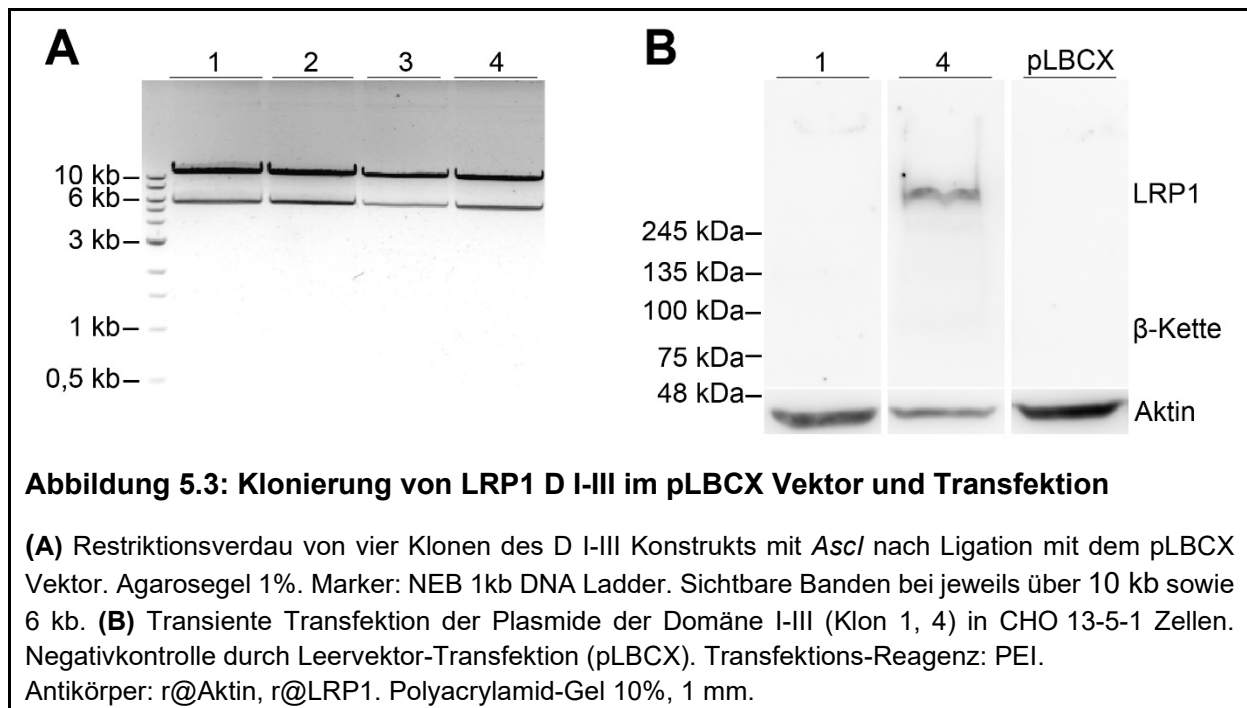
Für das Domäne II-IV Konstrukt (D II-IV) wurde die Rezeptorsequenz ebenfalls in zwei Teilen amplifiziert. Dazu wurde die β -Kette bis einschließlich Domäne II mit Primern amplifiziert, die die Erkennungssequenzen für *NotI* und *AscI* enthielten. Einzeln vervielfältigt wurde die Leader Sequenz mit Erkennungsstellen für die Enzyme *AscI* und *XhoI*. Entsprechend

Abbildung 5.1 wurde der pLBCX Vektor mit *NotI* und *XhoI* vorverdaut. Es folgte die Integration in den pLBCX Vektor. Die fertigen Plasmide wurden entsprechend Abbildung 5.3 A und Abbildung 5.4 A einem Restriktionsverdau unterzogen und auf ein Agarosegel aufgetragen, um anhand der Größe der Banden auf die korrekte Gesamtlänge der integrierten DNA rückschließen zu können. Dabei wurden mehrere Klone getestet. Die entstandenen Banden der D I-III Fragmente (Abbildung 5.3 A) befanden sich einmal knapp unter 6 kb und einmal über 10 kb im Vergleich mit dem NEB 1kb DNA Ladder.

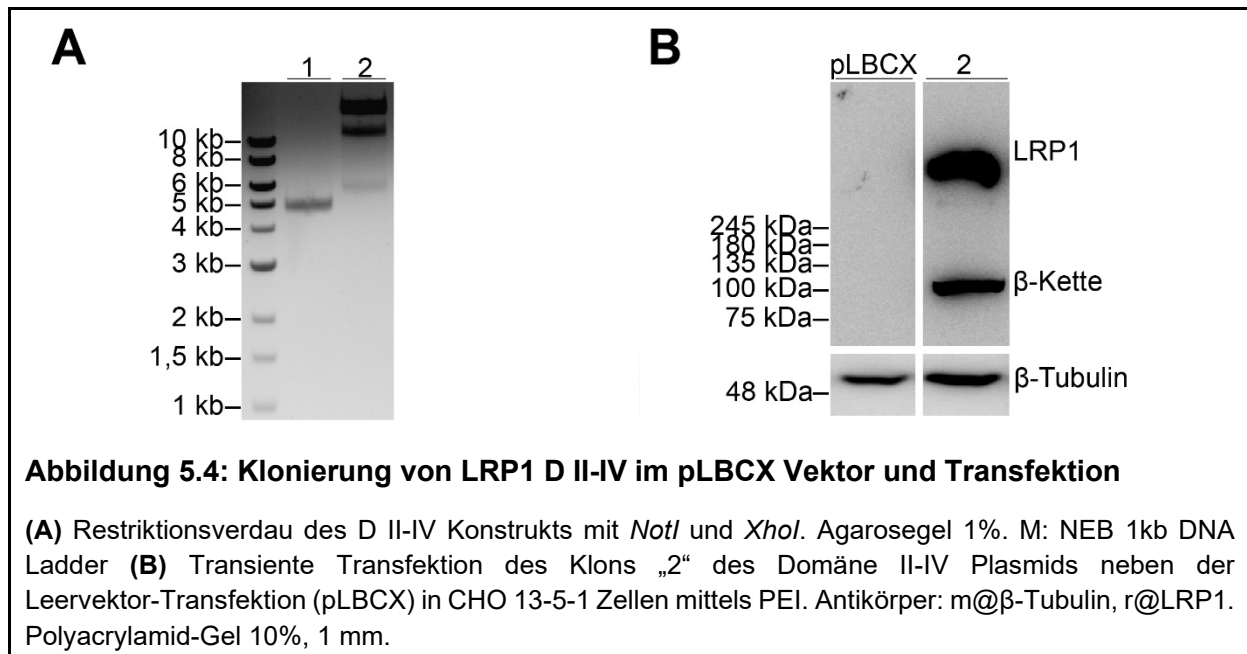
Bei den Fragmenten von D II-IV (Abbildung 5.4 A) war in der ersten Spur eine Bande bei 5 kb zu sehen. In der zweiten Spur sind drei Banden erkennbar. Eine Bande war dabei bei 6 kb, zwei Banden waren jeweils über 10 kb verortet.

Um einen spezifischen und vor allem funktionellen Nachweis über den Erfolg zu erhalten, wurden die Plasmide jeweils transient in CHO 13-5-1 Zellen transfiziert und das Zell-Lysat nachfolgend in einer SDS-PAGE analysiert. Der Western Blot von D I-III bzw. zweier transfizierter Plasmide ist in Abbildung 5.3, von D II-IV in Abbildung 5.4 dargestellt. Von D I-III (Abbildung 5.3) wurden zwei Klone (1, 4) für die Transfektion verwendet. Man sieht, dass trotz identischer Darstellung der Plasmide 1 und 4 im Agarosegel (A) nach Transfektion und Behandlung mit r@LRP1 (1704) nur Klon 4 im Western Blot Banden zeigt (B). Das Konstrukt zeigte eine Bande über 245 kDa.

Ergebnisse



Von D II-IV (Abbildung 5.4) wurde der Klon 2 (A) verwendet. Im Western Blot (B) wurden nach Antikörper-Behandlung Banden der Höhen 100 kDa und über 245 kDa sichtbar.



Alle erstellten und weiter verwendeten Plasmide wurden sequenziert. Die Vektorkarten der beiden Plasmide wurden im Anhang hinterlegt (8.3). Für D I-III (8.4.1) mussten zwei, für D II-IV (8.4.2) eine zusätzliche Base eingefügt werden, um das Leseraster nicht zu verschieben.

5.1.2 Erstellung stabiler Zelllinien mit dem Ziel der Überexpression von LRP1 und artifiziellen LRP1 Varianten

Es wurden entsprechend 4.1.2.2 stabile Zelllinien erstellt.

Verwendet wurden LRP1 Konstrukte, die in den pLBCX Vektor integriert waren bzw. ein LRP1^{FL} (Full Length) Konstrukt, dass in den pcDNA3.1 Vektor integriert war.

Die Plasmide für LRP1 und LRP1 Domäne I-II (D I-II) und LRP1 Domäne III-IV (D III-IV) lagen bereits vor Erstellung dieser Arbeit vor und musste nicht erst generiert werden (Tabelle 3). Die Konstrukte für drei Liganden-bindende Domänen wurden in dieser Arbeit erstellt (5.1.1). Nach der Erstellung retroviraler Partikel via HEK-GP2-293 Zellen wurde der virale Überstand geerntet. Die Virustiter wurden entsprechend 4.1.2.2.2 bestimmt und können Tabelle 26 entnommen werden.

Tabelle 26: Titer der viralen Partikel

Virus	Virustiter [CFU/ml]
LRP1 ^{FL}	2,1*10 ⁵
LRP1 D I-II	1,14 ⁴
LRP1 D III-IV	0,8 ³
LRP1 D I-III	7,69*10 ⁵
LRP1 D II-IV	4,13*10 ⁵

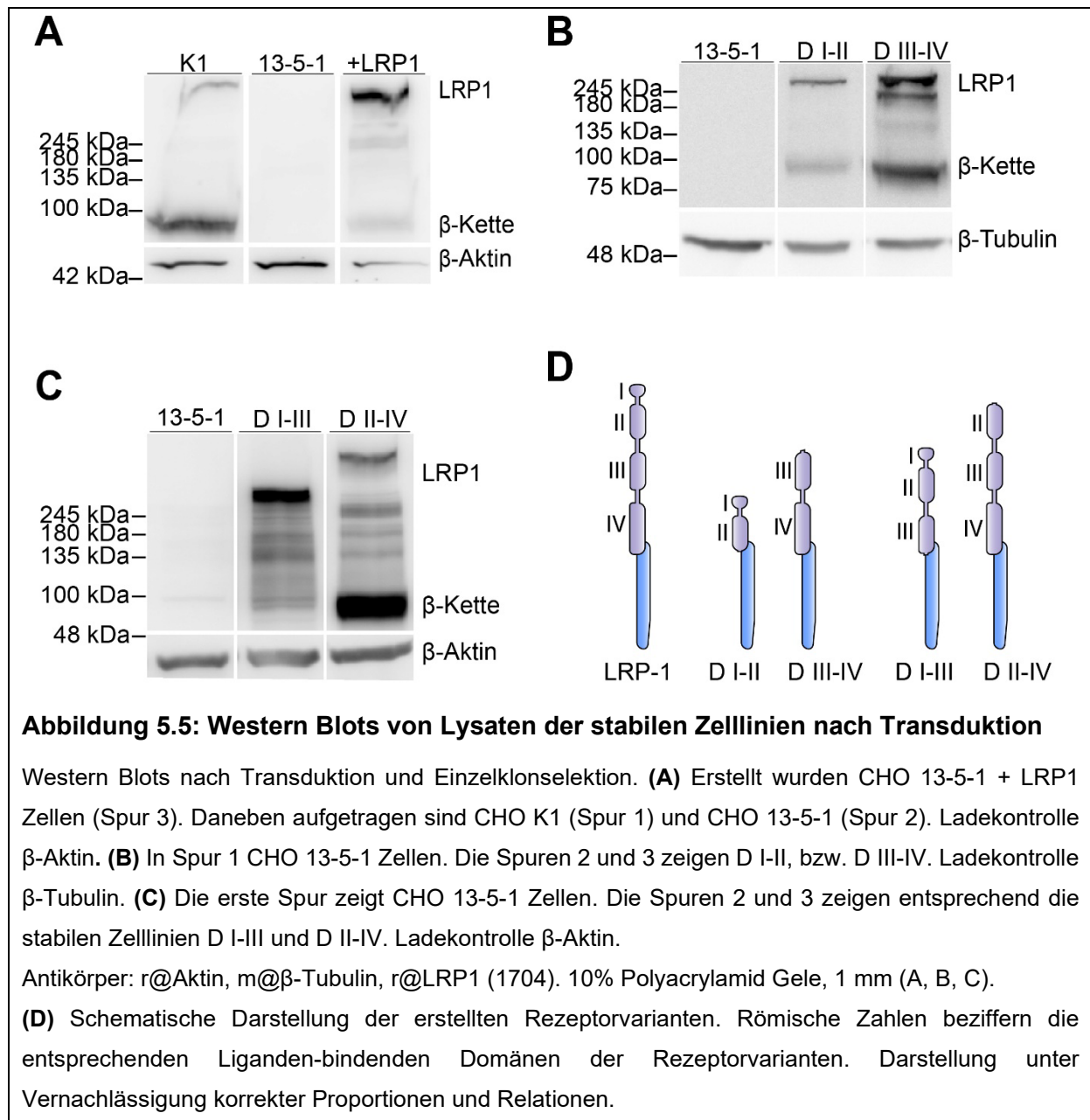
Es wurden CHO 13-5-1 Zellen transduziert, die eine geringe Passage-Zahl aufwiesen. Neben der neu erstellten Zelllinie CHO 13-5-1 + LRP1 (Abbildung 5.5 A) lagen ebenfalls CHO K1 Zellen vor, die eine wildtyp-Zelllinie darstellten und zur Kontrolle bei den folgenden Uptake-Versuchen verwendet wurden.

Konstrukte mit zwei Liganden-bindenden Domänen enthielten die Domänen I-II bzw. III-IV (Abbildung 5.5 B). Zuletzt wurden Zellen erstellt, die jeweils drei der vier Liganden-bindenden Domänen enthielten (C). Aufgetragen wurde zur Antikörper Kontrolle jeweils CHO 13-5-1 Zell-Lysat. Als Ladekontrolle wurde r@Aktin (A, C) bzw. m@β-Tubulin (B) verwendet. Die durch die Transduktion entstandenen Mischkolonien wurden entsprechend 4.1.2.2.1 einer Einzelklonselektion unterzogen.

Der ausgewählte Klon des CHO 13-5-1 + LRP1 Konstrukts (Abbildung 5.5 A) zeigte eine deutliche Bande über 245 kDa, eine knapp unter 245 kDa sowie eine unter 100 kDa. Abbildung 5.5 B zeigt die verwendeten Klone des D I-II sowie des D III-IV Konstrukts. D I-II zeigte eine Bande über 245 kDa und eine unter 100 kDa. D III-IV zeigt eine Bande über 245 kDa, eine zwischen 180 kDa und 245 kDa, eine schwache

Ergebnisse

Bande über 135 kDa sowie eine Bande unter 100 kDa. In Abbildung 5.5 C sind die entsprechenden Klone der LRP1 Konstrukte mit drei Liganden-bindenden Domänen abgebildet. Sowohl D I-III als auch D II-IV wiesen auch unspezifische Bindung auf. Deutliche Banden waren jedoch abgrenzbar. Bei D I-III über 245 kDa, bei II-IV über 245 kDa sowie unter 100 kDa. Bei den Western Blots waren ebenfalls die entsprechenden Banden der Ladekontrollen in allen Spuren sichtbar (β -Aktin über 42 kDa (A) bzw. unter 48 kDa (C), β -Tubulin über 48 kDa (B)).



Es erfolgte keine statistische Auswertung zum Vergleich der Bandenintensitäten. Die visuelle Begutachtung der Western Blots im Vergleich mit der CHO 13-5-1 Zelllinie war

Ergebnisse

für das weitere Procedere ausschlaggebend. Der funktionelle Nachweis der neu geschaffenen Zelllinien wurde in 5.1.3 erbracht. Zugunsten einer höheren Nachvollziehbarkeit wurden in Abbildung 5.5 D die verwendeten, artifiziellen Rezeptor-Varianten noch einmal schematisch dargestellt (Vgl. Abbildung 1.1).

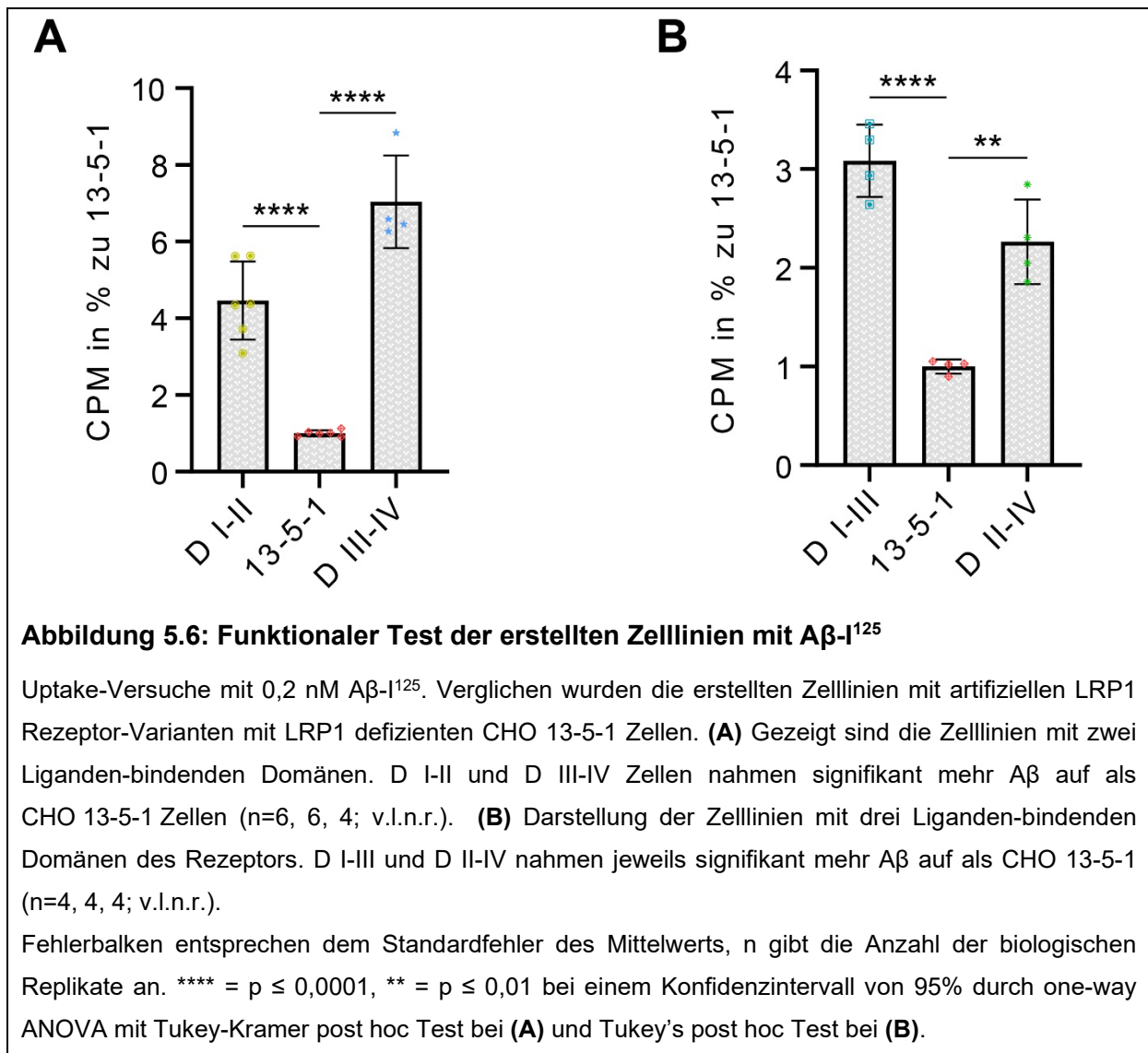
5.1.3 Test auf Funktionalität der artifiziellen LRP1 Konstrukte

CHO 13-5-1 + LRP1 Zellen exprimierten keine artifizielle Variante, sondern die physiologische Form des Rezeptors. Um jedoch die Zelllinien mit artifiziellen LRP1 Varianten (5.1) auf Funktionalität zu überprüfen, wurden Uptake-Versuche mit A β -I¹²⁵ durchgeführt. Da A β an LRP1 die Liganden-bindenden Domänen II und IV bindet, wurden die neu erstellten Zelllinien auf ihr Aufnahmeverhalten untersucht. Bei positivem Ergebnis konnte von Funktionalität der Zellen ausgegangen werden. Dafür wurden die Zellen mit A β -I¹²⁵ behandelt und auf ihr quantitatives Uptake-Verhalten hin beobachtet. Es wurde entsprechend 4.1.2.3.2 vorgegangen.

Zunächst wurden die Zelllinien untersucht, die zwei der vier Liganden-bindenden Domänen aufwiesen (D I-II, D III-IV). Diese wurden mit CHO 13-5-1 Zellen verglichen. Es konnte festgestellt werden, dass sowohl D I-III als auch D II-IV Zellen mehr A β -I¹²⁵ aufnahmen als CHO 13-5-1 Zellen (Abbildung 5.6 A). Der Unterschied von D I-III und D II-IV zu CHO 13-5-1 war dabei jeweils signifikant ($p \leq 0,0001$).

Unter vergleichbaren Bedingungen wurden anschließend die Zelllinien getestet, die drei Liganden-bindende Domänen aufwiesen (Abbildung 5.6 B). Im Vergleich zu CHO 13-5-1 Zellen nahmen D I-III und D II-IV mehr A β -I¹²⁵ auf. Dabei waren die Unterschiede signifikant ($p \leq 0,0001$ für D I-III, $p \leq 0,01$ für D II-IV).

Die neu erstellten Zelllinien banden und endozytierten A β -I¹²⁵ mittels der artifiziellen LRP1 Konstrukten in allen Fällen.



5.2 Rezeptorvermittelte Endozytose von A η - α via LRP1 und artifiziellen LRP1 Varianten

5.2.1 Endozytose via LRP1

Um zu testen, ob LRP1 die Aufnahme von A η - α in CHO Zellen vermittelt, wurden CHO K1 Zellen mit der LRP1 defizienten CHO 13-5-1 Zelllinie verglichen.

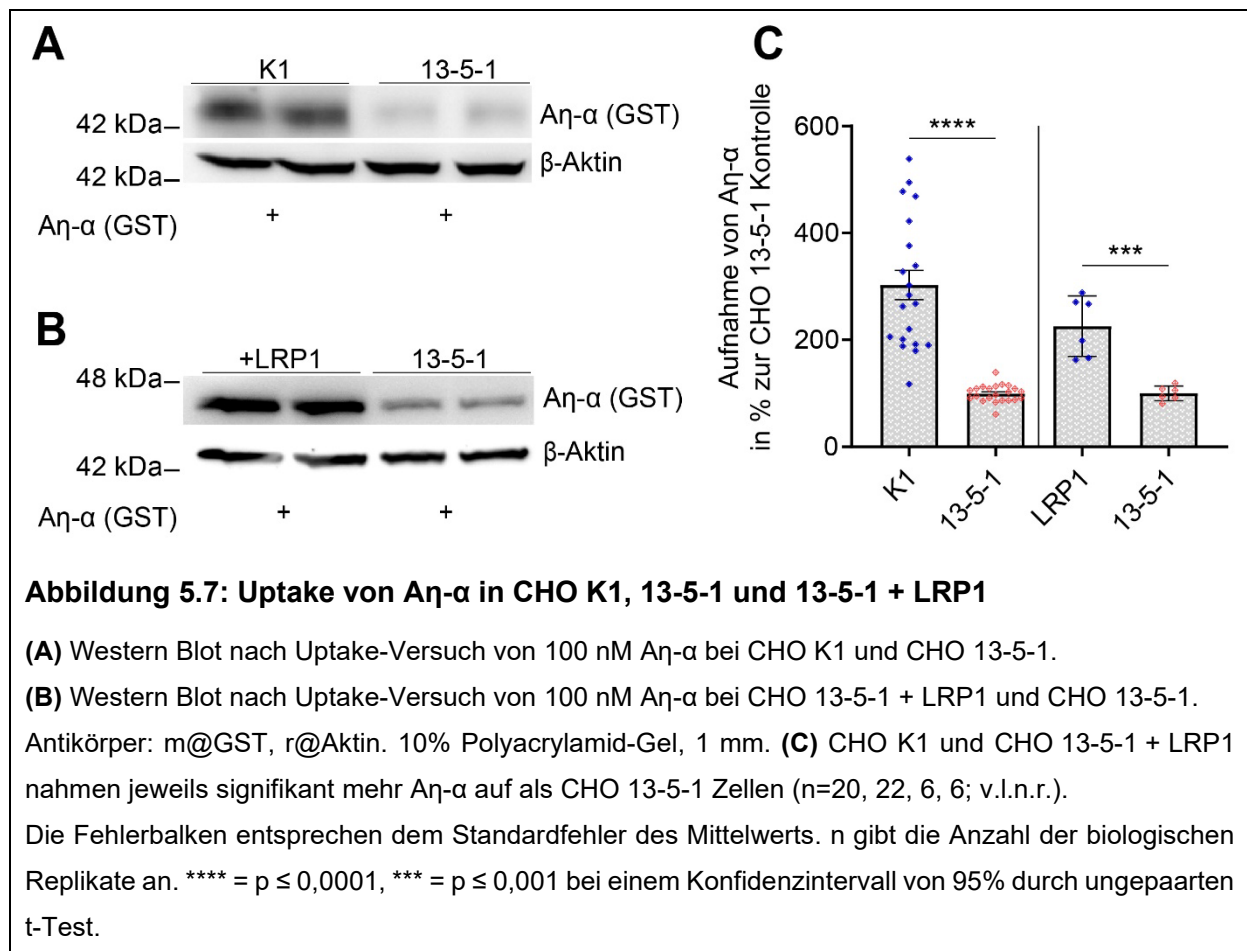
Darüber hinaus wurden ebenfalls die zuvor erstellten CHO 13-5-1 + LRP1 Zellen untersucht. Da die Radiomarkierung von A η - α zu einer gestörten Rezeptor-Liganden Interaktion führte, wurden die Uptakes via SDS-PAGE und Western Blotting (s. 4.4) analysiert. Dafür wurden alle Zelltypen für 1 h mit A η - α behandelt (4.1.2.3). Es wurden 100 nM Lösungen verwendet.

Abbildung 5.7 A zeigt einen Western Blot des Versuchs CHO K1 und 13-5-1. Zu sehen sind Lysate beider Zelllinien im Doppelansatz, die jeweils mit A η - α behandelt wurden.

Ergebnisse

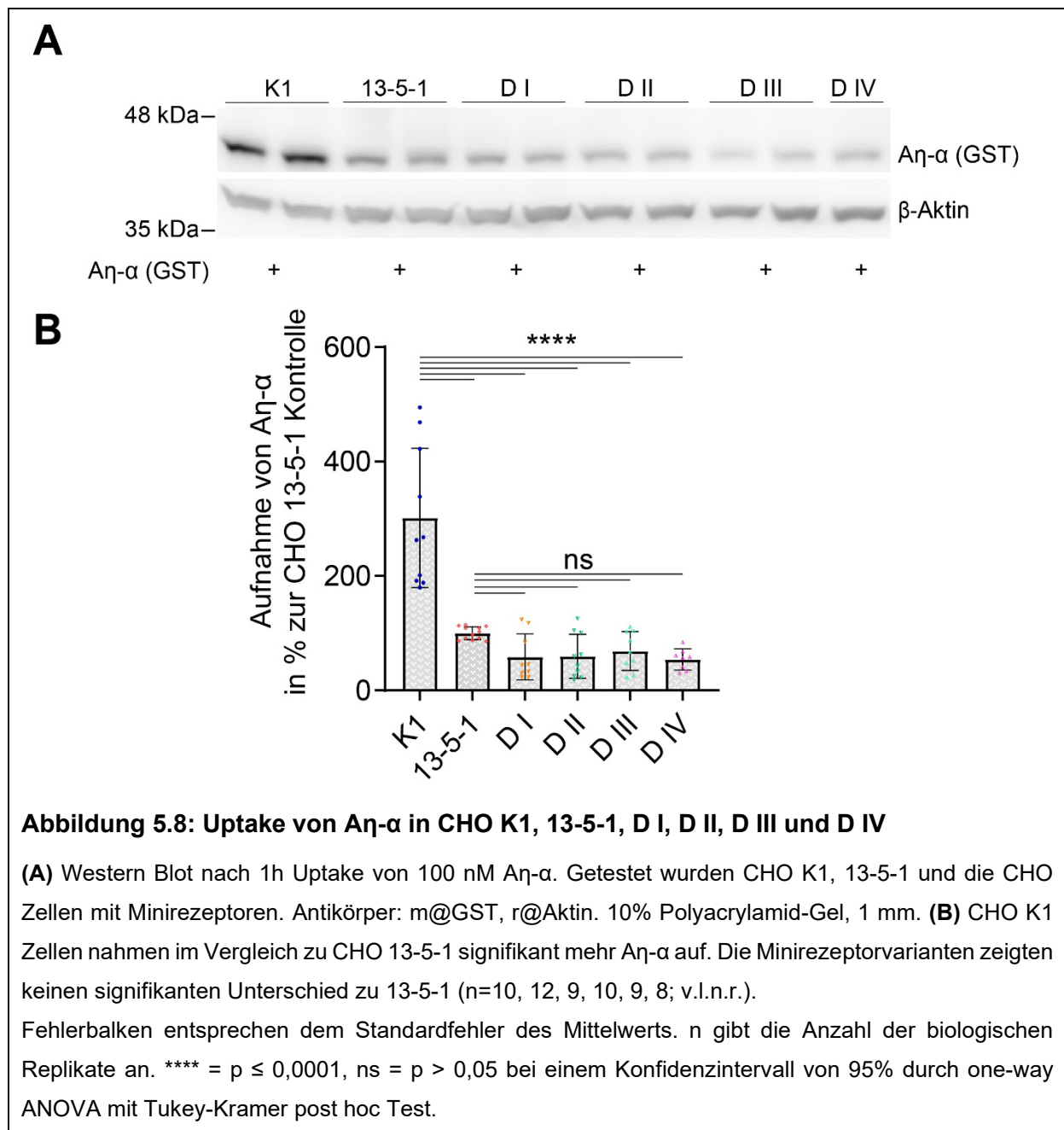
Nach Behandlung mit m@GST Antikörpern stellten sich bei allen Zelllinien Banden über 42 kDa dar. Die Banden bei CHO K1 waren dabei deutlich intensiver. Zur Ladekontrolle wurden die Blots mit r@Aktin behandelt. Die Bandenintensität war bei allen Proben, jeweils über 42 kDa, homogen.

Abbildung 5.7 B zeigt einen Western Blot des Versuchs mit CHO 13-5-1 + LRP1 und 13-5-1. Es zeigten sich, nach Behandlung mit m@GST, Banden unter 48 kDa. Die Bandenintensität war bei CHO 13-5-1 + LRP1 erhöht. Nach Behandlung mit r@Aktin zeigten sich vergleichbar starke Bandenintensitäten über 42 kDa in allen Proben. Die statistische Auswertung (C) ergab, dass CHO K1 Zellen etwa drei Mal mehr A η - α aufnahmen als CHO 13-5-1 Zellen. Dabei war der Unterschied bei einem Niveau von $p \leq 0,0001$ signifikant. Die CHO 13-5-1 + LRP1 Zellen nahmen bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,001$ ebenfalls mehr A η - α auf als CHO 13-5-1 Zellen.



5.2.2 Endozytose via LRP1 Rezeptoren mit einer Ligandenbindenden Domäne

Nachdem in 5.2.1 festgestellt werden konnte, dass die Endozytose von A η - α in CHO Zellen abhängig von LRP1 ist, stellte sich die Frage, welche Domänen des Rezeptors die Bindung mit dem Peptid eingingen. Es wurde daher untersucht, ob die Minirezeptorvarianten das Peptid aufnehmen. Getestet wurden daher die Zelllinien CHO D I, D II, D III und D IV (Abbildung 3.1) sowie CHO K1 und 13-5-1. Alle Zellen wurden für 1h mit 100 nM A η - α , entsprechend 4.1.2.3.1, behandelt.



Ergebnisse

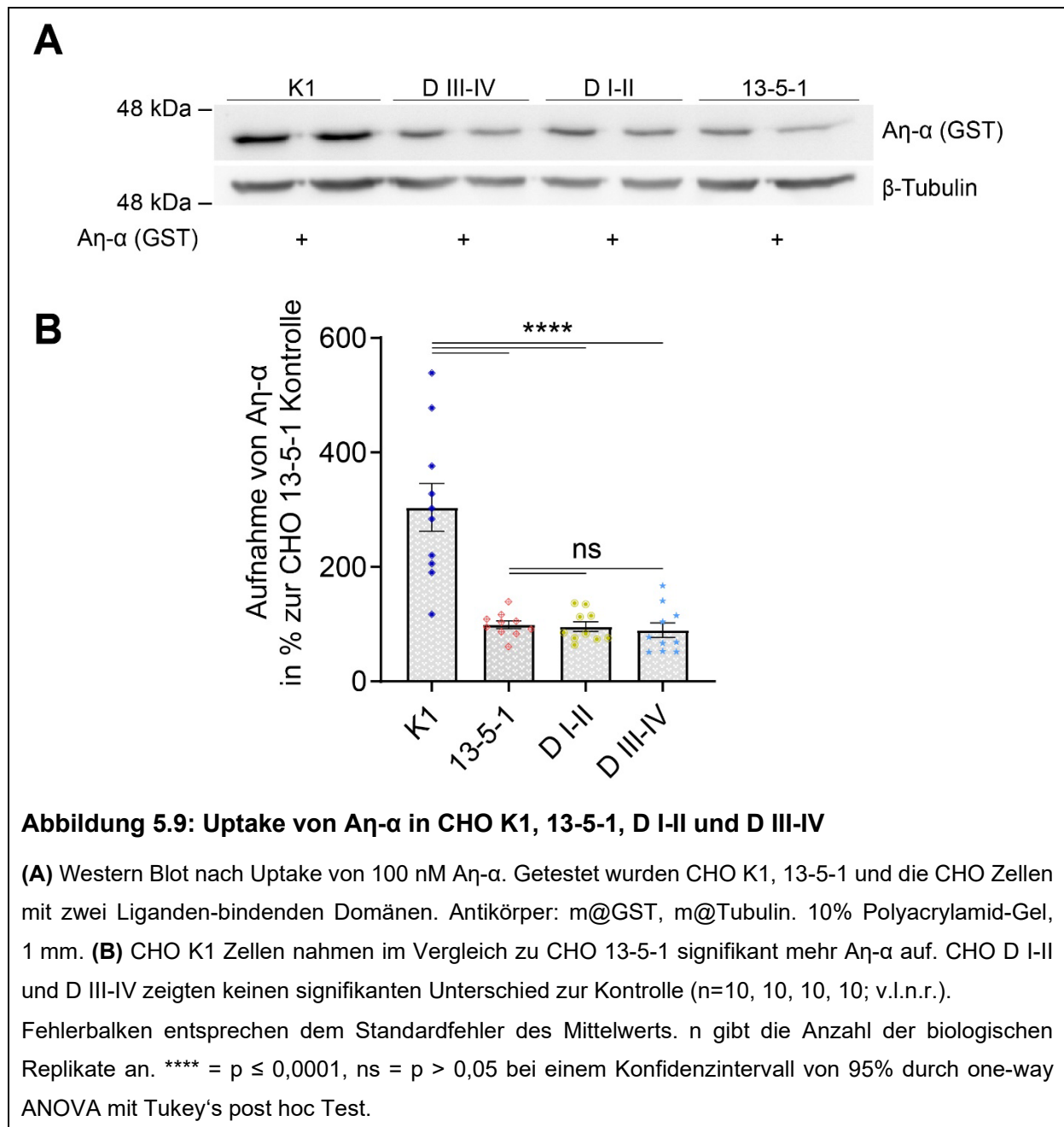
Abbildung 5.8 A zeigt einen Western Blot der Versuchsreihe. Die Behandlung mit m@GST Antikörpern erbrachte bei allen Zelllinien Banden unter 48 kDa. Nach Behandlung mit r@Aktin zeigten alle Proben vergleichbare Banden über 35 kDa. Verglichen wurde mit CHO 13-5-1. CHO K1 wies eine erhöhte Bandenintensität auf, während die Bandenintensität bei den Minirezeptorvarianten der von CHO 13-5-1 entsprach. Die statistische Auswertung (B) der Versuche attestierte CHO K1 eine höhere Aufnahme als CHO 13-5-1. Der Unterschied war dabei signifikant ($p \leq 0,0001$). Zwischen Minirezeptorvarianten und CHO 13-5-1 zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

5.2.3 Endozytose via LRP1 Rezeptoren mit zwei Liganden-bindenden Domänen

Um herauszufinden, ob die Kombination aus zwei Liganden-bindenden Domänen des LRP1 Rezeptors nötig ist, um die $A\eta$ - α Aufnahme in CHO Zellen zu vermitteln, wurden die zuvor erstellten, stabilen Zelllinien CHO D I-II und CHO D III-IV verwendet (5.1). Verwendet wurde $A\eta$ - α in einer Konzentration von 100 nM. Die Uptake-Zeit betrug 1 h. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.9 dargestellt. Die Lysate wurden im Doppelansatz aufgetragen. Zu sehen ist ein Western Blot des Versuchs nach Behandlung mit m@GST und m@Tubulin (A).

In allen Spuren war eine Bande unter 48 kDa ($A\eta$ - α) bzw. über 48 kDa (β -Tubulin) zu sehen. Die höchste Bandenintensität ist bei CHO K1 für $A\eta$ - α zu sehen. Die statistische Auswertung der Versuche (B) bestätigte dies: CHO K1 Zellen nahmen bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,0001$ mehr $A\eta$ - α auf als die anderen Zelllinien. Zwischen CHO 13-5-1, D I-II und D III-IV ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

Ergebnisse



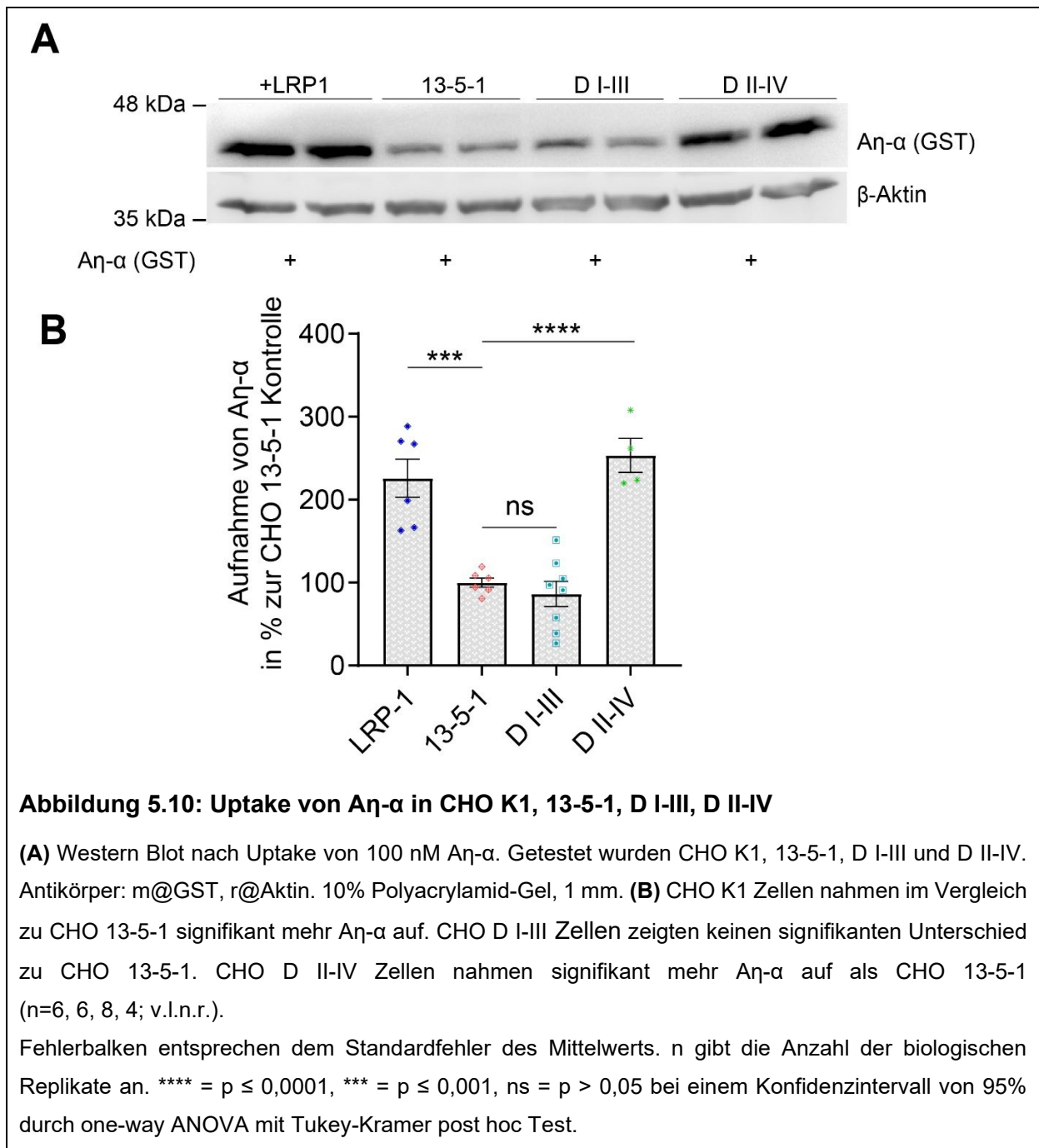
5.2.4 Endozytose via LRP1 Rezeptoren mit drei Liganden-bindenden Domänen

Da auch zwei Domänen des LRP1 Rezeptors nicht die Endozytose von A η - α auszulösen vermochten, wurde die Kombination aus drei Liganden-bindenden Domänen auf ihr Uptake-Verhalten hin untersucht. Dafür wurden die erstellten Zelllinien CHO D I-III und D II-IV (5.1) verwendet. Dabei wurde das Aufnahmeverhalten mit dem von CHO K1 und 13-5-1 verglichen. Verwendet wurde eine 100 nM Konzentration von A η - α bei 1 h Uptake-Zeit entsprechend 4.1.2.3.1.

In Abbildung 5.10 A ist ein repräsentativer Western Blot der Versuchsreihe abgebildet. Behandelt wurde der Blot mit m@GST sowie r@Aktin Antikörpern. Erstere fanden zur Bindung mehr Epitope bei den Lysaten von CHO 13-5-1 + LRP1 sowie D II-IV und führten zu einer insgesamt höheren Bandenintensität als bei CHO 13-5-1 und D I-III. Die Banden waren unter 48 kDa lokalisiert. Die β -Aktin Banden zeigten in allen Spuren eine vergleichbare Intensität bei über 35 kDa.

Die Objektivierung der Ergebnisse (B) ergab bei CHO 13-5-1 + LRP1 Zellen eine höhere Aufnahme von A η - α als CHO 13-5-1. Das Ergebnis war zu einem Niveau von $p \leq 0,001$ signifikant. Zwischen CHO 13-5-1 und D I-III Zellen ergab sich kein signifikanter Unterschied. CHO D II-IV Zellen nahmen mehr A η - α auf als CHO 13-5-1. Der Unterschied war dabei signifikant ($p \leq 0,0001$).

Letzteres bedeutet, dass die Domänen II-IV von LRP1 die Bindung mit A η - α eingehen, woraufhin es zur Endozytose des Peptids kommt.



6 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von A η - α in CHO-Zellen LRP1-abhängig ist (Vgl. 5.2.1). Um die mechanistischen Hintergründe der Liganden-Bindung zu klären, wurden rekombinant LRP1-Varianten erstellt, die eine unterschiedliche Anzahl an Liganden-bindenden Domänen der α -Kette des Proteins enthielten. Dafür wurden Konstrukte verwendet, die eine zwei oder drei Liganden-bindende Domänen enthielten. Konstrukte mit drei Liganden-bindenden Domänen wurden zuvor kloniert (Vgl. 5.1.1). Zur Erstellung stabiler Zelllinien wurden die Konstrukte mittels viraler Transfektion in LRP1-defiziente CHO 13-5-1 Zellen integriert (Vgl. 4.1.2). Diese konnten erfolgreich auf Funktionalität überprüft werden (Vgl. 5.1.3). Folgend konnte in Uptake-Analysen des Peptids A η - α demonstriert werden, dass drei Liganden-bindende Domänen von LRP1 die Endozytose des Peptids auszulösen vermochten, nicht jedoch die Varianten mit einer oder zwei Liganden-bindenden Domänen.

Im Folgenden wurden die Methoden und Ergebnisse dieser Arbeit in den Kontext des wissenschaftlichen Kenntnisstands gesetzt.

6.1 Artifizielle LRP1 Varianten lösen die rezeptorvermittelte-Endozytose von A β aus

Die neu erstellten Zelllinien wurden lysiert und die Proteine via Western Blot Technik einer spezifischen Antikörperbehandlung zugeführt. Prinzipiell zeigten sich dabei jeweils die erwarteten Banden. Bei D I-III jedoch zeigte sich nach transienter wie nach stabiler Transfektion nur LRP1 insgesamt, nicht jedoch die β -Kette. Mögliche Ursachen werden in 6.3.3 diskutiert. Ein spezifischer Nachweis über die Funktionalität der Rezeptor-Varianten sollte daher nicht ausbleiben.

Um die Funktionalität ihrer LRP1 Minirezeptoren zu demonstrieren, initiierten Mikhailenko et al. die Bindung eines Antikörpers an die β -Kette von LRP1. Diese Interaktion löste daraufhin die Endozytose der Rezeptor-Varianten aus, wobei die Liganden-bindenden Domänen auf diese Weise nicht getestet wurden und streng genommen nur eine funktionierende β -Kette bewiesen werden konnte. Daher wurde sich im Rahmen dieser Arbeit gegen diese Methode entschieden.

Die Funktionalität wurde stattdessen mit einem weiteren Endozytose-Experiment demonstriert (Vgl. 5.1.3). I¹²⁵ wird häufig für die Markierung von Molekülen verwendet.

Diskussion

So wurde es bereits zur Analyse der Interaktion von LRP1 und α 2M verwendet (Pflanzner et al. 2011). Auch A β -I¹²⁵ wurde für Transport- (Storck et al. 2016) und Uptake-Experimente (Storck et al. 2018) verwendet. Da hier die Aufnahme von A β in Zellen demonstriert werden konnte, sollte die Reproduzierbarkeit mit den in dieser Arbeit erstellten Zelllinien gezeigt werden, um deren Funktionsfähigkeit zu beweisen.

Wie in Abbildung 5.6 A ersichtlich, zeigten die Zelllinien CHO D I-II bzw. CHO D III-IV eine signifikant höhere Aufnahme als CHO 13-5-1 Zellen. Gleiches gilt für die Zelllinien CHO D I-III und CHO D II-IV, die jeweils drei Liganden-bindende Domänen enthielten (Abbildung 5.6 B). Alle LRP1-Varianten enthielten entweder Domäne II oder Domäne IV und damit mindestens eine für die Bindung von A β nötige Domäne. Die Konstrukte lösten die Endozytose aus und konnten dementsprechend weiterverwendet werden. Neben dem funktionellen Nachweis der neu erstellten Zelllinien konnte somit gezeigt werden, dass LRP1 A β binden und endozytieren kann, wie auch von Storck et al. vorbeschrieben. Aus den Ergebnissen geht ebenfalls hervor, dass LRP1 nicht als Gesamtprotein für die Endozytose von A β nötig ist, sondern auch einzelne Bestandteile ausreichen (Fuentealba et al. 2010).

Da die Experimente A und B mit unterschiedlich stark strahlenden Chargen und Fraktionen des Peptids durchgeführt wurden, unterschieden sich die CPM zwischen A und B. Dies ist ein prinzipieller Kritikpunkt an der Arbeit mit strahlenden Substanzen. Neben dem enormen Sicherheitsaufwand bindet I¹²⁵ Tyrosin immer, Histidin jedoch nicht zuverlässig (Vgl. 8.2.1). Daraus resultieren ungleich mit I¹²⁵ beladene Moleküle. Es fanden zunächst einige Test-Wiederholungen statt, bei denen verschiedene Fraktionen verwendet wurden. Verwendet wurden schließlich jene, die die geringsten Peaks in der Strahlungsintensität aufwiesen. Diese Fraktionen erwiesen sich für Uptake-Versuche als optimal. Stärker strahlende Fraktionen wurden nicht vergleichbar gut aufgenommen bzw. gebunden. Angegeben wurden die Peaks der Chargen von der Firma Phoenix (Tabelle 5) bei Auslieferung. Die Verwendung geringer, physiologischer Konzentrationen war ein klarer Vorteil dieser Methode und erlaubte die Beobachtung kleinster Unterschiede. Ein weiterer Vorteil bestand darin, dass die Auswertung am selben Tag erfolgen konnte.

6.2 LRP1^{FL} in CHO 13-5-1 Zellen

Im Falle eines positiven Ergebnisses der A η - α Aufnahme in CHO K1 Zellen sollte gezeigt werden können, dass sich der Effekt in anderen Zellen reproduzieren lässt. Da es sich bei CHO K1 und CHO 13-5-1 um verschiedene Zelllinien handelt, drängte es sich im Verlauf auf, eine weitere, besser vergleichbare Positivkontrolle zu generieren. Bereits zuvor wurde eine Positivkontrolle in LRP1-defizienten CHO Zellen etabliert (Fouët et al. 2020). Dabei wurden die Zellen via Lipofectamine 2000 transfiziert und anschließend selektioniert. In dieser Arbeit wurden CHO 13-5-1 Zellen mit LRP1^{FL} stabil transduziert.

Wie in 5.1 beschrieben, wurden zunächst die viralen Partikel hergestellt. Mit einem Titer von $2,1 \cdot 10^5$ CFU/ml lag die Potenz des Virus im für Retroviren erwartbaren Bereich. Die Infektion der Zielzellen CHO 13-5-1 war dementsprechend erfolgreich. In Abbildung 5.5 A sind CHO K1 und 13-5-1 + LRP1 auf einem Western Blot abgebildet. Für CHO 13-5-1 + LRP1 ist bei einer prominenteren Bande über dem oberen Marker-Ende (LRP1) eine schwächere β -Kette bei ~ 85 kDa zu erkennen. Die Bandenhöhen stimmen jedoch mit CHO K1 überein. Den unterschiedlichen Bandenintensitäten sollte dabei nicht zu viel Bedeutung beigemessen werden, da zwei verschiedene Zelllinien dargestellt wurden. Bei gleichzeitig schwächerer β -Aktin Bande ist jedoch von insgesamt starker Überexpression von LRP1 in der neuen Zelllinie auszugehen.

6.2.1 LRP1 bindet A η - α und vermittelt die Aufnahme in CHO-Zellen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LRP1 sowohl die Bindung als auch die Aufnahme des APP-Fragments A η - α in CHO-Zellen einleitet (Vgl. 5.2.1).

Dafür wurden sowohl CHO K1 als auch CHO 13-5-1 + LRP1 Zellen mit CHO 13-5-1 verglichen. Die in Abbildung 5.7 dargestellten Western Blots zeigen deutlich dichtere Banden für A η - α bei den LRP1-exprimierenden Zelllinien. CHO 13-5-1 Zellen zeigen jedoch auch schwache Banden und somit die Aufnahme des APP-Fragments. Dies ist am ehesten dadurch zu erklären, dass neben der durch LRP1 initiierten rezeptorvermittelten Endozytose weitere Mechanismen die Aufnahme des Fragments in die Zelle auslösen.

Dies ist auch bei der Endozytose von A β der Fall (Storck et al. 2016). Mit einer bis zu dreifach erhöhten Aufnahme von A η - α in vitro scheint LRP1 jedoch einen besonderen Stellenwert im Stoffwechsel des Fragments zu haben.

6.3 Artificielle LRP1-Varianten in CHO 13-5-1-Zellen

6.3.1 LRP1 Minirezeptoren mit einer Liganden-bindenden Domäne lösen nicht die rezeptorvermittelte Endozytose von A η - α aus

LRP1 bindet mit seinen insgesamt vier Liganden-bindenden Domänen eine Vielzahl von Liganden. Während für Domäne I bislang überhaupt keine Liganden vorbeschrieben sind und sie daher oft als inkomplette Domäne beschrieben wird (Croy et al. 2003), warten insbesondere Domäne II und IV, die auch die Bindung mit A β eingehen (Sagare et al. 2013; Storck et al. 2016), mit einer langen Liste an Liganden auf (Herz und Strickland 2001). Es gibt ein großes wissenschaftliches Interesse an den mechanistischen Hintergründen der Liganden-Bindung an LRP1. So ergeben sich neue, klinisch relevante Fragestellungen aus der genauen Kenntnis der zuständigen Liganden-bindenden Domäne des Rezeptors.

Um artificielle LRP1-Varianten zu untersuchen, wurden aus CHO 13-5-1 entsprechende Zellmodelle abgeleitet. Minirezeptor-Zellen mit jeweils einer Liganden-bindenden Domäne des Rezeptors wurden bereits im Rahmen früherer Untersuchungen von Rabiej et al. 2016 verwendet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Abbildung 1.1). Ein Western Blot der Zellen ist in Abbildung 3.1 abgebildet. Die β -Kette ist teilweise schwer auszumachen oder fehlt in der Darstellung im Blot komplett. Darauf wird in 6.3.3 genauer eingegangen.

Nachdem A η - α als Ligand für LRP1 identifiziert werden konnte, sollte in Endozytose-Experimenten (Vgl. 4.1.2.3.1) geklärt werden, welche Liganden-bindende Domäne des Rezeptors die Bindung mit dem Fragment eingeht.

Da A η - α einen Teil der Sequenz von A β beinhaltet (Vgl. 8.2.1) lag die Vermutung nahe, A η - α könnte zur Bindung an LRP1 ebenfalls die Domänen II oder IV benötigen.

In 5.2.2 wurden die CHO Zellen mit membranständigen Minirezeptoren auf ihr Aufnahmeverhalten von A η - α hin untersucht. Keine der Zelllinien nahm mehr A η - α auf als die LRP1-defizienten CHO 13-5-1 Zellen, während CHO K1 Zellen ein signifikantes Aufnahmeverhalten des APP-Fragments zeigten.

Die Ergebnisse konnten deutlich zeigen, dass einzelne Liganden-bindende Domänen des Rezeptors nicht die Endozytose von A η - α auslösen können. Es wurde daher davon ausgegangen, dass mehr als eine Liganden-bindende Domäne, bzw. deren Kombination, bedeutsam für die Aufnahme ist.

Diskussion

Ein Gedankenspiel erlauben die Ergebnisse von Obermoeller-McCormick et al. 2001. Während Willnow et al. 1994 demonstrieren konnten, dass unkomplexiertes tPA (tissue Plasminogen activator) die Liganden-bindende Domäne II bindet, konnten Obermoeller-McCormick et al. dieses Ergebnis nicht reproduzieren. Als Ursache wollen die Wissenschaftler Unterschiede in den Designs der Minirezeptoren ausgemacht haben. Im Gegensatz zum Domäne II Konstrukt von Obermoeller-McCormick et al., enthielt die Variante von Willnow et al. einige EGF-ähnliche Regionen. Dies deutet daraufhin, dass nicht nur die isolierten Liganden-bindenden Domänen die Bindung mit den Liganden auslösen, sondern das Zusammenspiel der verschiedenen Abschnitte der α -Kette von Bedeutung sein könnte (Vgl. Abbildung 2.4).

6.3.2 LRP1 Minirezeptoren mit zwei Liganden-bindenden Domäne lösen nicht die rezeptorvermittelte Endozytose von $A\eta$ - α aus

Während die meisten Liganden eine der Liganden-bindenden Domänen benötigen, um via rezeptorvermittelter Endozytose aufgenommen zu werden, konnte dies für $A\eta$ - α nicht gezeigt werden (Vgl. 5.2.2; 6.3.1).

α 2M, ein bekannter Ligand für LRP1, stellt auf mehrere Weisen einen Sonderfall dar. Wie bereits erwähnt, konnte zwar die Bindung des Moleküls an Domänen II und IV demonstriert werden, die Endozytose jedoch nicht. In späteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die rezeptorvermittelte-Endozytose von α 2M nur durch die Kombination aus zwei Liganden-bindenden Domänen erfolgen kann. Die Kombination aus Domäne I und den ersten drei CF-Regionen der Domäne II löste die Endozytose des Moleküls aus (Mikhailenko et al. 2001), woraus zwei Lehren gezogen werden müssen: Domäne I darf bei mechanistischen Analysen der Liganden-Bindung nicht vernachlässigt werden und die Liganden-Bindung kann abhängig von der Kombination mehrerer Domänen bzw. ihrer Bestandteile sein.

In Anlehnung an diese Erkenntnisse und im Rahmen anderer Untersuchungen der AG Pietrzik wurden bereits Konstrukte generiert, die zwei Liganden-bindende Domänen von LRP1 enthalten und, ähnlich den Minirezeptoren, mit einer Liganden-bindenden Domäne direkt an die β -Kette assoziiert sind (Vgl. Abbildung 3.1). Dafür wurden CHO 13-5-1 Zellen mit den Konstrukten D I-II bzw. D III-IV (3.1.3) transduziert. Die hergestellten Viren wurden auf ihre Potenz untersucht und wiesen für Retroviren typische Titer auf (Vgl. Tabelle 26). Die Transduktion der Zielzellen

Diskussion

CHO 13-5-1 wurde in 5.1.2 beschrieben. Abbildung 5.5 B zeigt einen Western Blot der erstellten Zelllinien nach Einzelklon-Selektion und Behandlung mit r@LRP1 (1704) Antikörpern. Gut zu erkennen ist dabei jeweils die β -Kette, an die der Antikörper bindet. In der Zusammenschau mit den oberen Banden, die die β - und α -Kette repräsentieren, zeigte sich die Transduktion erfolgreich. Der stärkeren Bandenintensität des D III-IV Proteins wurde keine größere Bedeutung beigemessen, da unterschiedliche Proteine vorlagen, welche unterschiedlichen Wegen der Prozessierung unterliegen konnten. Bemerkenswert ist dabei jedoch, dass die virale Potenz hier geringer war als beim D I-II Konstrukt. Ein höherer Titer geht folglich nicht zwangsläufig mit höheren Expressionsraten einher.

Die mit den erstellten Zelllinien durchgeführten Endozytose-Experimente (4.1.2.3.1) wurden in 5.2.3 beschrieben. In Abbildung 5.9 A ist ein repräsentativer Western Blot der Versuche abgebildet. Auch die Kombination zweier Domänen konnte die Bindung bzw. Endozytose von $A\eta$ - α nicht auslösen, während CHO K1 das Fragment weiter aufnahm. Die Zellen nahmen $A\eta$ - α zwar auf, jedoch nur in einem mit CHO 13-5-1 Zellen vergleichbaren Ausmaß, was auf LRP1-unabhängigen Mechanismen beruht.

6.3.3 Drei Liganden-bindende Domänen von LRP1 ermöglichen die Endozytose von $A\eta$ - α

Die Wissenschaftler um Obermoeller-McCormick et al. verwendeten membranständige LRP1-Varianten, die jeweils eine der Liganden-bindenden Domänen der α -Kette exprimierten. Dabei banden jeweils die Domänen II, III und IV das Chaperon RAP. Diese Domänen sind demnach für die Liganden-Bindung zuständig. Das Zusammenspiel der Domänen war für die Aufnahme jedoch nicht ausschlaggebend. Anders verhält es sich bei tPA: Das Molekül wird jeweils über die Liganden-bindenden Domänen II und IV gebunden. In komplexierter Form (tPA:PAI-1) soll jedoch insbesondere das Zusammenspiel mehrerer Domänen der α -Kette nötig sein (Obermoeller-McCormick et al. 2001). Auch die Forscher um Marakasova et al. untersuchten drei Liganden-bindende Domänen, jedoch auch nur einzeln und nicht im Zusammenspiel. Da die zelluläre Aufnahme von $A\eta$ - α weder durch eine noch durch zwei Liganden-bindende Domänen erfolgte, wurde so auch die Kombination aus drei Domänen in Betracht gezogen.

Diskussion

Die Konstrukte (Vgl. 5.1) lagen noch nicht vor, daher erfolgte zunächst die Klonierung (Vgl. 5.1.1). Der Nachweis über die erfolgreiche Klonierung wurde in zwei Stufen erbracht. Die Banden im Agarosegel nach Restriktionsverdau erbrachten die erwartbaren Bandenhöhen (D I-III: 5.680 bp, 11.412 bp; D II-IV: 6033 bp, 11.241 bp). Eine solch exakte Ablesung auf Agarosegelen ist zwar nicht möglich, jedoch ließen die Banden näherungsweise auf die korrekte Höhe schließen

(Vgl. Abbildung 5.3 A, Abbildung 5.4 A). Ein spezifischer Nachweis wurde über die transiente Transfektion der Plasmide in CHO 13-5-1 Zellen erbracht (Vgl. Abbildung 5.3 B, Abbildung 5.4 B). Der r@LRP1 (1704) Antikörper, welcher gegen den C-Terminus gerichtet ist und somit die β -Kette des Proteins bindet, zeigte die spezifische Bindung im Western Blot. Bei D I-III ist die β -Kette nicht gelöst vom Gesamtprotein darstellbar, bei D II-IV beides.

Gründe hierfür liegen im Aufbau der erstellten Konstrukte (Vgl. Abbildung 1.1). Während D II-IV nur um die Liganden-bindende Domäne I beschnitten ist, fehlt bei D I-III die Domäne IV, welche beim Gesamtprotein die β -Kette mit der restlichen α -Kette (Vgl. Abbildung 2.4) verbindet. Eine Veränderung der sterischen Konstellation des neu generierten Proteins kann nicht ausgeschlossen werden. So ist denkbar, dass die Protease Furin die Bindungsstelle nicht mehr erkennen und prozessieren kann. Dadurch wäre die Liganden-Bindung resp. Endozytose beeinträchtigt (Willnow et al. 1996). Die Funktionalität der Konstrukte wurde jedoch in 5.1.3 demonstriert. Wahrscheinlicher ist daher, dass die Epitope für den Antikörper r@LRP1 (1704) verändert sind und dieser nicht mehr entsprechend binden kann.

Die Erstellung stabiler Zelllinien erfolgte schließlich, um einen reibungslosen Ablauf der darauffolgenden Endozytose-Experimente zu gewährleisten. Für Retroviren typische Titer sind $\leq 10^7$ CFU/ml. Auch die Titer von LRP1 D I-III und LRP1 D II-IV bewegten sich in diesem Bereich (Vgl. Tabelle 26). Die Transduktion der Zielzellen CHO 13-5-1 erfolgte problemlos und wurde durch Antikörperbehandlung mit r@LRP1 (1704) nachgewiesen (Abbildung 5.5). Während bei D I-III, wie bei transient transfizierten CHO 13-5-1 Zellen nur das gesamte Protein, nicht jedoch die β -Kette dargestellt wurde, zeigte sich diese bei D II-IV besonders prominent. Beiden Spuren gemein war zusätzliche, unspezifische Bindung, die sich jedoch gut von den prominenteren Banden abgrenzen ließ.

Diskussion

Die durchgeführten Endozytose-Experimente konnten aufdecken, dass drei Liganden-bindende Domänen von LRP1 die Aufnahme von A η - α auslösen. Dabei konnte die Variante D I-III nicht über das Aufnahme-Niveau von CHO 13-5-1 hinaus gehen (Vgl. 5.2.4). Das negative Ergebnis der Aufnahme-Versuche via D I-III erlaubte es, auf die Untersuchung von Varianten, die die Domänen II und III exprimieren, zu verzichten. D II-IV zeigte eine mit der Positivkontrolle vergleichbare Aufnahme des APP-Fragments.

6.4 Die Rolle der Liganden-bindenden Domänen bei der Interaktion zwischen LRP1 und A η - α

Wie bereits erwähnt, konnten weder LRP1 Varianten mit einer noch mit zwei Liganden-bindenden Domänen die Aufnahme von A η - α in CHO-Zellen auslösen. Domäne I spielt scheinbar ebenfalls keine Rolle, da D I-III mit drei Liganden-bindenden Domänen die Aufnahme des Peptids nicht auslösen konnte. Es wurden jedoch bereits die Ergebnisse von Mikhailenko et al. erläutert, die zeigen konnten, dass Domäne I in Kombination mit einzelnen EGF-Regionen der Domäne II die Aufnahme von α 2M ermöglichte. Die Domäne könnte außerdem für die korrekte Faltung des Proteins notwendig sein. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit zu Urteilen spielt Domäne I jedoch keine Rolle bei der Aufnahme von A η - α , da dies nur durch die Kombination der Domänen II, III und IV möglich war.

Obermoeller-McCormick et al. postulierten, dass Domäne III bisher nur mit RAP Interaktion zeigte, die Domäne möglicherweise nur als Ergänzung zu den eigentlich bindenden Domänen II und IV zu betrachten sei und deren Spektrum erweitere.

Diese Überlegung wäre auch für die Interaktion mit A η - α möglich, da Domäne II und IV durch Domäne III verbunden werden, wobei die Rezeptor-Liganden-Bindung hier nicht explizit untersucht wurde. Somit könnte die Bindung an Domäne II und IV essenziell sein, während Domäne III nur die benötigte Distanz ermöglicht. Plausibel wird dieser Gedanke dadurch, dass fast alle Liganden von LRP1 die Bindung über Domäne II und IV eingehen (Neels et al. 1999).

Auszuschließen ist darüber hinaus allerdings auch nicht, dass die Wiederholung aller Aufnahme-Versuche mit unterschiedlich konstruierten Varianten zu anderen Ergebnissen kommen könnte. Wie bereits beschrieben, haben Wissenschaftler

Diskussion

unabhängig voneinander die Aufnahme von tPA via LRP1 untersucht und kamen dabei zu unterschiedlichen Ergebnissen. Auch für die A η - α -Aufnahme könnten unterschiedlich konzipierte LRP1-Varianten eine Rolle spielen (Obermoeller-McCormick et al. 2001; Willnow et al. 1994).

6.5 Einordnung der Methodik

Bei den durchgeführten Experimenten wurden CHO-Zellen verwendet, welche sich durch eine hohe Widerstandsfähigkeit auszeichnen. Serumfreies Medium, wie es für Uptake-Versuche nötig ist, schadet den Zellen nicht. Darüber hinaus lassen sich diese Zellen leicht transfizieren (Vgl. 6.3). Die post-translationalen Modifizierungen der Zellen ähneln denen in Menschen stark, weshalb von einer höheren Vergleichbarkeit ausgegangen werden konnte (Gupta et al. 2021). Um eine Negativkontrolle für alle LRP1-abhängigen Experimente zu haben, wäre eine andere Option ein genetischer KO bzw. ein Gen-Silencing (Gen-Stillegung via siRNA) von Wildtyp-Zellen gewesen. Diese Methoden sind jedoch oft folgenreich für die Funktionsfähigkeit der Zellen (Dedieu et al. 2008) und daher für die Verwendung in Folgeversuchen der CHO 13-5-1 Zelllinie unterlegen (FitzGerald et al. 1995). Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass CHO K1 und CHO 13-5-1 Zellen sinnvolle Modelle zur Untersuchung LRP1-abhängiger Vorgänge darstellen (Canuel et al. 2013; Salicioni et al. 2002).

Entsprechend 4.1.2.3.1 wurden zur Beantwortung der Hauptfragestellung dieser Arbeit Endozytose-Experimente durchgeführt und mittels Immunoblotting abgeschlossen. Die Normierung unabhängiger Experimente auf Kontrollproben und konstante Zellbestandteile erlaubte die Vergleichbarkeit dieser gut objektivierbaren Methode. Anfällig war die Methode prinzipiell für falsch-negative Ergebnisse, welche durch falsch gewählte Antikörperkonzentrationen oder Bedingungen bei SDS-PAGE bzw. Immunoblotting zustande kommen können.

Im Gegensatz zu den hier verwendeten, membranständigen Varianten (Rabiej et al. 2016; Obermoeller et al. 1998; Bu und Rennke 1996) wurde in früheren Arbeiten häufig auf lösliche Minirezeptoren zurückgegriffen. Dabei sind die Ligandenbindenden Domänen vom C-Terminus des Proteins gelöst. In ELISA-Assays konnte daraufhin die Bindung gemessen werden (Ranganathan et al. 2011; Fouët et al. 2020). Während dieses weniger zeitintensive Vorgehen zielführender die Bindung

Diskussion

von Liganden zu klären vermochte, wurde die Zellaufnahme dabei nicht untersucht. So konnte die Bindung der einzelnen Domänen II bzw. IV an $\alpha 2M$ auf diese Weise zwar gezeigt werden. Jedoch wurde bei Analysen mit membranständigen Varianten der einzelnen Domänen $\alpha 2M$ weder gebunden noch endozytiert (Mikhailenko et al. 2001).

Die Erstellung retroviraler Partikel erfolgte zur Erstellung möglichst stabiler Zellmodelle. Die Viren sollten auch für zukünftige Fragestellungen wiederverwendet werden können. Durch Pseudotypisierung mit VSVG wurde das Spektrum der transfizierbaren Zellen erweitert (Meyer et al. 2017). Transiente Transfektionen scheitern darüber hinaus häufig an primären Zellen (Chong et al. 2021).

Während Adenoviren sich zur Transfektion nicht-teilender Zellen eignen, ist das Verfahren mittels der hier erstellten Retroviren nur bei sich teilenden Zellen möglich (Kim und Eberwine 2010). Die Transfektion ausdifferenzierter Neuronen mit den erstellten Viren könnte also scheitern.

Eine weitere Schwäche des Vorgehens liegt am Prinzip selbst. Durch die Manipulation am Zielgenom kann es zur unerwünschten Mutagenese kommen.

Die Klonierung der benötigten Konstrukte erfolgte in etablierter PCR-Technik (Fouët et al. 2020). Die Größe der Fragmente (D I-III 11.367 bp, D II-IV 11.304 bp, pLBCX Vektor (5.978 bp, Vgl. 8.3.1) sowie der erhöhte GC-Gehalt der verwendeten Primer (Vgl. Tabelle 10, Tabelle 11) werden i.d.R. als Prädiktoren für frustrane Klonierungen aufgeführt (Zhang et al. 2021). Daher mussten PCR-Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen, Enzymen und Salzen getestet werden, bis die entsprechenden Optima eruiert werden konnten (Vgl. 4.2.2.2).

6.6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben zeigen können, dass A η - α in Interaktion mit dem Protein LRP1 steht. Dabei ist die Bindung und Aufnahme von A η - α abhängig vom Zusammenspiel der Liganden-bindenden Domänen II, III und IV. Diese Ergebnisse konnten in CHO-Zellen demonstriert werden. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit sollten auch weitere Zelllinien/ Zelltypen getestet werden. Die Verwendung der im Rahmen dieser Arbeit generierten Viren gestattet die Testung an den gleichen LRP1-Konstrukten (Vgl.5.1).

Um die Theorie zu überprüfen, Domäne III sei nur Platzhalter zwischen Domäne II und IV (Vgl. 6.4), sollten Domäne II-IV Konstrukte generiert werden, deren Domäne III funktionsunfähig gemacht wurde. Sollte A η - α trotzdem endozytiert werden wäre damit bestätigt, dass Domäne III nur die nötige Distanz zwischen den eigentlich bindenden Domänen II und IV schafft. Alternativ könnten lösliche LRP1 Minirezeptoren eingesetzt werden, um die Bindung an A η - α zu untersuchen. Dadurch könnte aufgedeckt werden, ob Domäne III an das Peptid binden kann.

Es sollte außerdem überprüft werden, ob unterschiedlich designte LRP1-Varianten zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. So konnten bereits Unterschiede bei der Aufnahme von α 2M (Vgl. 6.3.2) gezeigt werden, wenn flankierende EGF-Regionen belassen oder entfernt wurden (Mikhailenko et al. 2001).

Die Bindung und Endozytose von A β via LRP1 erfolgt durch Bindung an die Liganden-bindenden Domänen II oder IV. Da diese Domänen auch durch die einfache Bindung von A η - α an den Rezeptor genutzt werden, stellt sich die Frage, ob es ein Konkurrenzverhalten zwischen den beiden Peptiden gibt. Um dies zu klären, wurden parallel zu dieser Arbeit Versuche durchgeführt, die den Transport von A β über die BHS in An- und Abwesenheit von A η - α beobachteten. Tatsächlich konnte die Hypothese bestätigt werden: A η - α beeinträchtigt die Clearance von A β im gleichen Maße wie eine Antikörper-Blockierung der Liganden-bindenden Domänen II und IV. Die Ergebnisse konnten in vivo reproduziert werden. Mäuse mit einer erhöhten η -Sekretase-Aktivität, resp. höheren A η - α Leveln, zeigten zudem eine beeinträchtigte A β -Clearance.

Diese Ergebnisse lassen weitere Schlussfolgerungen zu. Die für A η - α beschriebene Toxizität könnte nicht bloß vom Peptid selbst, sondern auch von der beeinträchtigten

Diskussion

A β -Clearance und einer damit einhergehenden vermehrten Akkumulation des Peptids im Gehirn ausgehen. Untermuert wird dies weiter durch die Ergebnisse von Baranger et al. 2017. Der KO von MT5-MMP hatte geringere A β -Levels zur Folge (Baranger et al. 2016b). Ohne MT5-MMP fiel kein A η - α an und es kam dementsprechend nicht zur Beeinträchtigung der LRP1-abhängigen A β -Clearance.

Während Willem et al. beobachten konnten, dass A η - α -Spiegel unter der BACE-Inhibitor-Therapie (Vgl. 2.2) anstiegen und argumentierten, der erhöhte Spiegel könne zum Scheitern der Medikamente führen, konnten diese Ergebnisse spezifizieren, welche Folgen ein erhöhter A η - α -Spiegel für den Metabolismus von A β hat. Dies muss bei der weiteren Planung möglicher Alzheimer-Therapeutika berücksichtigt werden.

7 Zusammenfassung

Beim M. Alzheimer steht das APP-Fragment A β im Zentrum der Pathogenese. Dabei ist die Konzentration von A β -Spezies im Gehirn im Vergleich zu gesunden Menschen erhöht. Sowohl die erhöhte Produktion als auch die beeinträchtigte Clearance werden dabei als für die Erkrankung ursächlich angesehen. Die Clearance des Peptids wird unter anderem über die LRP1-abhängige Endozytose in Endothelzellen der BHS vollzogen. Diese geben das Peptid, nach intrazellulärem Transport, ins Blut ab. Die Bindung mit dem Rezeptor geht das Peptid dabei mit den Liganden-bindenden Domänen II oder IV ein. Das 2015 bekannt gewordene Peptid A η - α wird ebenfalls durch Prozessierung des APP freigesetzt. Dabei beinhaltet das Peptid einen Teil der Sequenz von A β . Daher sollte untersucht werden, ob das neu entdeckte Peptid ähnlichen, LRP1-abhängigen Endozytose-Mechanismen unterliegt.

In dieser Arbeit konnte erstmals die Interaktion zwischen A η - α und LRP1 gezeigt werden. Dabei wurden in vitro Endozytose-Experimente mit CHO-Zellen durchgeführt, die zeigen konnten, dass das Peptid LRP1-abhängig endozytiert wird. Auch ohne LRP1 wurde das Peptid von den Zellen endozytiert, was auf weitere, nicht bekannte Mechanismen zurückzuführen ist. Die Menge des via LRP1 aufgenommenen A η - α überstieg diese Mechanismen jedoch fast um das Dreifache.

Weiter wurden aus CHO-Zellen via viraler Transduktion stabile Zelllinien abgeleitet. Diese exprimierten LRP1-Varianten mit unterschiedlicher Kombination der Liganden-bindenden Domänen. So wurden Varianten mit einer, zwei und drei Domänen generiert und in das Genom der CHO-Zellen integriert. Varianten mit drei Domänen wurden zunächst kloniert. Die Funktionalität der Zelllinien wurde in Uptake-Versuchen mit 125 I-markiertem A β unter Beweis gestellt. Die erstellten Zelllinien wurden für zukünftige Versuche zur Verfügung gestellt.

Die Endozytose-Experimente mit A η - α ergaben, dass weder einzelne Domänen noch die Kombination aus zwei Liganden-bindenden Domänen die Endozytose des Peptids auszulösen vermochten. Nur die Variante aus den Liganden-bindenden Domänen II, III und IV konnte die Endozytose auslösen. Dabei war die aufgenommene Menge des Peptids mit vollständigem LRP1 vergleichbar.

Inhaltsverzeichnis

- Alzheimer, A.; Stelzmann, R. A.; Schnitzlein, H. N.; Murtagh, F. R. (1995): An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". In: *Clinical anatomy* (New York, N.Y.) 8 (6), S. 429–431. DOI: 10.1002/ca.980080612.
- Baig, Shabnam; Joseph, Sally A.; Tayler, Hannah; Abraham, Richard; Owen, Michael J.; Williams, Julie; Kehoe, Patrick G.; Love, Seth (2010): Distribution and expression of picalm in Alzheimer disease. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 69 (10), S. 1071–1077. DOI: 10.1097/NEN.0b013e3181f52e01.
- Baranger, Kévin; Bonnet, Amandine E.; Girard, Stéphane D.; Paumier, Jean-Michel; García-González, Laura; Elmanaa, Wejdane; Bernard, Anne; Charrat, Eliane; Stephan, Delphine; Bauer, Charlotte; Moschke, Katrin; Lichtenthaler, Stefan F.; Roman, François S.; Checler, Frédéric; Khrestchatisky, Michel; Rivera, Santiago (2017): MT5-MMP Promotes Alzheimer's Pathogenesis in the Frontal Cortex of 5xFAD Mice and APP Trafficking in vitro. In: *Frontiers in molecular neuroscience* 9. DOI: 10.3389/fnmol.2016.00163.
- Baranger, Kévin; Khrestchatisky, Michel; Rivera, Santiago (2016a): MT5-MMP, just a new APP processing proteinase in Alzheimer's disease? In: *Journal of neuroinflammation* 13 (1), S. 167. DOI: 10.1186/s12974-016-0633-4.
- Baranger, Kévin; Marchalant, Yannick; Bonnet, Amandine E.; Crouzin, Nadine; Carrete, Alex; Paumier, Jean-Michel; Py, Nathalie A.; Bernard, Anne; Bauer, Charlotte; Charrat, Eliane; Moschke, Katrin; Seiki, Mothoharu; Vignes, Michel; Lichtenthaler, Stefan F.; Checler, Frédéric; Khrestchatisky, Michel; Rivera, Santiago (2016b): MT5-MMP is a new pro-amyloidogenic proteinase that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73 (1), S. 217–236. DOI: 10.1007/s00018-015-1992-1.
- Bentahir, Mostafa; Nyabi, Omar; Verhamme, Jan; Tolia, Alexandra; Horr , Katrien; Wiltfang, Jens; Esselmann, Hermann; Strooper, Bart de (2006): Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. In: *Journal of neurochemistry* 96 (3), S. 732–742. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2005.03578.x.

- Bertram, Lars; Tanzi, Rudolph E. (2008): Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. In: *Nature reviews. Neuroscience* 9 (10), S. 768–778. DOI: 10.1038/nrn2494.
- Bu, G.; Rennke, S. (1996): Receptor-associated protein is a folding chaperone for low density lipoprotein receptor-related protein. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (36), S. 22218–22224. DOI: 10.1074/jbc.271.36.22218.
- Bu, Guojun (2009): Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. In: *Nature reviews. Neuroscience* 10 (5), S. 333–344. DOI: 10.1038/nrn2620.
- Budd Haeberlein, S.; O'Gorman, J.; Chiao, P.; Bussi re, T.; Rosenstiel, P. von; Tian, Y.; Zhu, Y.; Hehn, C. von; Gheuens, S.; Skordos, L.; Chen, T.; Sandrock, A. (2017): Clinical Development of Aducanumab, an Anti-A β Human Monoclonal Antibody Being Investigated for the Treatment of Early Alzheimer's Disease. In: *The journal of prevention of Alzheimer's disease* 4 (4), S. 255–263. DOI: 10.14283/jpad.2017.39.
- Cai, X. D.; Golde, T. E.; Younkin, S. G. (1993): Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. In: *Science (New York, N.Y.)* 259 (5094), S. 514–516. DOI: 10.1126/science.8424174.
- Cannon, S. C.; Strittmatter, S. M. (1993): Functional expression of sodium channel mutations identified in families with periodic paralysis. In: *Neuron* 10 (2), S. 317–326.
- Canuel, Maryssa; Sun, Xiaowei; Asselin, Marie-Claude; Paramithiotis, Eustache; Prat, Annik; Seidah, Nabil G. (2013): Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) can mediate degradation of the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1). In: *PloS one* 8 (5), e64145. DOI: 10.1371/journal.pone.0064145.
- Carare, R. O.; Hawkes, C. A.; Jeffrey, M.; Kalaria, R. N.; Weller, R. O. (2013): Review: cerebral amyloid angiopathy, prion angiopathy, CADASIL and the spectrum of protein elimination failure angiopathies (PEFA) in neurodegenerative disease with a focus on therapy. In: *Neuropathology and applied neurobiology* 39 (6), S. 593–611. DOI: 10.1111/nan.12042.

- Chong, Zhi Xiong; Yeap, Swee Keong; Ho, Wan Yong (2021): Transfection types, methods and strategies: a technical review. In: PeerJ 9, e11165. DOI: 10.7717/peerj.11165.
- Chu, L. W. (2012): Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. In: Hong Kong medical journal = Xianggang yi xue za zhi 18 (3), S. 228–237.
- Combs, C. K.; Johnson, D. E.; Cannady, S. B.; Lehman, T. M.; Landreth, G. E. (1999): Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of beta-amyloid and prion proteins. In: The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 19 (3), S. 928–939.
- Croy, Johnny E.; Shin, William D.; Knauer, Mary F.; Knauer, Daniel J.; Komives, Elizabeth A. (2003): All three LDL receptor homology regions of the LDL receptor-related protein bind multiple ligands. In: Biochemistry 42 (44), S. 13049–13057. DOI: 10.1021/bi034752s.
- Dawkins, Edgar; Small, David H. (2014): Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. In: Journal of neurochemistry 129 (5), S. 756–769. DOI: 10.1111/jnc.12675.
- Dedieu, Stéphane; Langlois, Benoît; Devy, Jérôme; Sid, Brice; Henriët, Patrick; Sartelet, Hervé; Bellon, Georges; Emonard, Hervé; Martiny, Laurent (2008): LRP-1 silencing prevents malignant cell invasion despite increased pericellular proteolytic activities. In: Molecular and cellular biology 28 (9), S. 2980–2995. DOI: 10.1128/MCB.02238-07.
- Durmaz, Asude; Kumral, Emre; Durmaz, Burak; Onay, Huseyin; Aslan, Gulcin Itirli; Ozkinay, Ferda; Pehlivan, Sacide; Orman, Mehmet; Cogulu, Ozgur (2019): Genetic factors associated with the predisposition to late onset Alzheimer's disease. In: Gene 707, S. 212–215. DOI: 10.1016/j.gene.2019.05.030.
- Dyrks, T.; Weidemann, A.; Multhaup, G.; Salbaum, J. M.; Lemaire, H. G.; Kang, J.; Müller-Hill, B.; Masters, C. L.; Beyreuther, K. (1988): Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. In: The EMBO journal 7 (4), S. 949–957.
- Eckman, C. B.; Mehta, N. D.; Crook, R.; Perez-tur, J.; Prihar, G.; Pfeiffer, E.; Graff-Radford, N.; Hinder, P.; Yager, D.; Zenk, B.; Refolo, L. M.; Prada, C. M.; Younkin, S. G.; Hutton, M.; Hardy, J. (1997): A new pathogenic

- mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). In: *Human molecular genetics* 6 (12), S. 2087–2089. DOI: 10.1093/hmg/6.12.2087.
- Egan, Michael F.; Kost, James; Tariot, Pierre N.; Aisen, Paul S.; Cummings, Jeffrey L.; Vellas, Bruno; Sur, Cyrille; Mukai, Yuki; Voss, Tiffini; Furtek, Christine; Mahoney, Erin; Harper Mozley, Lyn; Vandenberghe, Rik; Mo, Yi; Michelson, David (2018): Randomized Trial of Verubecestat for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. In: *The New England journal of medicine* 378 (18), S. 1691–1703. DOI: 10.1056/NEJMoa1706441.
- Egan, Michael F.; Kost, James; Voss, Tiffini; Mukai, Yuki; Aisen, Paul S.; Cummings, Jeffrey L.; Tariot, Pierre N.; Vellas, Bruno; van Dyck, Christopher H.; Boada, Merce; Zhang, Ying; Li, Wen; Furtek, Christine; Mahoney, Erin; Harper Mozley, Lyn; Mo, Yi; Sur, Cyrille; Michelson, David (2019): Randomized Trial of Verubecestat for Prodromal Alzheimer's Disease. In: *The New England journal of medicine* 380 (15), S. 1408–1420. DOI: 10.1056/NEJMoa1812840.
- Esmieu, Charlène; Guettas, Djamila; Conte-Daban, Amandine; Sabater, Laurent; Faller, Peter; Hureau, Christelle (2019): Copper-Targeting Approaches in Alzheimer's Disease: How To Improve the Fallouts Obtained from in Vitro Studies. In: *Inorganic chemistry*. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.9b00995.
- Estus, S.; Golde, T. E.; Kunishita, T.; Blades, D.; Lowery, D.; Eisen, M.; Usiak, M.; Qu, X. M.; Tabira, T.; Greenberg, B. D. (1992): Potentially amyloidogenic, carboxyl-terminal derivatives of the amyloid protein precursor. In: *Science (New York, N.Y.)* 255 (5045), S. 726–728. DOI: 10.1126/science.1738846.
- Ferri, Cleusa P.; Prince, Martin; Brayne, Carol; Brodaty, Henry; Fratiglioni, Laura; Ganguli, Mary; Hall, Kathleen; Hasegawa, Kazuo; Hendrie, Hugh; Huang, Yueqin; Jorm, Anthony; Mathers, Colin; Menezes, Paulo R.; Rimmer, Elizabeth; Sczufca, Marcia (2005): Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. In: *Lancet (London, England)* 366 (9503), S. 2112–2117. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67889-0.
- FitzGerald, D. J.; Fryling, C. M.; Zdanovsky, A.; Saelinger, C. B.; Kounnas, M.; Winkles, J. A.; Strickland, D.; Leppla, S. (1995): Pseudomonas exotoxin-

mediated selection yields cells with altered expression of low-density lipoprotein receptor-related protein. In: *The Journal of cell biology* 129 (6), S. 1533–1541.

Fouët, Guillaume; Gout, Evelyne; Wicker-Planquart, Catherine; Bally, Isabelle; Nardis, Camilla de; Dedieu, Stéphane; Chouquet, Anne; Gaboriaud, Christine; Thielens, Nicole M.; Kleman, Jean-Philippe; Rossi, Véronique (2020): Complement C1q Interacts With LRP1 Clusters II and IV Through a Site Close but Different From the Binding Site of Its C1r and C1s-Associated Proteases. In: *Frontiers in immunology* 11, S. 583754. DOI: 10.3389/fimmu.2020.583754.

Fuentealba, Rodrigo A.; Liu, Qiang; Zhang, Juan; Kanekiyo, Takahisa; Hu, Xiaoyan; Lee, Jin-Moo; LaDu, Mary Jo; Bu, Guojun (2010): Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates neuronal Abeta42 uptake and lysosomal trafficking. In: *PloS one* 5 (7), e11884. DOI: 10.1371/journal.pone.0011884.

García-González, Laura; Paumier, Jean-Michel; Louis, Laurence; Pilat, Dominika; Bernard, Anne; Stephan, Delphine; Jullien, Nicolas; Checler, Frédéric; Nivet, Emmanuel; Khrestchatsky, Michel; Baranger, Kévin; Rivera, Santiago (2021): MT5-MMP controls APP and β -CTF/C99 metabolism through proteolytic-dependent and -independent mechanisms relevant for Alzheimer's disease. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 35 (7), e21727. DOI: 10.1096/fj.202100593R.

García-González, Laura; Pilat, Dominika; Baranger, Kévin; Rivera, Santiago (2019): Emerging Alternative Proteinases in APP Metabolism and Alzheimer's Disease Pathogenesis: A Focus on MT1-MMP and MT5-MMP. In: *Frontiers in aging neuroscience* 11, S. 244. DOI: 10.3389/fnagi.2019.00244.

Gauthier, Serge; Reisberg, Barry; Zaudig, Michael; Petersen, Ronald C.; Ritchie, Karen; Broich, Karl; Belleville, Sylvie; Brodaty, Henry; Bennett, David; Chertkow, Howard; Cummings, Jeffrey L.; Leon, Mony de; Feldman, Howard; Ganguli, Mary; Hampel, Harald; Scheltens, Philip; Tierney, Mary C.; Whitehouse, Peter; Winblad, Bengt (2006): Mild cognitive impairment. In: *Lancet (London, England)* 367 (9518), S. 1262–1270. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68542-5.

- Geula, C.; Wu, C. K.; Saroff, D.; Lorenzo, A.; Yuan, M.; Yankner, B. A. (1998): Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. In: *Nature medicine* 4 (7), S. 827–831.
- Glenner, G. G.; Wong, C. W. (1984a): Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. In: *Biochemical and biophysical research communications* 122 (3), S. 1131–1135. DOI: 10.1016/0006-291x(84)91209-9.
- Glenner, G. G.; Wong, C. W. (1984b): Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. In: *Biochemical and biophysical research communications* 120 (3), S. 885–890. DOI: 10.1016/s0006-291x(84)80190-4.
- Golde, T. E.; Estus, S.; Younkin, L. H.; Selkoe, D. J.; Younkin, S. G. (1992): Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. In: *Science (New York, N.Y.)* 255 (5045), S. 728–730. DOI: 10.1126/science.1738847.
- Gravina, S. A.; Ho, L.; Eckman, C. B.; Long, K. E.; Otvos, L.; Younkin, L. H.; Suzuki, N.; Younkin, S. G. (1995): Amyloid beta protein (A beta) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A beta 40 or A beta 42(43). In: *The Journal of biological chemistry* 270 (13), S. 7013–7016. DOI: 10.1074/jbc.270.13.7013.
- Gupta, Kritika; Modi, Deepak; Jain, Ratnesh; Dandekar, Prajakta (2021): A Stable CHO K1 Cell Line for Producing Recombinant Monoclonal Antibody Against TNF- α . In: *Molecular biotechnology*. DOI: 10.1007/s12033-021-00329-4.
- Haass, C.; Hung, A. Y.; Selkoe, D. J.; Teplow, D. B. (1994): Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (26), S. 17741–17748.
- Hardy, John; Selkoe, Dennis J. (2002): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. In: *Science (New York, N.Y.)* 297 (5580), S. 353–356. DOI: 10.1126/science.1072994.
- Hebert, Liesi E.; Scherr, Paul A.; Bienias, Julia L.; Bennett, David A.; Evans, Denis A. (2003): Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates

- using the 2000 census. In: *Archives of neurology* 60 (8), S. 1119–1122. DOI: 10.1001/archneur.60.8.1119.
- Heneka, M. T.; Kummer, M. P.; Weggen, S.; Bulic, B.; Multhaup, G.; Münter, L.; Hüll, M.; Pflanzner, T.; Pietrzik, C. U. (2011): Molecular mechanisms and therapeutic application of NSAIDs and derived compounds in Alzheimer's disease. In: *Current Alzheimer research* 8 (2), S. 115–131.
- Herr, Uta-Mareike; Strecker, Paul; Storck, Steffen E.; Thomas, Carolin; Rabiej, Verena; Junker, Anne; Schilling, Sandra; Schmidt, Nadine; Dowds, C. Marie; Eggert, Simone; Pietrzik, Claus U.; Kins, Stefan (2017): LRP1 Modulates APP Intraneuronal Transport and Processing in Its Monomeric and Dimeric State. In: *Frontiers in molecular neuroscience* 10, S. 118. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00118.
- Herz, J.; Clouthier, D. E.; Hammer, R. E. (1992): LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. In: *Cell* 71 (3), S. 411–421.
- Herz, J.; Strickland, D. K. (2001): LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. In: *The Journal of clinical investigation* 108 (6), S. 779–784. DOI: 10.1172/JCI13992.
- Jarrett, J. T.; Lansbury, P. T. (1993): Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? In: *Cell* 73 (6), S. 1055–1058. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90635-4.
- Jeon, H.; Meng, W.; Takagi, J.; Eck, M. J.; Springer, T. A.; Blacklow, S. C. (2001): Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. In: *Nature structural biology* 8 (6), S. 499–504. DOI: 10.1038/88556.
- Kang, D. E.; Pietrzik, C. U.; Baum, L.; Chevallier, N.; Merriam, D. E.; Kounnas, M. Z.; Wagner, S. L.; Troncoso, J. C.; Kawas, C. H.; Katzman, R.; Koo, E. H. (2000): Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. In: *The Journal of clinical investigation* 106 (9), S. 1159–1166. DOI: 10.1172/JCI11013.
- Kang, J.; Lemaire, H. G.; Unterbeck, A.; Salbaum, J. M.; Masters, C. L.; Grzeschik, K. H.; Multhaup, G.; Beyreuther, K.; Müller-Hill, B. (1987): The precursor

- of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. In: *Nature* 325 (6106), S. 733–736. DOI: 10.1038/325733a0.
- Kim, Tae Kyung; Eberwine, James H. (2010): Mammalian cell transfection: the present and the future. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 397 (8), S. 3173–3178. DOI: 10.1007/s00216-010-3821-6.
- Kinoshita, Ayae; Shah, Tejal; Tangredi, Michelle M.; Strickland, Dudley K.; Hyman, Bradley T. (2003): The intracellular domain of the low density lipoprotein receptor-related protein modulates transactivation mediated by amyloid precursor protein and Fe65. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (42), S. 41182–41188. DOI: 10.1074/jbc.M306403200.
- Kojro, Elzbieta; Fahrenholz, Falk (2005): The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. In: *Sub-cellular biochemistry* 38, S. 105–127.
- Kounnas, M. Z.; Moir, R. D.; Rebeck, G. W.; Bush, A. I.; Argraves, W. S.; Tanzi, R. E.; Hyman, B. T.; Strickland, D. K. (1995): LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. In: *Cell* 82 (2), S. 331–340.
- Kuo, Y. M.; Emmerling, M. R.; Vigo-Pelfrey, C.; Kasunic, T. C.; Kirkpatrick, J. B.; Murdoch, G. H.; Ball, M. J.; Roher, A. E. (1996): Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (8), S. 4077–4081. DOI: 10.1074/jbc.271.8.4077.
- Kwok, J. B.; Li, Q. X.; Hallupp, M.; Whyte, S.; Ames, D.; Beyreuther, K.; Masters, C. L.; Schofield, P. R. (2000): Novel Leu723Pro amyloid precursor protein mutation increases amyloid beta42(43) peptide levels and induces apoptosis. In: *Annals of neurology* 47 (2), S. 249–253.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lehti, Kaisa; Rose, Nina F.; Valavaara, Sara; Weiss, Stephen J.; Keski-Oja, Jorma (2009): MT1-MMP promotes vascular smooth muscle dedifferentiation through LRP1 processing. In: *Journal of cell science* 122 (Pt 1), S. 126–135. DOI: 10.1242/jcs.035279.

- Li, Y.; Marzolo, M. P.; van Kerkhof, P.; Strous, G. J.; Bu, G. (2000): The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (22), S. 17187–17194. DOI: 10.1074/jbc.M000490200.
- Liu, Qiang; Zhang, Juan; Tran, Hien; Verbeek, Marcel M.; Reiss, Karina; Estus, Steven; Bu, Guojun (2009): LRP1 shedding in human brain: roles of ADAM10 and ADAM17. In: *Molecular neurodegeneration* 4, S. 17. DOI: 10.1186/1750-1326-4-17.
- Lourida, Ilianna; Hannon, Eilis; Littlejohns, Thomas J.; Langa, Kenneth M.; Hyppönen, Elina; Kuzma, Elzbieta; Llewellyn, David J. (2019): Association of Lifestyle and Genetic Risk With Incidence of Dementia. In: *JAMA*. DOI: 10.1001/jama.2019.9879.
- Lu, Feng-Ping; Lin, Kun-Pei; Kuo, Hsu-Ko (2009): Diabetes and the risk of multi-system aging phenotypes: a systematic review and meta-analysis. In: *PloS one* 4 (1), e4144. DOI: 10.1371/journal.pone.0004144.
- Magaki, Shino; Tang, Zhaoyi; Tung, Spencer; Williams, Christopher K.; Lo, Darrick; Yong, William H.; Khanlou, Negar; Vinters, Harry V. (2018): The effects of cerebral amyloid angiopathy on integrity of the blood-brain barrier. In: *Neurobiology of aging* 70, S. 70–77. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.004.
- Mandelkow, Eckhard; Bergen, Martin von; Biernat, Jacek; Mandelkow, Eva-Maria (2007): Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 17 (1), S. 83–90. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2007.00053.x.
- Marakasova, Ekaterina; Olivares, Philip; Karnaukhova, Elena; Chun, Haarin; Hernandez, Nancy E.; Kurasawa, James H.; Hassink, Gabriela U.; Shestopal, Svetlana A.; Strickland, Dudley K.; Sarafanov, Andrey G. (2021): Molecular chaperone RAP interacts with LRP1 in a dynamic bivalent mode and enhances folding of ligand-binding regions of other LDLR family receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 297 (1). DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100842.
- Mark, R. J.; Hensley, K.; Butterfield, D. A.; Mattson, M. P. (1995): Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death. In: *The Journal of*

- neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 15 (9), S. 6239–6249.
- Martin, Anne M.; Kuhlmann, Christoph; Trossbach, Svenja; Jaeger, Sebastian; Waldron, Elaine; Roebroek, Anton; Luhmann, Heiko J.; Laatsch, Alexander; Weggen, Sascha; Lessmann, Volkmar; Pietrzik, Claus U. (2008): The functional role of the second NPXY motif of the LRP1 beta-chain in tissue-type plasminogen activator-mediated activation of N-methyl-D-aspartate receptors. In: The Journal of biological chemistry 283 (18), S. 12004–12013. DOI: 10.1074/jbc.M707607200.
- Masters, C. L.; Simms, G.; Weinman, N. A.; Multhaup, G.; McDonald, B. L.; Beyreuther, K. (1985): Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82 (12), S. 4245–4249. DOI: 10.1073/pnas.82.12.4245.
- Mattson, M. P.; Cheng, B.; Culwell, A. R.; Esch, F. S.; Lieberburg, I.; Rydel, R. E. (1993): Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. In: Neuron 10 (2), S. 243–254. DOI: 10.1016/0896-6273(93)90315-i.
- Mattson, M. P.; Cheng, B.; Davis, D.; Bryant, K.; Lieberburg, I.; Rydel, R. E. (1992): beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. In: The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 12 (2), S. 376–389.
- Mawuenyega, Kwasi G.; Sigurdson, Wendy; Ovod, Vitaliy; Munsell, Ling; Kasten, Tom; Morris, John C.; Yarasheski, Kevin E.; Bateman, Randall J. (2010): Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. In: Science (New York, N.Y.) 330 (6012), S. 1774. DOI: 10.1126/science.1197623.
- May, Petra; Reddy, Y. Krishna; Herz, Joachim (2002): Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. In: The Journal of biological chemistry 277 (21), S. 18736–18743. DOI: 10.1074/jbc.M201979200.
- Mehta, Dev; Jackson, Robert; Paul, Gaurav; Shi, Jiong; Sabbagh, Marwan (2017): Why do trials for Alzheimer's disease drugs keep failing? A

- discontinued drug perspective for 2010-2015. In: Expert opinion on investigational drugs 26 (6), S. 735–739. DOI: 10.1080/13543784.2017.1323868.
- Meister, Sabrina; Zlatev, Iavor; Stab, Julia; Docter, Dominic; Baches, Sandra; Stauber, Roland H.; Deutsch, Mordechai; Schmidt, Reinhold; Ropele, Stefan; Windisch, Manfred; Langer, Klaus; Wagner, Sylvia; Briesen, Hagen von; Weggen, Sascha; Pietrzik, Claus U. (2013): Nanoparticulate flurbiprofen reduces amyloid- β 42 generation in an in vitro blood-brain barrier model. In: Alzheimer's research & therapy 5 (6), S. 51. DOI: 10.1186/alzrt225.
- Mensch, Maria; Dunot, Jade; Yishan, Sandy M.; Harris, Samuel S.; Blistein, Aline; Avdiu, Alban; Pousinha, Paula A.; Giudici, Camilla; Busche, Marc Aurel; Jedlicka, Peter; Willem, Michael; Marie, H  l  ne (2021): A η - α and A η - β peptides impair LTP ex vivo within the low nanomolar range and impact neuronal activity in vivo. In: Alzheimer's research & therapy 13 (1), S. 125. DOI: 10.1186/s13195-021-00860-1.
- Meyer, Conary; Losacco, Joseph; Stickney, Zachary; Li, Lingxuan; Marriott, Gerard; Lu, Biao (2017): Pseudotyping exosomes for enhanced protein delivery in mammalian cells. In: International journal of nanomedicine 12, S. 3153–3170. DOI: 10.2147/IJN.S133430.
- Meyer, Pierre-Fran  ois; Tremblay-Mercier, Jennifer; Leoutsakos, Jeannie; Madjar, C  cile; Lafaille-Maignan, Marie-  lyse; Savard, Melissa; Rosa-Neto, Pedro; Poirier, Judes; Etienne, Pierre; Breitner, John (2019): INTREPAD: A randomized trial of naproxen to slow progress of presymptomatic Alzheimer disease. In: Neurology 92 (18), e2070-80. DOI: 10.1212/WNL.00000000000007232.
- Mikhailenko, I.; Battey, F. D.; Migliorini, M.; Ruiz, J. F.; Argraves, K.; Moayeri, M.; Strickland, D. K. (2001): Recognition of alpha 2-macroglobulin by the low density lipoprotein receptor-related protein requires the cooperation of two ligand binding cluster regions. In: The Journal of biological chemistry 276 (42), S. 39484–39491. DOI: 10.1074/jbc.M104382200.
- Moestrup, S. K.; Holtet, T. L.; Etzerodt, M.; Th  gersen, H. C.; Nykjaer, A.; Andreasen, P. A.; Rasmussen, H. H.; Sottrup-Jensen, L.; Gliemann, J. (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. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (18), S. 13691–13696.
- Müller-Hill, B.; Beyreuther, K. (1989): Molecular biology of Alzheimer's disease. In: *Annual review of biochemistry* 58, S. 287–307. DOI: 10.1146/annurev.bi.58.070189.001443.
- Neels, J. G.; van den Berg, B. M.; Lookene, A.; Olivecrona, G.; Pannekoek, H.; van Zonneveld, A. J. (1999): The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (44), S. 31305–31311.
- Nelson, Amy R.; Sweeney, Melanie D.; Sagare, Abhay P.; Zlokovic, Berislav V. (2016): Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. In: *Biochimica et biophysica acta* 1862 (5), S. 887–900. DOI: 10.1016/j.bbadis.2015.12.016.
- Nunan, J.; Small, D. H. (2000): Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. In: *FEBS letters* 483 (1), S. 6–10. DOI: 10.1016/s0014-5793(00)02076-7.
- Obermoeller, L. M.; Chen, Z.; Schwartz, A. L.; Bu, G. (1998): Ca²⁺ and receptor-associated protein are independently required for proper folding and disulfide bond formation of the low density lipoprotein receptor-related protein. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (35), S. 22374–22381. DOI: 10.1074/jbc.273.35.22374.
- Obermoeller-McCormick, L. M.; Li, Y.; Osaka, H.; FitzGerald, D. J.; Schwartz, A. L.; Bu, G. (2001): Dissection of receptor folding and ligand-binding property with functional minireceptors of LDL receptor-related protein. In: *Journal of cell science* 114 (Pt 5), S. 899–908.
- Palmqvist, Sebastian; Janelidze, Shorenna; Stomrud, Erik; Zetterberg, Henrik; Karl, Johann; Zink, Katharina; Bittner, Tobias; Mattsson, Niklas; Eichenlaub, Udo; Blennow, Kaj; Hansson, Oskar (2019): Performance of Fully Automated Plasma Assays as Screening Tests for Alzheimer Disease-Related β -Amyloid Status. In: *JAMA neurology*. DOI: 10.1001/jamaneurol.2019.1632.

- Panza, Francesco; Lozupone, Madia; Dibello, Vittorio; Greco, Antonio; Daniele, Antonio; Seripa, Davide; Logroscino, Giancarlo; Imbimbo, Bruno P. (2019): Are antibodies directed against amyloid- β (A β) oligomers the last call for the A β hypothesis of Alzheimer's disease? In: *Immunotherapy* 11 (1), S. 3–6. DOI: 10.2217/imt-2018-0119.
- Panza, Francesco; Seripa, Davide; Solfrizzi, Vincenzo; Imbimbo, Bruno P.; Lozupone, Madia; Leo, Antonio; Sardone, Rodolfo; Gagliardi, Gaetano; Lofano, Lucia; Creanza, Bianca C.; Bisceglia, Paola; Daniele, Antonio; Bellomo, Antonello; Greco, Antonio; Logroscino, Giancarlo (2016): Emerging drugs to reduce abnormal β -amyloid protein in Alzheimer's disease patients. In: *Expert opinion on emerging drugs* 21 (4), S. 377–391. DOI: 10.1080/14728214.2016.1241232.
- Paumier, Jean-Michel; Py, Nathalie A.; García-González, Laura; Bernard, Anne; Stephan, Delphine; Louis, Laurence; Checler, Frédéric; Khrestchatsky, Michel; Baranger, Kévin; Rivera, Santiago (2019): Proamyloidogenic effects of membrane type 1 matrix metalloproteinase involve MMP-2 and BACE-1 activities, and the modulation of APP trafficking. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 33 (2), S. 2910–2927. DOI: 10.1096/fj.201801076R.
- Pflanzner, Thorsten; Janko, Maren C.; André-Dohmen, Bettina; Reuss, Stefan; Weggen, Sascha; Roebroek, Anton J. M.; Kuhlmann, Christoph R. W.; Pietrzik, Claus U. (2011): LRP1 mediates bidirectional transcytosis of amyloid- β across the blood-brain barrier. In: *Neurobiology of aging* 32 (12), 2323.e1-11. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.025.
- Pietrzik, Claus U.; Busse, Tracy; Merriam, David E.; Weggen, Sascha; Koo, Edward H. (2002): The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing. In: *The EMBO journal* 21 (21), S. 5691–5700. DOI: 10.1093/emboj/cdf568.
- Pietrzik, Claus U.; Yoon, Il-Sang; Jaeger, Sebastian; Busse, Tracy; Weggen, Sascha; Koo, Edward H. (2004): FE65 Constitutes the Functional Link between the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein and the Amyloid Precursor Protein. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24 (17), S. 4259–4265. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5451-03.2004.

- Pike, C. J.; Walencewicz, A. J.; Glabe, C. G.; Cotman, C. W. (1991): In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. In: Brain research 563 (1-2), S. 311–314. DOI: 10.1016/0006-8993(91)91553-d.
- Podlisny, M. B.; Walsh, D. M.; Amarante, P.; Ostaszewski, B. L.; Stimson, E. R.; Maggio, J. E.; Teplow, D. B.; Selkoe, D. J. (1998): Oligomerization of endogenous and synthetic amyloid beta-protein at nanomolar levels in cell culture and stabilization of monomer by Congo red. In: Biochemistry 37 (11), S. 3602–3611. DOI: 10.1021/bi972029u.
- PUCK, T. T.; CIECIURA, S. J.; ROBINSON, A. (1958): Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. In: The Journal of experimental medicine 108 (6), S. 945–956. DOI: 10.1084/jem.108.6.945.
- Rabiej, Verena K.; Pflanzner, Thorsten; Wagner, Timo; Goetze, Kristina; Storck, Steffen E.; Eble, Johannes A.; Weggen, Sascha; Mueller-Klieser, Wolfgang; Pietrzik, Claus U. (2016): Low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediated endocytosis of β 1-integrin influences cell adhesion and cell migration. In: Experimental cell research 340 (1), S. 102–115. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.11.020.
- Rabin, Jennifer S.; Klein, Hannah; Kirn, Dylan R.; Schultz, Aaron P.; Yang, Hyun-Sik; Hampton, Olivia; Jiang, Shu; Buckley, Rachel F.; Viswanathan, Anand; Hedden, Trey; Pruzin, Jeremy; Yau, Wai-Ying Wendy; Guzmán-Vélez, Edmarie; Quiroz, Yakeel T.; Properzi, Michael; Marshall, Gad A.; Rentz, Dorene M.; Johnson, Keith A.; Sperling, Reisa A.; Chhatwal, Jasmeer P. (2019): Associations of Physical Activity and β -Amyloid With Longitudinal Cognition and Neurodegeneration in Clinically Normal Older Adults. In: JAMA neurology. DOI: 10.1001/jamaneurol.2019.1879.
- Ranganathan, Sripriya; Cao, Chunzhang; Catania, Jason; Migliorini, Molly; Zhang, Li; Strickland, Dudley K. (2011): Molecular basis for the interaction of low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) with integrin α 5 β 2: identification of binding sites within α 5 β 2 for LRP1. In: The Journal of biological chemistry 286 (35), S. 30535–30541. DOI: 10.1074/jbc.M111.265413.

- Rohlmann, A.; Gotthardt, M.; Hammer, R. E.; Herz, J. (1998): Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. In: *The Journal of clinical investigation* 101 (3), S. 689–695. DOI: 10.1172/JCI1240.
- Rudenko, Gabby; Henry, Lisa; Henderson, Keith; Ichtchenko, Konstantin; Brown, Michael S.; Goldstein, Joseph L.; Deisenhofer, Johann (2002): Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. In: *Science (New York, N.Y.)* 298 (5602), S. 2353–2358. DOI: 10.1126/science.1078124.
- Sagare, Abhay P.; Bell, Robert D.; Srivastava, Alaka; Sengillo, Jesse D.; Singh, Itender; Nishida, Yoichiro; Chow, Nienwen; Zlokovic, Berislav V. (2013): A lipoprotein receptor cluster IV mutant preferentially binds amyloid- β and regulates its clearance from the mouse brain. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (21), S. 15154–15166. DOI: 10.1074/jbc.M112.439570.
- Salicioni, Ana M.; Mizelle, Kellie S.; Loukinova, Elena; Mikhailenko, Irina; Strickland, Dudley K.; Gonias, Steven L. (2002): The low density lipoprotein receptor-related protein mediates fibronectin catabolism and inhibits fibronectin accumulation on cell surfaces. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (18), S. 16160–16166. DOI: 10.1074/jbc.M201401200.
- Scheuner, D.; Eckman, C.; Jensen, M.; Song, X.; Citron, M.; Suzuki, N.; Bird, T. D.; Hardy, J.; Hutton, M.; Kukull, W.; Larson, E.; Levy-Lahad, E.; Viitanen, M.; Peskind, E.; Poorkaj, P.; Schellenberg, G.; Tanzi, R.; Wasco, W.; Lannfelt, L.; Selkoe, D.; Younkin, S. (1996): Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. In: *Nature medicine* 2 (8), S. 864–870.
- Schindler, Suzanne E.; Bollinger, James G.; Ovod, Vitaliy; Mawuenyega, Kwasi G.; Li, Yan; Gordon, Brian A.; Holtzman, David M.; Morris, John C.; Benzinger, Tammie L. S.; Xiong, Chengjie; Fagan, Anne M.; Bateman, Randall J. (2019): High-precision plasma β -amyloid 42/40 predicts current and future brain amyloidosis. In: *Neurology*. DOI: 10.1212/WNL.0000000000008081.
- Selkoe, D. J.; Yamazaki, T.; Citron, M.; Podlisny, M. B.; Koo, E. H.; Teplow, D. B.; Haass, C. (1996): The role of APP processing and trafficking pathways

- in the formation of amyloid beta-protein. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 777, S. 57–64. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1996.tb34401.x.
- Shibata, M.; Yamada, S.; Kumar, S. R.; Calero, M.; Bading, J.; Frangione, B.; Holtzman, D. M.; Miller, C. A.; Strickland, D. K.; Ghiso, J.; Zlokovic, B. V. (2000): Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. In: *The Journal of clinical investigation* 106 (12), S. 1489–1499. DOI: 10.1172/JCI10498.
- Shinohara, Mitsuru; Tachibana, Masaya; Kanekiyo, Takahisa; Bu, Guojun (2017): Role of LRP1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease: evidence from clinical and preclinical studies. In: *Journal of lipid research* 58 (7), S. 1267–1281. DOI: 10.1194/jlr.R075796.
- Sisodia, S. S. (1999): Alzheimer's disease: perspectives for the new millennium. In: *The Journal of clinical investigation* 104 (9), S. 1169–1170. DOI: 10.1172/JCI8508.
- Small, D. H.; McLean, C. A. (1999): Alzheimer's disease and the amyloid beta protein: What is the role of amyloid? In: *Journal of neurochemistry* 73 (2), S. 443–449. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1999.0730443.x.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Analytical biochemistry* 150 (1), S. 76–85. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Storck, Steffen E.; Hartz, Anika M. S.; Bernard, Jessica; Wolf, Andrea; Kachlmeier, André; Mahringer, Anne; Weggen, Sascha; Pahnke, Jens; Pietrzik, Claus U. (2018): The concerted amyloid-beta clearance of LRP1 and ABCB1/P-gp across the blood-brain barrier is linked by PICALM. In: *Brain, behavior, and immunity* 73, S. 21–33. DOI: 10.1016/j.bbi.2018.07.017.
- Storck, Steffen E.; Meister, Sabrina; Nahrath, Julius; Meißner, Julius N.; Schubert, Nils; Di Spiezio, Alessandro; Baches, Sandra; Vandenbroucke, Roosmarijn E.; Bouter, Yvonne; Prikulis, Ingrid; Korth, Carsten; Weggen, Sascha; Heimann, Axel; Schwaninger, Markus; Bayer, Thomas A.; Pietrzik, Claus U. (2016): Endothelial LRP1 transports amyloid-β(1-42) across

- the blood-brain barrier. In: *The Journal of clinical investigation* 126 (1), S. 123–136. DOI: 10.1172/JCI81108.
- Sun, Fengcheng; Avramoglu, Rita Kohen; Vassiliou, Gerard; Brown, Robert J.; Ko, Kerry W. S.; McPherson, Ruth; Yao, Zemin (2005): Do clustered beta-propeller domains within the N-terminus of LRP1 play a functional role? In: *Biochimica et biophysica acta* 1721 (1-3), S. 139–151. DOI: 10.1016/j.bbagen.2004.10.014.
- Suzuki, N.; Cheung, T. T.; Cai, X. D.; Odaka, A.; Otvos, L.; Eckman, C.; Golde, T. E.; Younkin, S. G. (1994): An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. In: *Science (New York, N.Y.)* 264 (5163), S. 1336–1340. DOI: 10.1126/science.8191290.
- Teller, J. K.; Russo, C.; DeBusk, L. M.; Angelini, G.; Zaccheo, D.; Dagna-Bricarelli, F.; Scartezzini, P.; Bertolini, S.; Mann, D. M.; Tabaton, M.; Gambetti, P. (1996): Presence of soluble amyloid beta-peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome. In: *Nature medicine* 2 (1), S. 93–95.
- Tyan, Sheue-Houy; Koo, Edward H. (2015): New tricks from an old dog: Another synaptotoxic fragment from APP. In: *Cell research* 25 (11), S. 1185–1186. DOI: 10.1038/cr.2015.125.
- van Gool, Bart; Storck, Steffen E.; Reekmans, Sara M.; Lechat, Benoit; Gordts, Philip L. S. M.; Pradier, Laurent; Pietrzik, Claus U.; Roebroek, Anton J. M. (2019): LRP1 Has a Predominant Role in Production over Clearance of A β in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. In: *Molecular neurobiology* 56 (10), S. 7234–7245. DOI: 10.1007/s12035-019-1594-2.
- Vassar, R.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E. A.; Denis, P.; Teplow, D. B.; Ross, S.; Amarante, P.; Loeloff, R.; Luo, Y.; Fisher, S.; Fuller, J.; Edenson, S.; Lile, J.; Jarosinski, M. A.; Biere, A. L.; Curran, E.; Burgess, T.; Louis, J. C.; Collins, F.; Treanor, J.; Rogers, G.; Citron, M. (1999): Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. In: *Science (New York, N.Y.)* 286 (5440), S. 735–741. DOI: 10.1126/science.286.5440.735.

- Willem, Michael; Tahirovic, Sabina; Busche, Marc Aurel; Ovsepien, Saak V.; Chafai, Magda; Kootar, Scherazad; Hornburg, Daniel; Evans, Lewis D. B.; Moore, Steven; Daria, Anna; Hampel, Heike; Müller, Veronika; Giudici, Camilla; Nuscher, Brigitte; Wenninger-Weinzierl, Andrea; Kremmer, Elisabeth; Heneka, Michael T.; Thal, Dietmar R.; Giedraitis, Vilmantas; Lannfelt, Lars; Müller, Ulrike; Livesey, Frederick J.; Meissner, Felix; Herms, Jochen; Konnerth, Arthur; Marie, Hélène; Haass, Christian (2015): η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. In: *Nature* 526 (7573), S. 443–447. DOI: 10.1038/nature14864.
- Willnow, T. E.; Moehring, J. M.; Inocencio, N. M.; Moehring, T. J.; Herz, J. (1996): The low-density-lipoprotein receptor-related protein (LRP) is processed by furin in vivo and in vitro. In: *The Biochemical journal* 313 (Pt 1), S. 71–76.
- Willnow, T. E.; Orth, K.; Herz, J. (1994): Molecular dissection of ligand binding sites on the low density lipoprotein receptor-related protein. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (22), S. 15827–15832.
- Yamazaki, T.; Koo, E. H.; Selkoe, D. J. (1996): Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization. In: *Journal of cell science* 109 (Pt 5), S. 999–1008.
- Zhang, Haoqian; Adwanikar, Hita; Werb, Zena; Noble-Haeusslein, Linda J. (2010): Matrix metalloproteinases and neurotrauma: evolving roles in injury and reparative processes. In: *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 16 (2), S. 156–170. DOI: 10.1177/1073858409355830.
- Zhang, Kewei; Yin, Xiaomei; Shi, Kaituo; Zhang, Shihua; Wang, Juan; Zhao, Shasha; Deng, Huan; Zhang, Cheng; Wu, Zihui; Li, Yuan; Zhou, Xiangyu; Deng, Wensheng (2021): A high-efficiency method for site-directed mutagenesis of large plasmids based on large DNA fragment amplification and recombinational ligation. In: *Scientific reports* 11 (1), S. 10454. DOI: 10.1038/s41598-021-89884-z.
- Zhao, Zhen; Sagare, Abhay P.; Ma, Qingyi; Halliday, Matthew R.; Kong, Pan; Kisler, Cassandra; Winkler, Ethan A.; Ramanathan, Anita; Kanekiyo, Takahisa; Bu, Guojun; Owens, Nelly Chuqui; Rege, Sanket V.; Si,

Literaturverzeichnis

Gabriel; Ahuja, Ashim; Zhu, Donghui; Miller, Carol A.; Schneider, Julie A.; Maeda, Manami; Maeda, Takahiro; Sugawara, Tohru; Ichida, Justin K.; Zlokovic, Berislav V. (2015): Central role for PICALM in amyloid- β blood-brain barrier transcytosis and clearance. In: Nature neuroscience 18 (7), S. 978–987. DOI: 10.1038/nn.4025.

8 Anhang

8.1 Tabellen

Tabelle 27: Bekannte Mutationen. Übersetzt und angepasst nach Small und McLean 1999.

Erkrankung/Mutation	Konsequenz	Referenz für erhöhte A β _{1-42/43} Level
Trisomie 21	Vermehrtes APP	Teller et al. 1996
FAD Sweden	Erhöhte β -Sekretase Prozessierung von APP	Cai et al. 1993
FAD Flemish	Erniedrigte α -Sekretase Prozessierung von APP	Haass et al. 1994
FAD London	Veränderte γ -Sekretase Schnittstelle	Suzuki et al. 1994
FAD Florida	Veränderte γ -Sekretase Schnittstelle	Eckman et al. 1997
FAD Australia	Veränderte γ -Sekretase Schnittstelle	Kwok et al. 2000
PSEN-1 Mutation	Veränderte γ -Sekretase Schnittstelle	Scheuner et al. 1996
PSEN-2 Mutation	Veränderte γ -Sekretase Schnittstelle	Scheuner et al. 1996

8.2 Sequenzen

8.2.1 A η - α und A β

Sequenz von A η - α :

MISEPRISYGNDALMPSLTETKTTVELLPVNGEFLDDLQPWHSFGADSVPAN
TENEVEPVDARPAADRGLTTRPGSGLTNIKTEEISEVKM**DAEFRHDSGYEVHHQK**

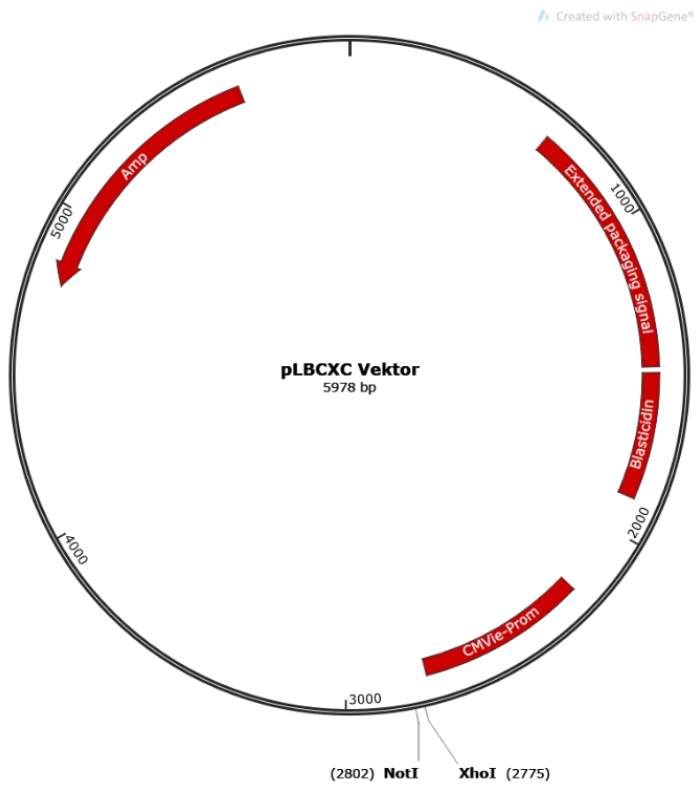
Sequenz von A β :

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

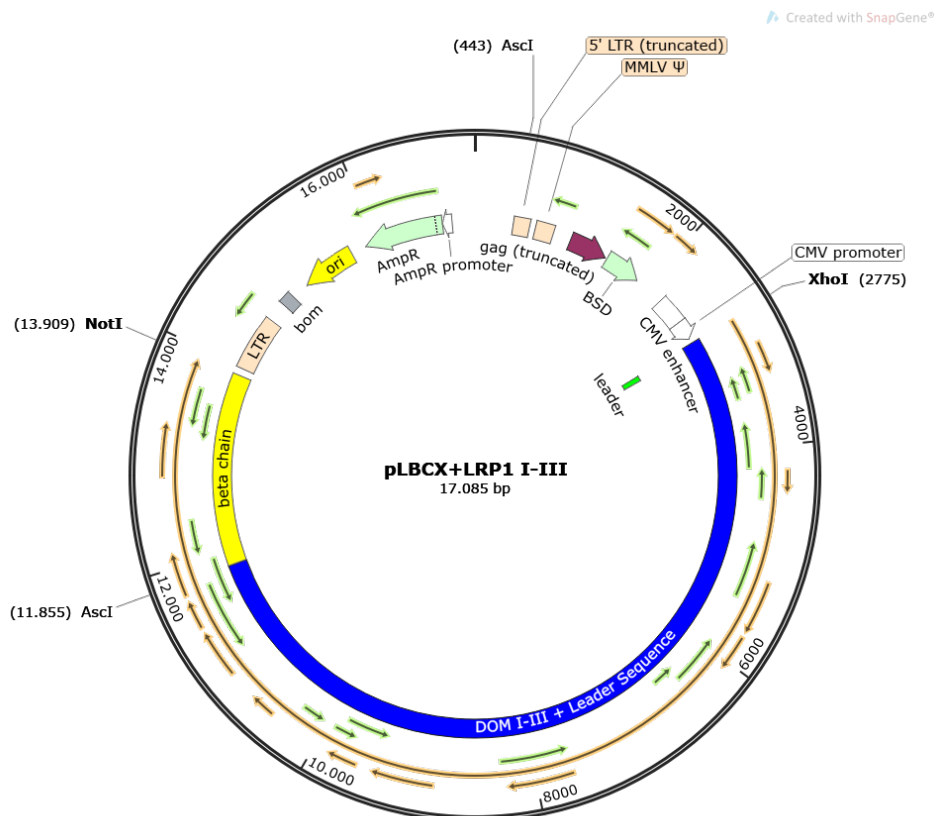
Die überlappende Sequenz ist jeweils rot markiert.

8.3 Vektorkarten

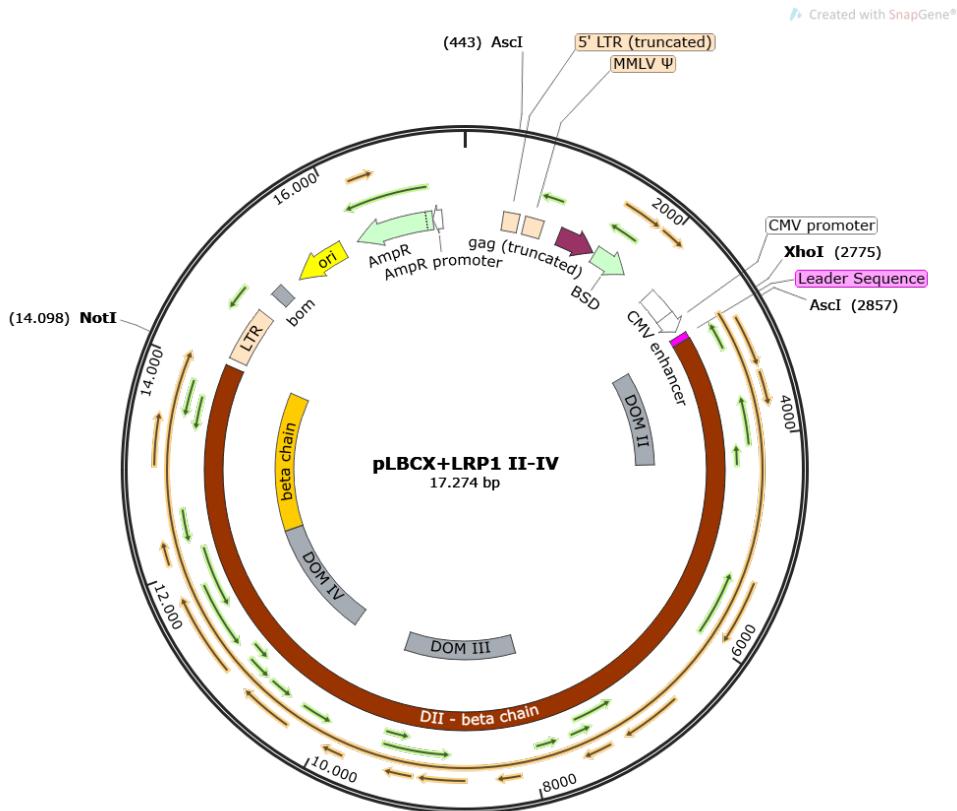
8.3.1 pLBCX Vektor



8.3.2 pLBCX + LRP1 Domäne I-III



8.3.3 pLBCX + LRP1 Domäne II-IV



8.4 DNA-Sequenzen

8.4.1 LRP1 Domäne I-III

```

TTTGAAAGACCCACCCGTAGGTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCACTTTGCA
AGGCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAA
CAAAGAAACAGCTGAATACCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCGGTTCCCTGCCCC
GGCTCAGGGCCAAGAACAGATGAGACAGCTGAGTGATGGGCCAAACAGGATAT
CTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAG
ATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGTGAATCATCAGATGTTTCCAGGGTGC
CCCAAGGACCTGAAAATGACCCTGTACCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCT
TCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCCGCTCTCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAA
CCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCTTCCGATAGACTGCGTCGCCCGGGTACCCGT
ATTCCAATAAAGCCTCTTGCTGTTTGCATCCGAATCGTGGTCTCGCTGTTCCCT
GGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCACGACGGGGGTCTTTCATTTGG
GGGCTCGTCCGGGATTTGGAGACCCCTGCCAGGGACCACCGACCCACCACC
GGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTATCTGTGTCTGTCCGATTGTCTAGTGTCTA
TGTTTGATGTTATGCGCCTGCGTCTGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATCTG
GCGGACCCGTGGTGGAACTGACGAGTTCTGAACACCCGGCCGCAACCCTGGG
    
```

Anhang

AGACGTCCCAGGGACTTTGGGGCCGTTTTTGTGGCCCGACCTGAGGAAGGGA
GTTCGATGTGGAATCCGACCCCGTCAGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGA
ACCTAAAACAGTTCCCGCCTCCGTCTGAATTTTTGCTTTCGGTTTGAACCGAAG
CCGCGCGTCTTGTCTGCTGCAGCGCTGCAGCATCGTTCTGTGTTGTCTCTGTCT
GACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAATTAGGGCCAGACTGTTACCACTCCCTTA
AGTTTGACCTTAGGTCAGTGGAAAGATGTCGAGCGGATCGCTCACAACCAGTCG
GTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCTTCTGCTCTGCAGAATGGCCAACC
TTAACGTTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTAACCGAGACCTCATCACCCA
GGTTAAGATCAAGGTCTTTTACCTGGCCCGCATGGACACCCAGACCAGGTCC
CCTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTACCCCCCTCCCTGGGTCAAG
CCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCCTCCTCTTCCATCCGCCCCGTCTCTC
CCCCTTGAACCTCCTCGTTGACCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTC
ACTCCTTCTCTAGGCGCCGGAATTCCGATCTGATCCATGGCCAAGCCTTTGTCT
CAAGAAGAATCCACCCTCATTGAAAGAGCAACGGCTACAATCAACAGCATCCCC
ATCTCTGAAGACTACAGCGTCGCCAGCGCAGCTCTCTCTAGCGACGGCCGCAT
CTTCACTGGTGTCAATGTATATCATTTTACTGGGGGACCTTGTGCAGAACTCGTG
GTGCTGGGCACTGCTGCTGCTGCGGCAGCTGGCAACCTGACTTGTATCGTCGC
GATCGGAAATGAGAACAGGGGCATCTTGAGCCCCTGCGGACGGTGCCGACAG
GTGCTTCTCGATCTGCATCCTGGGATCAAAGCCATAGTGAAGGACAGTGATGGA
CAGCCGACGGCAGTTGGGATTCGTGAATTGCTGCCCTCTGGTTATGTGTGGGA
GGGCTAAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCT
GCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTG
GCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGAT
ATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGG
TATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTT
CTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT
TCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCC
TGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC
CATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACG
GTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCC
TATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGAC
CTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACC
ATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCA
CGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCAC
CAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAA

Anhang

ATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGT
GAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCGGATGCTGAC
CCCGCCGTTGCTCCTGCTGCTGCCCTGCTCTCAGCTCTGGTCGCGGGCGGCTA
TCGACGCCCTAAGACTTGCAGCCCCAAGCAGTTTGCCTGCAGAGATCAAATAA
CCTGTATCTCAAAGGGCTGGCGGTGCGACGGTGAGAGGGACTGCCCAGACGG
ATCTGACGAGGCCCTGAGATTTGTCCACAGAGTAAGGCCAGCGATGCCAGC
CAAACGAGCATAACTGCCTGGGTAAGTACTGAGCTGTGTGTTCCCATGTCCCGCCTCT
GCAATGGGGTCCAGGACTGCATGGACGGCTCAGATGAGGGGCCCCACTGCCG
AGAGCTCCAAGGCAACTGCTCTCGCCTGGGCTGCCAGCACCATTGTGTCCCA
CACTCGATGGGCCACCTGCTACTGCAACAGCAGCTTTCAGCTTCAGGCAGAT
GGCAAGACCTGCAAAGATTTTGTGAGTGTGCTCAGTGTACGGCACCTGCAGCCA
GCTATGCACCAACACAGACGGCTCCTTCATATGTGGCTGTGTTGAAGGATACCT
CCTGCAGCCGGATAACCGCTCCTGCAAGGCCAAGAACGAGCCAGTAGACCGGC
CCCCTGTGCTGTTGATAGCCAACTCCAGAACATCTTGGCCACGTACCTGAGTG
GGGCCAGGTGTCTACCATCACACCTACGAGCACGCGGCAGACCACAGCCATG
GACTTCAGCTATGCCAACGAGACCGTATGCTGGGTGCATGTTGGGGACAGTGC
TGCTCAGACGCAGCTCAAGTGTGCCCGCATGCCTGGCCTAAAGGGCTTCGTGG
ATGAGCACACCATCAACATCTCCCTCAGTCTGCACCACGTGGAACAGATGGCCA
TCGACTGGCTGACAGGCAACTTCTACTTTGTGGATGACATCGATGATAGGATCT
TTGTCTGCAACAGAAATGGGGACACATGTGTACATTGCTAGACCTGGAACCTCT
ACAACCCCAAGGGCATTGCCCTGGACCCTGCCATGGGGAAGGTGTTTTTCACT
GACTATGGGCAGATCCCAAAGGTGGAACGCTGTGACATGGATGGGCAGAACCG
CACCAAGCTCGTCGACAGCAAGATTGTGTTTCCTCATGGCATCACGCTGGACCT
GGTCAGCCGCCTTGTCTACTGGGCAGATGCCTATCTGGACTATATTGAAGTGGT
GGACTATGAGGGCAAGGGCCGCCAGACCATCATCCAGGGCATCCTGATTGAGC
ACCTGTACGGCCTGACTGTGTTTGAGAATTATCTCTATGCCACCAACTCGGACA
ATGCCAATGCCCAGCAGAAGACGAGTGTGATCCGTGTGAACCGCTTTAACAGCA
CCGAGTACCAGGTTGTCACCCGGGTGGACAAGGGTGGTGCCCTCCACATCTAC
CACCAGAGGCGTCAGCCCCGAGTGAGGAGCCATGCCTGTGAAAACGACCAGTA
TGGGAAGCCGGGTGGCTGCTCTGACATCTGCCTGCTGGCCAACAGCCACAAGG
CGCGGACCTGCCGCTGCCGTTCCGGCTTCAGCCTGGGCAGTGACGGGAAGTC
ATGCAAGAAGCCGGAGCATGAGCTGTTCCCTCGTGTATGGCAAGGGCCGGCCAG
GCATCATCCGGGGCATGGATATGGGGGCCAAGGTCCCGGATGAGCACATGATC
CCCATTGAAAACCTCATGAACCCCGAGCCCTGGACTTCCACGCTGAGACCGG
CTTCATCTACTTTGCCGACACCACCAGCTACCTCATTGGCCGCCAGAAGATTGA

Anhang

TGGCACTGAGCGGGAGACCATCCTGAAGGACGGCATCCACAATGTGGAGGGTG
TGGCCGTGGACTGGATGGGAGACAATCTGTACTGGACGGACGATGGGCCCAA
AAGACAATCAGCGTGGCCAGGCTGGAGAAAGCTGCTCAGACCCGCAAGACTTT
AATCGAGGGCAAATGACACACCCCAGGGCTATTGTGGTGGATCCACTCAATG
GGTGGATGTACTGGACAGACTGGGAGGAGGACCCCAAGGACAGTCGGCGTGG
GCGGCTGGAGAGGGCGTGGATGGATGGCTCACACCGAGACATCTTTGTCACCT
CCAAGACAGTGCTTTGGCCCAATGGGCTAAGCCTGGACATCCCGGCTGGGCGC
CTCTACTGGGTGGATGCCTTCTACGACCGCATCGAGACGATACTGCTCAATGGC
ACAGACCGGAAGATTGTGTATGAAGGTCCTGAGCTGAACCACGCCTTTGGCCT
GTGTCACCATGGCAACTACCTCTTCTGGACTGAGTATCGGAGTGGCAGTGTCTA
CCGCTTGGAACGGGGTGTAGGAGGCGCACCCCCACTGTGACCCTTCTGCGCA
GTGAGCGGCCCCCATCTTTGAGATCCGAATGTATGATGCCCAGCAGCAGCAA
GTTGGCACCAACAAATGCCGGGTGAACAATGGCGGCTGCAGCAGCCTGTGCTT
GGCCACCCCTGGGAGCCGCCAGTGCGCCTGTGCTGAGGACCAGGTGTTGGAC
GCAGACGGCGTCACTTGCTTGGCGAACCCATCCTACGTGCCTCCACCCCAGTG
CCAGCCAGGCGAGTTTGCCTGTGCCAACAGCCGCTGCATCCAGGAGCGCTGGA
AGTGTGACGGAGACAACGATTGCCTGGACAACAGTGATGAGGCCCCAGCCCTC
TGCCATCAGCACACCTGCCCTCGGACCGATTCAAGTGCGAGAACAACCGGTG
CATCCCCAACCGCTGGCTCTGCGACGGGGACAATGACTGTGGGAACAGTGAAG
ATGAGTCCAATGCCACTTGTTTCAGCCCGCACCTGCCCCCCAACCAGTTCTCCT
GTGCCAGTGGCCGCTGCATCCCCATCTCCTGGACGTGTGATCTGGATGACGAC
TGTGGGGACCGCTCTGATGAGTCTGCTTCGTGTGCCTATCCCACCTGCTTCCCC
CTGACTCAGTTTACCTGCAACAATGGCAGATGTATCAACATCAACTGGAGATGC
GACAATGACAATGACTGTGGGGACAACAGTGACGAAGCCGGCTGCAGCCACTC
CTGTTCTAGCACCCAGTTCAAGTGCAACAGCGGGCGTTGCATCCCCGAGCACT
GGACCTGCGATGGGGACAATGACTGCGGAGACTACAGTGATGAGACACACGCC
AACTGCACCAACCAGGCCACGAGGCCCCCTGGTGGCTGCCACACTGATGAGTT
CCAGTGCCGGCTGGATGGACTATGCATCCCCCTGCGGTGGCGCTGCGATGGG
GACACTGACTGCATGGACTCCAGCGATGAGAAGAGCTGTGAGGGAGTGACCCA
CGTCTGCGATCCCAGTGTCAAGTTTGGCTGCAAGGACTCAGCTCGGTGCATCA
GCAAAGCGTGGGTGTGTGATGGCGACAATGACTGTGAGGATAACTCGGACGAG
GAGAACTGCGAGTCCCTGGCCTGCAGGCCACCCTCGCACCCCTTGTGCCAACAA
CACCTCAGTCTGCCTGCCCCCTGACAAGCTGTGTGATGGCAACGACGACTGTG
GCGACGGCTCAGATGAGGGCGAGCTCTGCGACCAGTGCTCTCTGAATAACGGT
GGCTGCAGCCACAACCTGCTCAGTGGCACCTGGCGAAGGCATTGTGTGTTCTG

Anhang

CCCTCTGGGCATGGAGCTGGGGCCCGACAACCACACCTGCCAGATCCAGAGCT
ACTGTGCCAAGCATCTCAAATGCAGCCAAAAGTGCGACCAGAACAAGTTCAGCG
TGAAGTGCTCCTGCTACGAGGGCTGGGTCTTGGAACCTGACGGCGAGAGCTGC
CGCAGCCTGGACCCCTTCAAGCCGTTTCATCATTTTTCTCCAACCGCCATGAAATC
CGGCGCATCGATCTTCACAAAGGAGACTACAGCGTCCTGGTGCCCGGCCTGCG
CAACACCATCGCCCTGGACTTCCACCTCAGCCAGAGCGCCCTCTACTGGACCG
ACGTGGTGGAGGACAAGATCTACCGCGGGAAGCTGCTGGACAACGGAGCCCT
GACTAGTTTTGAGGTGGTGATTGAGTATGGCCTGGCCACACCCGAGGGCCTGG
CTGTAGACTGGATTGCAGGCAACATCTACTGGGTGGAGAGTAACCTGGATCAGA
TCGAGGTGGCCAAGCTGGATGGGACCCTCCGGACCACCCTGCTGGCCGGTGA
CATTGAGCACCCAAGGGCAATCGCACTGGATCCCCGGGATGGGATCCTGTTTT
GGACAGACTGGGATGCCAGCCTGCCCCGCATTGAGGCAGCCTCCATGAGTGG
GGCTGGGCGCCGCACCGTGCACCGGGAGACCGGCTCTGGGGGCTGGCCCAA
CGGGCTCACCGTGGACTACCTGGAGAAGCGCATCCTTTGGATTGACGCCAGGT
CAGATGCCATTTACTCAGCCCGTTACGACGGCTCTGGCCACATGGAGGTGCTTC
GGGACACGAGTTCCTGTGCGACCCGTTTGAGTGACGCTGTACGGGGGGGA
GGTCTACTGGACTGACTGGCGAACAACACACTGGCTAAGGCCAACAAGTGGA
CCGGCCACAATGTCACCGTGGTACAGAGGACCAACACCCAGCCCTTTGACCTG
CAGGTGTACCACCCCTCCCGCCAGCCCATGGCTCCCAATCCCTGTGAGGCCAA
TGGGGGCCAGGGCCCCTGCTCCCACCTGTGTCTCATCAACTACAACCGGACCG
TGTCCTGCGCCTGCCCCACCTCATGAAGCTCCACAAGGACAACACCACCTGC
TATGAGTTTAAGAAGTTCCTGCTGTACGCACGTCAGATGGAGATCCGAGGTGTG
GACCTGGATGCTCCCTACTACAACACTACATCATCTCCTTCACGGTGCCCGACATC
GACAACGTCACAGTGCTAGACTACGATGCCCGCGAGCAGCGTGTGTACTGGTC
TGACGTGCGGACACAGGCCATCAAGCGGGCCTTCATCAACGGCACAGGCGTG
GAGACAGTCGTCTCTGCAGACTTGCCAAATGCCACGGGCTGGCTGTGGACTG
GGTCTCCCGAAACCTGTTCTGGACAAGCTATGACACCAATAAGAAGCAGATCAA
TGTGGCCCGGCTGGATGGCTCCTTCAAGAACGCAGTGGTGCAGGGCCTGGAG
CAGCCCATGGCCTTGTCGTCCACCCTCTGCGTGGGAAGCTCTACTGGACCGA
TGGTGACAACATCAGCATGGCCAACATGGATGGCAGCAATCGCACCCCTGCTCTT
CAGTGGCCAGAAGGGCCCCGTGGGCCTGGCTATTGACTTCCCTGAAAGCAAAC
TCTACTGGATCAGCTCCGGGAACCATAACCATCAACCGCTGCAACCTGGATGGG
AGTGGGCTGGAGGTCATCGATGCCATGCGGAGCCAGCTGGGCAAGGCCACCG
CCCTGGCCATCATGGGGGACAAGCTGTGGTGGGCTGATCAGGTGTCGGAAAAG
ATGGGCACATGCAGCAAGGCTGACGGCTCGGGCTCCGTGGTCCTTCGGAACAG

Anhang

CACCACCCTGGTGATGCACATGAAGGTCTATGACGAGAGCATCCAGCTGGACC
ATAAGGGCACCAACCCCTGCAGTGTCAACAACGGTGACTGCTCCCAGCTCTGC
CTGCCACGTCAGAGACGACCCGCTCCTGCATGTGCACAGCCGGCTATAGCCT
CCGGAGTGCCAGCAGGCCTGCGAGGGCGTAGGTTCTTTCTCCTGTACTCTG
TGCATGAGGGAATCAGGGGAATTCCCCTGGATCCCAATGACAAGTCAGATGCC
CTGGTCCCAGTGTCCGGGACCTCGCTGGCTGTCCGCATCGACTTCCACGCTGA
AAATGACACCATCTACTGGGTGGACATGGGCCTGAGCACGATCAGCCGGGCCA
AGCGGGACCAGACGTGGCGTGAAGACGTGGTGACCAATGGCATTGGCCGTGT
GGAGGGCATTGCAGTGGACTGGATCGCAGGCAACATCTACTGGACAGACCAGG
GCTTTGATGTCATCGAGGTCGCCCCGGCTCAATGGCTCCTTCCGCTACGTGGTG
ATCTCCCAGGGTCTAGACAAGCCCCGGGCCATCACCGTCCACCCGGAGAAAGG
GTACTIONTTCTGGACTGAGTGGGGTCAGTATCCGCGTATTGAGCGGTCTCGGCT
AGATGGCACGGAGCGTGTGGTGCTGGTCAACGTCAGCATCAGCTGGCCCAACG
GCATCTCAGTGGACTACCAGGATGGGAAGCTGTACTGGTGCGATGCACGGACA
GACAAGATTGAACGGATCGACCTGGAGACAGGTGAGAACCGCGAGGTGGTTCT
GTCCAGCAACAACATGGACATGTTTTTCAGTGTCTGTGTTTGAGGATTTTCATCTAC
TGGAGTGACAGGACTCATGCCAACGGCTCTATCAAGCGCGGGAGCAAAGACAA
TGCCACAGACTCCGTGCCCTGCGAACCGGCATCGGCGTCCAGCTTAAAGACA
TCAAAGTCTTCAACCGGGACCGGCAGAAAGGCACCAACGTGTGCGCGGTGGCC
AATGGCGGGTGCCAGCAGCTGTGCCTGTACCGGGGCCGTGGGCAGCGGGCCT
GCGCCTGTGCCACGGGATGCTGGCTGAAGACGGAGCATCGTGCCGCGAGTA
TGCCGGCTACCTGCTCTACTCAGAGCGCACCAATTCTCAAGAGTATCCACCTGTC
GGATGAGCGCAACCTCAATGCGCCCGTGCAGCCCTTCGAGGACCCTGAGCACA
TGAAGAACGTCATCGCCCTGGCCTTTGACTACCGGGCAGGCACCTCTCCGGGC
ACCCCAATCGCATCTTCTTCAGCGACATCCACTTTGGGAACATCCAACAGATC
AACGACGATGGCTCCAGGAGGATCACCAATTGTGGAAAACGTGGGCTCCGTGGA
AGGCCTGGCCTATCACCGTGGCTGGGACACTCTCTATTGGACAAGCTACACGA
CATCCACCATCACGCGCCACACAGTGGACCAGACCCGCCAGGGGCCTTCGAG
CGTGAGACCGTCATCACTATGTCTGGAGATGACCACCCACGGGCCTTCGTTTTG
GACGAGTGCCAGAACCTCATGTTCTGGACCAACTGGAATGAGCAGCATCCCAG
CATCATGCGGGCGGCGCTCTCGGGAGCCAATGTCCTGACCCTTATCGAGAAGG
ACATCCGTACCCCAATGGCCTGGCCATCGACCACCGTGCCGAGAAGCTCTAC
TTCTCTGACGCCACCCTGGACAAGATCGAGCGGTGCGAGTATGACGGCTCCCA
CCGCTATGTGATCCTAAAGTCAGAGCCTGTCCACCCCTTCGGGCTGGCTGTGTA
TGGGGAGCACATTTTCTGGACTGACTGGGTGCGGGCGGGCAGTGCAGCGGGCC

Anhang

AACAAGCACGTGGGCAGCAACATGAAGCTGCTGCGCGTGGACATCCCCCAGCA
GCCCATGGGCATCATCGCTGTGGCCAACGACACCAACAGCTGTGAACTCTCTC
CATGCCGAATCAACAACGGTGGCTGCCAGGACCTGTGTCTGCTCACTACCAG
GGCCATGTCAACTGCTCATGCCGAGGGGGCCGAATCCTCCAGGATGACCTCAC
CTGCCGAGCGGTGAATTCCTCTTGCCGAGCACAAGATGAGTTTGAGTGTGCCAA
TGCGGAGTGCATCAACTTCAGCCTGACCTGCGACGGCGTCCCCCACTGCAAGG
ACAAGTCCGATGAGAAGCCATCCTACTGCAACTCCCGCCGCTGCAAGAAGACTT
TCCGGCAGTGCAGCAATGGGCGCTGTGTGTCCAACATGCTGTGGTGAACGGG
GCCGACGACTGTGGGGATGGCTCTGACGAGATCCCTTGCAACAAGACAGCCTG
TGGTGTGGGCGAGTTCGCTGCCGGGACGGGACCTGCATCGGGAACTCCAGC
CGCTGCAACCAGTTTGTGGATTGTGAGGACGCCTCAGATGAGATGAACTGCAGT
GCCACCGACTGCAGCAGCTACTTCCGCCTGGGCGTGAAGGGCGTGCTCTTCCA
GCCCTGCGAGCGGACCTCACTCTGCTACGCACCCAGCTGGGTGTGTGATGGCG
CCAATGACTGTGGGGACTACAGTGATGAGCGCGACTGCCCAGGTGTGAAACGC
CCCAGATGCCCTCTGAATTACTTCGCCTGCCCTAGTGGGCGCTGCATCCCCATG
AGCTGGACGTGTGACAAAGAGGATGACTGTGAACATGGCGAGGACGAGACCCA
CTGCAACAAGTTCTGCTCAGAGGCCAGTTTGTGAGTGCCAGAACCATCGCTGCAT
CTCCAAGCAGTGGCTGTGTGACGGCAGCGATGACTGTGGGGATGGCTCAGACG
AGGCTGCTCACTGTGAAGGCAAGACGTGCGGGCCCCTCCTCCTTCTCCTGCCCT
GGCACCCACGTGTGCGTCCCCGAGCGCTGGCTCTGTGACGGTGACAAAGACTG
TGCTGATGGTGCAGACGAGAGCATCGCAGCTGGTTGCTTGTACAACAGCACTT
GTGACGACCGTGAGTTCATGTGCCAGAACCGCCAGTGCATCCCCAAGCACTTC
GTGTGTGACCACGACCGTGACTGTGCAGATGGCTCTGATGAGTCCCCCGAGTG
TGAGTACCCGACCTGCGGCCCCAGTGAGTTCGCTGTGCCAATGGGCGCTGTC
TGAGCTCCCGCCAGTGGGAGTGTGATGGCGAGAATGACTGCCACGACCAGAGT
GATGAGGCTCCCAAGAACCACACTGCACCAGCCCAGAGCACAAGTGCAATGC
CTCGTCACAGTTCCTGTGCAGCAGTGGGCGCTGTGTGGCTGAGGCACTGCTCT
GCAACGGCCAGGATGACTGTGGCGACAGCTCGGACGAGCGTGGCTGCCACAT
CAATGAGTGTCTCAGCCGAAGCTCAGTGGCTGCAGCCAGGACTGTGAGGACC
TCAAGATCGGCTTCAAGTGCCGCTGTCGCCCTGGCTTCCGGCTGAAGGACGAC
GGCCGGACGTGTGCTGATGTGGACGAGTGCAGCACCACCTTCCCCTGCAGCCA
GCGCTGCATCAACACCCATGGCAGCTATAAGTGTCTGTGTGTGGAGGGCTATG
CACCCCGCGGCGGGCAGCCCCACAGCTGCAAGGCTGGGCGCGCAACTCTGA
GTACCAGGTCTGTACATCGCTGATGACAATGAGATCCGCAGCCTGTTCCCCG
GCCACCCCATTCGGCTTACGAGCAGGCATTCCAGGGTGACGAGAGTGTCCGC

Anhang

ATTGATGCTATGGATGTCCATGTCAAGGCTGGCCGTGTCTATTGGACCAACTGG
CACACGGGCACCATCTCCTACCGCAGCCTGCCACCTGCTGCGCCTCCTACCAC
TTCCAACCGCCACCGGCGACAGATTGACCGGGGTGTCACCCACCTCAACATTT
CAGGGCTGAAGATGCCCAGAGGCATCGCCATCGACTGGGTGGCCGGAAACGT
GTA CTGGACCGACTCGGGCCGAGATGTGATTGAGGTGGCGCAGATGAAGGGC
GAGAACCGCAAGACGCTCATCTCGGGCATGATTGACGAGCCCCACGCCATTGT
GGTGGACCCACTGAGGGGGACCATGTACTGGTCAGACTGGGGCAACCACCCC
AAGATTGAGACGGCAGCGATGGATGGGACGCTTCGGGAGACACTGGTGCAGG
ACAACATTCAGTGGCCCACAGGCCTGGCCGTGGATTATCACAATGAGCGGCTG
TACTGGGCAGACGCCAAGCTTTCAGTCATCGGCAGCATCCGGCTCAATGGCAC
GGACCCCATTGTGGCTGCTGACAGCAAACGAGGCCTAAGTCACCCCTTCAGCA
TCGACGTCTTTGAGGATTACATCTATGGTGTACCTACATCAATAATCGTGTCTT
CAAGATCCATAAGTTTGGCCACAGCCCCTTGGTCAACCTGACAGGGGGCCTGA
GCCACGCCTCTGACGTGGTCCTTTACCATCAGCACAAGCAGCCCGAAGTGACC
AACCCATGTGACCGCAAGAAATGCGAGTGGCTCTGCCTGCTGAGCCCCAGTGG
GCCTGTCTGCACCTGTCCCAATGGGAAGCGGCTGGACAACGGCACATGCGTGC
CTGTGCCCTCTCCAACGCCCCCCCCAGATGCTCCCCGGCCTGGAACCTGTAAC
CTGCAGTGCTTCAACGGTGGCAGCTGTTTCCTCAATGCACGGAGGCAGCCCAA
GTGCCGCTGCCAACCCCGCTACACGGGTGACAAGTGTGAACTGGACCAGTGCT
GGGAGCACTGTCGCAATGGGGGCACCTGTGCTGCCTCCCCCTCTGGCATGCCC
ACGTGCCGGTGCCCCACGGGCTTCACGGGGCCCCAAATGCACCCAGCAGGTGT
GTGCGGGCTACTGTGCCAACACAGCACCTGCACTGTCAACCAGGGCAACCAG
CCCCAGTGCCGATGCCTACCCGGCTTCTGGGCGACCGCTGCCAGTACCGGC
AGTGCTCTGGCTACTGTGAGAACTTTGGCACATGCCAGATGGCTGCTGATGGCT
CCCGACAATGCCGCTGCACTGCCTACTTTGAGGGATCGAGGTGTGAGGTGAAC
AAGTGCAGCCGCTGTCTCGAAGGGGCCTGTGTGGTCAACAAGCAGAGTGGGGA
TGTACCTGCAACTGCACGGATGGCCGGGTGGCCCCCAGCTGTCTGACCTGCG
TCGGCCACTGCAGCAATGGCGGCTCCTGTACCATGAACAGCAAATGATGCCT
GAGTGCCAGTGCCACCCACATGACAGGGCCCCGGTGTGAGGAGCACGTCTT
CAGCCAGCAGCAGCCAGGACATATAGCCTCCATCCTAATCCCTCTGCTGTTGCT
GCTGCTGCTGGTTCTGGTGGCCGGAGTGGTATTCTGGTATAAGCGGCGAGTCC
AAGGGGCTAAGGGCTTCCAGCACCAACGGATGACCAACGGGGCCATGAACGTG
GAGATTGAAACCCACCTACAAGATGTACGAAGGCGGAGAGCCTGATGATGT
GGGAGGCCTACTGGACGCTGACTTTGCCCTGGACCCTGACAAGCCCACCAACT
TCACCAACCCCGTGTATGCCACACTCTACATGGGGGGCCATGGCAGTCGCCAC

Anhang

TCCCTGGCCAGCACGGACGAGAAGCGAGAACTCCTGGGCCGGGGCCCTGAGG
ACGAGATAGGGGACCCCTTGGCATAGGCGGCGCTTGTGTCGACAGGCCTTAATG
GCCTAACATCGATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAAT
GAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAA
GGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAAC
AGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTG
CCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGA
TATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCC
CAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGG
TGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTC
GCTTCTCGCTTCTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCA
CAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTACC
CGTGTATCCAATAAACCTCTTGCAAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTT
CTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTTCATT
TGGGGGCTCGTCCGGGATCGGGAGACCCCTGCCAGGGACCACCGACCCACC
ACCGGGAGGTAAGCTGGCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCT
CTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCG
GGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGG
GCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACT
ATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATAC
CGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCTG
CTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCCGGCTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCA
CTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAA
CATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGC
TGCGGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCT
CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTTCCC
CCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATA
CCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTTCTCATAGCTCACGCTG
TAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA
ACCCCCGTTTACGCCCAGCCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTC
CAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGA
TTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCT
AACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCA
GTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCT
GGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGA

Anhang

TCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAA
AACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGA
TCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTT
GGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTC
TATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACG
GGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCT
CACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGC
AGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGG
GAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATT
GCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCC
GGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCG
GTTAGCTCCTTCGGTCCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTA
TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAA
GATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTAT
GCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCAC
ATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAAC
CTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACC
CAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACA
GGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAAT
ACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCA
TGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCGCG
CACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACA
TTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCATAC
CAGATCACCGAAAACGTCTCCTCAAATGTGTCCCCCTCACACTCCCAAATTCGC
GGGCTTCTGCCTCTTAGACCACTCTACCCTATTCCCCACACTCACCGGAGCCAA
AGCCGCGGCCCTTCCGTTTCTTTGCT

In rot: Restriktionsschnittstellen

In gelb: zusätzlich an Primer angefügte Sequenzen

8.4.2 LRP1 Domäne II-IV

TTTGAAAGACCCACCCGTAGGTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCACTTTGCA
AGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAA
CAAAGAAACAGCTGAATACCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCGGTTCTGCCCC
GGCTCAGGGCCAAGAACAGATGAGACAGCTGAGTGATGGGCCAAACAGGATAT
CTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCGGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAG
ATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGTGAATCATCAGATGTTTCCAGGGTGC

Anhang

CCCAAGGACCTGAAAATGACCCTGTACCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCT
TCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCCGCTCTCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAA
CCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCTTCCGATAGACTGCGTCGCCCGGGTACCCGT
ATTCCCAATAAAGCCTCTTGCTGTTTGCATCCGAATCGTGGTCTCGCTGTTCTT
GGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCACGACGGGGGTCTTTCATTTGG
GGGCTCGTCCGGGATTTGGAGACCCCTGCCAGGGACCACCGACCCACCACC
GGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTATCTGTGTCTGTCCGATTGTCTAGTGTCTA
TGTTTGATGTTATGCGCCTGCGTCTGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATCTG
GCGGACCCGTGGTGGAAGTACGAGTTCTGAACACCCGGCCGCAACCCTGGG
AGACGTCCCAGGGACTTTGGGGGCCGTTTTTGTGGCCCGACCTGAGGAAGGGA
GTGCATGTGGAATCCGACCCCGTCAGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGA
ACCTAAAACAGTTCCCGCCTCCGTCTGAATTTTTGCTTTCGGTTTGAACCGAAG
CCGCGCGTCTTGTCTGCTGCAGCGCTGCAGCATCGTTCTGTGTTGTCTCTGTCT
GACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAATTAGGGCCAGACTGTTACCACTCCCTTA
AGTTTGACCTTAGGTCAGTGGAAAGATGTCGAGCGGATCGCTCACAACCAGTCG
GTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCTTCTGCTCTGCAGAATGGCCAACC
TTTAACGTCCGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTAACCGAGACCTCATCACCCA
GGTTAAGATCAAGGTCTTTTACCTGGCCCGCATGGACACCCAGACCAGGTCC
CCTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTACCCCCCTCCCTGGGTCAAG
CCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCCTCCTCTTCCATCCGCCCCGTCTCTC
CCCCTTGAACCTCCTCGTTCCGACCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTC
ACTCCTTCTCTAGGCGCCGGAATTCGATCTGATCCATGGCCAAGCCTTTGTCT
CAAGAAGAATCCACCCTCATTGAAAGAGCAACGGCTACAATCAACAGCATCCCC
ATCTCTGAAGACTACAGCGTCGCCAGCGCAGCTCTCTCTAGCGACGGCCGCAT
CTTCACTGGTGTCAATGTATATCATTTTACTGGGGGACCTTGTGCAGAACTCGTG
GTGCTGGGCACTGCTGCTGCTGCGGCAGCTGGCAACCTGACTTGTATCGTCGC
GATCGGAAATGAGAACAGGGGCATCTTGAGCCCCTGCGGACGGTGCCGACAG
GTGCTTCTCGATCTGCATCCTGGGATCAAAGCCATAGTGAAGGACAGTGATGGA
CAGCCGACGGCAGTTGGGATTCGTGAATTGCTGCCCTCTGGTTATGTGTGGGA
GGGCTAAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCT
GCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTG
GCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGAT
ATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGG
TATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTT
CTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGT

Anhang

TCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCC
TGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC
CATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACG
GTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC
TATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGAC
CTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACC
ATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCA
CGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCAC
CAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAA
ATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTGTAGT
GAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCGGATGCTGAC
CCCGCCGTTGCTCCTGCTGCTGCCCTGCTCTCAGCTCTGGTCGCGGCGGCTA
TCGACGCCCTGGCGCGCCAGTTGGCACCAACAAATGCCGGGTGAACAATGGC
GGCTGCAGCAGCCTGTGCTTGGCCACCCCTGGGAGCCGCCAGTGCGCCTGTG
CTGAGGACCAGGTGTTGGACGCAGACGGCGTCACTTGCTTGGCGAACCCATCC
TACGTGCCTCCACCCAGTGCCAGCCAGGCGAGTTTGCCTGTGCCAACAGCCG
CTGCATCCAGGAGCGCTGGAAGTGTGACGGAGACAACGATTGCCTGGACAACA
GTGATGAGGCCCCAGCCCTCTGCCATCAGCACACCTGCCCTCGGACCGATTCC
AAGTGCGAGAACAACCGGTGCATCCCCAACCGCTGGCTCTGCGACGGGGACAA
TGACTGTGGGAACAGTGAAGATGAGTCCAATGCCACTTGTTTCAGCCCGCACCTG
CCCCCCAACCAGTTCTCCTGTGCCAGTGGCCGCTGCATCCCCATCTCCTGGA
CGTGTGATCTGGATGACGACTGTGGGGACCGCTCTGATGAGTCTGCTTCGTGT
GCCTATCCCACCTGCTTCCCCCTGACTCAGTTTACCTGCAACAATGGCAGATGT
ATCAACATCAACTGGAGATGCGACAATGACAATGACTGTGGGGACAACAGTGAC
GAAGCCGGCTGCAGCCACTCCTGTTCTAGCACCCAGTTCAAGTGCAACAGCGG
GCGTTGCATCCCCGAGCACTGGACCTGCGATGGGGACAATGACTGCGGAGACT
ACAGTGATGAGACACACGCCAACTGCACCAACCAGGCCACGAGGCCCCCTGGT
GGCTGCCCACTGATGAGTTCCAGTGCCGGCTGGATGGACTATGCATCCCCCT
GCGGTGGCGCTGCGATGGGGACACTGACTGCATGGACTCCAGCGATGAGAAG
AGCTGTGAGGGAGTGACCCACGTCTGCGATCCCAGTGTCAAGTTTGGCTGCAA
GGACTCAGCTCGGTGCATCAGCAAAGCGTGGGTGTGTGATGGCGACAATGACT
GTGAGGATAACTCGGACGAGGAGAACTGCGAGTCCCTGGCCTGCAGGCCACC
CTCGCACCCCTTGTGCCAACAACACCTCAGTCTGCCTGCCCCCTGACAAGCTGTG
TGATGGCAACGACGACTGTGGCGACGGCTCAGATGAGGGCGAGCTCTGCGAC
CAGTGCTCTCTGAATAACGGTGGCTGCAGCCACAACCTGCTCAGTGGCACCTGG

Anhang

CGAAGGCATTGTGTGTTCTGCCCCTCTGGGCATGGAGCTGGGGCCCGACAACC
ACACCTGCCAGATCCAGAGCTACTGTGCCAAGCATCTCAAATGCAGCCAAAAGT
GCGACCAGAACAAGTTCAGCGTGAAGTGCTCCTGCTACGAGGGCTGGGTCTCTG
GAACCTGACGGCGAGAGCTGCCGCAGCCTGGACCCCTTCAAGCCGTTTCATCAT
TTTCTCCAACCGCCATGAAATCCGGCGCATCGATCTTCACAAAGGAGACTACAG
CGTCCTGGTGCCCGGCCTGCGCAACACCATCGCCCTGGACTTCCACCTCAGCC
AGAGCGCCCTCTACTGGACCGACGTGGTGGAGGACAAGATCTACCGCGGGAA
GCTGCTGGACAACGGAGCCCTGACTAGTTTCGAGGTGGTGATTGAGTATGGCC
TGCCACACCCGAGGGCCTGGCTGTAGACTGGATTGCAGGCAACATCTACTGG
GTGGAGAGTAACCTGGATCAGATCGAGGTGGCCAAGCTGGATGGGACCCTCCG
GACCACCCTGCTGGCCGGTGACATTGAGCACCCAAGGGCAATCGCACTGGATC
CCCGGGATGGGATCCTGTTTTGGACAGACTGGGATGCCAGCCTGCCCCGCATT
GAGGCAGCCTCCATGAGTGGGGCTGGGCGCCGCACCGTGCACCGGGAGACCG
GCTCTGGGGGCTGGCCCAACGGGCTCACCGTGGACTACCTGGAGAAGCGCAT
CCTTTGGATTGACGCCAGGTCAGATGCCATTTACTCAGCCCGTTACGACGGCTC
TGCCACATGGAGGTGCTTCGGGGACACGAGTTCCTGTGCGACCCGTTTGCAG
TGACGCTGTACGGGGGGGAGGTCTACTGGACTGACTGGCGAACAACACACTG
GCTAAGGCCAACAAGTGGACCGGCCACAATGTCACCGTGGTACAGAGGACCAA
CACCCAGCCCTTTGACCTGCAGGTGTACCACCCCTCCCGCCAGCCCATGGCTC
CCAATCCCTGTGAGGCCAATGGGGGCCAGGGCCCCTGCTCCACCTGTGTCTC
ATCAACTACAACCGGACCGTGTCTGCGCCTGCCCCACCTCATGAAGCTCCA
CAAGGACAACACCACCTGCTATGAGTTTAAGAAGTTCCTGCTGTACGCACGTCA
GATGGAGATCCGAGGTGTGGACCTGGATGCTCCCTACTACAACACTACATCATCTC
CTTACGGTGCCCGACATCGACAACGTACAGTGCTAGACTACGATGCCCGCG
AGCAGCGTGTGTACTGGTCTGACGTGCGGACACAGGCCATCAAGCGGGCCTTC
ATCAACGGCACAGGCGTGGAGACAGTCGTCTCTGCAGACTTGCCAAATGCCCA
CGGGCTGGCTGTGGACTGGGTCTCCCGAAACCTGTTCTGGACAAGCTATGACA
CCAATAAGAAGCAGATCAATGTGGCCCGGCTGGATGGCTCCTTCAAGAACGCA
GTGGTGCAGGGCCTGGAGCAGCCCATGGCCTTGTGTCGCCACCTCTGCGTG
GGAAGCTCTACTGGACCGATGGTGACAACATCAGCATGGCCAACATGGATGGC
AGCAATCGCACCCCTGCTCTTCAAGTGGCCAGAAGGGCCCCGTGGGCCTGGCTAT
TGACTTCCCTGAAAGCAAACCTACTGGATCAGCTCCGGGAACCATAACCATCAA
CCGCTGCAACCTGGATGGGAGTGGGCTGGAGGTCATCGATGCCATGCGGAGC
CAGCTGGGCAAGGCCACCGCCCTGGCCATCATGGGGGACAAGCTGTGGTGGG
CTGATCAGGTGTGCGAAAAGATGGGCACATGCAGCAAGGCTGACGGCTCGGGC

Anhang

TCCGTGGTCCTTCGGAACAGCACACCACCCTGGTGATGCACATGAAGGTCTATGAC
GAGAGCATCCAGCTGGACCATAAGGGCACCAACCCCTGCAGTGTCAACAACGG
TGA CTGCTCCCAGCTCTGCCTGCCACGTCAGAGACGACCCGCTCCTGCATGT
GCACAGCCGGCTATAGCCTCCGGAGTGGCCAGCAGGCCTGCGAGGGCGTAGG
TTCCTTTCTCCTGTACTCTGTGCATGAGGGAATCAGGGGAATTCCCCTGGATCC
CAATGACAAGTCAGATGCCCTGGTCCCAGTGTCCGGGACCTCGCTGGCTGTCCG
GCATCGACTTCCACGCTGAAAATGACACCATCTACTGGGTGGACATGGGCCTGA
GCACGATCAGCCGGGCCAAGCGGGACCAGACGTGGCGTGAAGACGTGGTGAC
CAATGGCATTGGCCGTGTGGAGGGCATTGCAGTGGACTGGATCGCAGGCAACA
TCTACTGGACAGACCAGGGCTTTGATGTCATCGAGGTCGCCCGGCTCAATGGC
TCCTTCCGCTACGTGGTGATCTCCAGGGTCTAGACAAGCCCCGGGCCATCAC
CGTCCACCCGGAGAAAGGGTACTTGTCTGGACTGAGTGGGGTCAGTATCCGC
GTATTGAGCGGTCTCGGCTAGATGGCACGGAGCGTGTGGTGCTGGTCAACGTC
AGCATCAGCTGGCCCAACGGCATCTCAGTGGACTACCAGGATGGGAAGCTGTA
CTGGTGCGATGCACGGACAGACAAGATTGAACGGATCGACCTGGAGACAGGTG
AGAACCGCGAGGTGGTTCTGTCCAGCAACAACATGGACATGTTTTCAGTGTCTG
TGTTTGAGGATTTTCATCTACTGGAGTGACAGGACTCATGCCAACGGCTCTATCA
AGCGCGGGAGCAAAGACAATGCCACAGACTCCGTGCCCTGCGAACCGGCATC
GGCGTCCAGCTTAAAGACATCAAAGTCTTCAACCGGGACCGGCAGAAAGGCAC
CAACGTGTGCGCGGTGGCCAATGGCGGGTGCCAGCAGCTGTGCCTGTACCGG
GGCCGTGGGCAGCGGGCCTGCGCCTGTGCCACGGGATGCTGGCTGAAGACG
GAGCATCGTGCCGCGAGTATGCCGGCTACCTGCTCTACTCAGAGCGCACCAATT
CTCAAGAGTATCCACCTGTCCGATGAGCGCAACCTCAATGCGCCCCGTGCAGCC
CTTCGAGGACCCTGAGCACATGAAGAACGTCATCGCCCTGGCCTTTGACTACC
GGGCAGGCACCTCTCCGGGCACCCCAATCGCATCTTCTTCAGCGACATCCAC
TTTGGGAACATCCAACAGATCAACGACGATGGCTCCAGGAGGATCACCATTGTG
GAAAACGTGGGCTCCGTGGAAGGCCTGGCCTATCACCGTGGCTGGGACACTCT
CTATTGGACAAGCTACACGACATCCACCATCACGCGCCACACAGTGGACCAGA
CCCGCCCAGGGGCCTTCGAGCGTGAGACCGTCATCACTATGTCTGGAGATGAC
CACCCACGGGCCTTCGTTTTGGACGAGTGCCAGAACCTCATGTTCTGGACCAAC
TGGAATGAGCAGCATCCCAGCATCATGCGGGCGGCGCTCTCGGGAGCCAATGT
CCTGACCCTTATCGAGAAGGACATCCGTACCCCAATGGCCTGGCCATCGACC
ACCGTGCCGAGAAGCTCTACTTCTCTGACGCCACCCTGGACAAGATCGAGCGG
TGCGAGTATGACGGCTCCCACCGCTATGTGATCCTAAAGTCAGAGCCTGTCCAC
CCCTTCGGGCTGGCTGTGTATGGGGAGCACATTTTCTGGACTGACTGGGTGCG

Anhang

GCGGGCAGTGCAGCGGGCCAACAAGCACGTGGGCAGCAACATGAAGCTGCTG
CGCGTGGACATCCCCAGCAGCCCATGGGCATCATCGCTGTGGCCAACGACAC
CAACAGCTGTGAACTCTCTCCATGCCGAATCAACAACGGTGGCTGCCAGGACCT
GTGTCTGCTCACTCACCAGGGCCATGTCAACTGCTCATGCCGAGGGGGCCGAA
TCCTCCAGGATGACCTCACCTGCCGAGCGGTGAATTCCTCTTGCCGAGCACAA
GATGAGTTTGAGTGTGCCAATGGCGAGTGCATCAACTTCAGCCTGACCTGCGAC
GGCGTCCCCACTGCAAGGACAAGTCCGATGAGAAGCCATCCTACTGCAACTC
CCGCCGCTGCAAGAAGACTTTCGGCAGTGCAGCAATGGGCGCTGTGTGTCCA
ACATGCTGTGGTGCAACGGGGCCGACGACTGTGGGGATGGCTCTGACGAGATC
CCTTGCAACAAGACAGCCTGTGGTGTGGGCGAGTTCCGCTGCCGGGACGGGA
CCTGCATCGGGAACTCCAGCCGCTGCAACCAGTTTGTGGATTGTGAGGACGCC
TCAGATGAGATGAACTGCAGTGCCACCGACTGCAGCAGCTACTTCCGCCTGGG
CGTGAAGGGCGTGCTCTTCCAGCCCTGCGAGCGGACCTCACTCTGCTACGCAC
CCAGCTGGGTGTGTGATGGCGCCAATGACTGTGGGGACTACAGTGATGAGCGC
GACTGCCCAGGTGTGAAACGCCCCAGATGCCCTCTGAATTACTTCGCCTGCCCT
AGTGGGCGCTGCATCCCCATGAGCTGGACGTGTGACAAAGAGGATGACTGTGA
ACATGGCGAGGACGAGACCCACTGCAACAAGTTCTGCTCAGAGGCCCAGTTTG
AGTGCCAGAACCATCGCTGCATCTCCAAGCAGTGGCTGTGTGACGGCAGCGAT
GACTGTGGGGATGGCTCAGACGAGGCTGCTCACTGTGAAGGCAAGACGTGCG
GCCCCTCCTCCTTCTCCTGCCCTGGCACCCACGTGTGCGTCCCCGAGCGCTGG
CTCTGTGACGGTGACAAAGACTGTGCTGATGGTGCAGACGAGAGCATCGCAGC
TGTTGCTTGTACAACAGCACTTGTGACGACCGTGAGTTCATGTGCCAGAACCG
CCAGTGCATCCCCAAGCACTTCGTGTGTGACCACGACCGTGACTGTGCAGATG
GCTCTGATGAGTCCCCCGAGTGTGAGTACCCGACCTGCGGCCCCAGTGAGTTC
CGCTGTGCCAATGGGCGCTGTCTGAGCTCCCGCCAGTGGGAGTGTGATGGCG
AGAATGACTGCCACGACCAGAGTGATGAGGCTCCCAAGAACCCACACTGCACC
AGCCCAGAGCACAAGTGCAATGCCTCGTCACAGTTCCTGTGCAGCAGTGGGCG
CTGTGTGGCTGAGGCACTGCTCTGCAACGGCCAGGATGACTGTGGCGACAGCT
CGGACGAGCGTGGCTGCCACATCAATGAGTGTCTCAGCCGCAAGCTCAGTGGC
TGCAGCCAGGACTGTGAGGACCTCAAGATCGGCTTCAAGTGCCGCTGTCGCCC
TGGCTTCCGGCTGAAGGACGACGGCCGGACGTGTGCTGATGTGGACGAGTGC
AGCACCACCTTCCCCTGCAGCCAGCGCTGCATCAACACCCATGGCAGCTATAA
GTGTCTGTGTGTGGAGGGCTATGCACCCCGCGGGCGGCGACCCCCACAGCTGC
AAGGCTGTGACTGACGAGGAACCGTTTCTGATCTTCGCCAACCGGTACTACCTG
CGCAAGCTCAACCTGGACGGGTCCAACACTACACGTTACTTAAGCAGGGCCTGAA

Anhang

CAACGCCGTTGCCTTGGATTTTACTACCGAGAGCAGATGATCTACTGGACAGA
TGTGACCACCCAGGGCAGCATGATCCGAAGGATGCACCTTAACGGGAGCAATG
TGCAGGTCCTACACCGTACAGGCCTCAGCAACCCCGATGGGCTGGCTGTGGAC
TGGGTGGGTGGCAACCTGTACTGGTGCGACAAAGGCCGGGACACCATCGAGG
TGTCCAAGCTCAATGGGGCCTATCGGACGGTGCTGGTCAGCTCTGGCCTCCGT
GAGCCCAGGGCTCTGGTGGTGGATGTGCAGAATGGGTACCTGTACTGGACAGA
CTGGGGTGACCATTCACTGATCGGCCGCATCGGCATGGATGGGTCCAGCCGCA
GCGTCATCGTGGACACCAAGATCACATGGCCCAATGGCCTGACGCTGGACTAT
GTCACTGAGCGCATCTACTGGGCCGACGCCCGCGAGGACTACATTGAATTTGC
CAGCCTGGATGGCTCCAATCGCCACGTTGTGCTGAGCCAGGACATCCCGCACA
TCTTTGCACTGACCCTGTTTGAGGACTACGTCTACTGGACCGACTGGGAAACAA
AGTCCATTAACCGAGCCCACAAGACCACAGGCACCAACAAAACGCTCCTCATCA
GCACGCTGCACCGGCCCATGGACCTGCATGTCTTCCATGCCCTGCGCCAGCCA
GACGTGCCCAATCACCCCTGCAAGGTCAACAATGGTGGCTGCAGCAACCTGTG
CCTGCTGTCCCCCGGGGAGGGCACAATGTGCCTGCCCCACCAACTTCTACC
TGGGCAGCGATGGGCGCACCTGTGTGTCCAAGTGCACGGCTAGCCAGTTTGTA
TGCAAGAACGACAAGTGCATCCCCTTCTGGTGGAAGTGTGACACCGAGGACGA
CTGCGGGGACCACTCAGACGAGCCCCGGACTGCCCTGAGTTCAAGTGCCGG
CCCGGACAGTTCCAGTGCTCCACAGGTATCTGCACAAACCCTGCCTTCATCTGC
GATGGCGACAATGACTGCCAGGACAACAGTGACGAGGCCAACTGTGACATCCA
CGTCTGCTTGCCCAGTCAGTTCAAATGCACCAACACCAACCGCTGTATTCCCGG
CATCTTCCGCTGCAATGGGCAGGACAACCTGCGGAGATGGGGAGGATGAGAGG
GACTGCCCCGAGGTGACCTGCGCCCCCAACCAGTTCCAGTGCTCCATTACCAA
ACGGTGCATCCCCCGGGTCTGGGTCTGCGACCGGGACAATGACTGTGTGGATG
GCAGTGATGAGCCCGCCAACTGCACCCAGATGACCTGTGGTGTGGACGAGTTC
CGCTGCAAGGATTCGGGCCGCTGCATCCCAGCGCGTTGGAAGTGTGACGGAG
AGGATGACTGTGGGGATGGCTCGGATGAGCCCAAGGAAGAGTGTGATGAACGC
ACCTGTGAGCCATACCAGTTCCGCTGCAAGAACAACCGCTGCGTGCCCCGGCCG
CTGGCAGTGCGACTACGACAACGATTGCGGTGACAACCTCCGATGAAGAGAGCT
GCACCCCTCGGCCCTGCTCCGAGAGTGAGTTCTCCTGTGCCAACGGCCGCTGC
ATCGCGGGGCGCTGGAAATGCGATGGAGACCACGACTGCGCGGACGGCTCGG
ACGAGAAAGACTGCACCCCCGCTGTGACATGGACCAGTTCCAGTGCAAGAGC
GGCCACTGCATCCCCCTGCGCTGGCGCTGTGACGCAGACGCCGACTGCATGG
ACGGCAGCGACGAGGAGGCCTGCGGCACTGGCGTGCGGACCTGCCCCCTGGA
CGAGTTCCAGTGCAACAACACCTTGTGCAAGCCGCTGGCCTGGAAGTGCGATG

Anhang

GCGAGGATGACTGTGGGGACAACCTCAGATGAGAACCCCGAGGAGTGTGCCCG
GTTTCGTGTGCCCTCCCAACCGGCCCTTCCGTTGCAAGAATGACCGCGTCTGTCT
GTGGATCGGGCGCCAATGCGATGGCACGGACAACCTGTGGGGATGGGACTGAT
GAAGAGGACTGTGAGCCCCCACAGCCACACCACCCACTGCAAAGACAAGAA
GGAGTTTCTGTGCCGGAACCAGCGCTGCCTCTCCTCCTCCCTGCGCTGCAACA
TGTTTCGATGACTGCGGGGACGGCTCTGACGAGGAGGACTGCAGCATCGACCCC
AAGCTGACCAGCTGCGCCACCAATGCCAGCATCTGTGGGGACGAGGCACGCTG
CGTGCGCACCGAGAAAGCGGCCCTACTGTGCCTGCCGCTCGGGCTTCCACACC
GTGCCCGGCCAGCCCGGATGCCAAGACATCAACGAGTGCCTGCGCTTCGGCA
CCTGCTCCCAGCTCTGCAACAACACCAAGGGCGGCCACCTCTGCAGCTGCGCT
CGGAAC TTCATGAAGACGCACAACACCTGCAAGGCCGAAGGCTCTGAGTACCA
GGTCCTGTACATCGCTGATGACAATGAGATCCGCAGCCTGTTCCCCGGCCACC
CCCATTTCGGCTTACGAGCAGGCATTCCAGGGTGACGAGAGTGTCCGCATTGAT
GCTATGGATGTCCATGTCAAGGCTGGCCGTGTCTATTGGACCAACTGGCACAC
GGGCACCATCTCCTACCGCAGCCTGCCACCTGCTGCGCCTCCTACCACTTCCA
ACCGCCACCGGCGACAGATTGACCGGGGTGTCACCCACCTCAACATTTAGGG
CTGAAGATGCCAGAGGCATCGCCATCGACTGGGTGGCCGAAACGTGTACTG
GACCGACTCGGGCCGAGATGTGATTGAGGTGGCGCAGATGAAGGGCGAGAAC
CGCAAGACGCTCATCTCGGGCATGATTGACGAGCCCCACGCCATTGTGGTGGA
CCC ACTGAGGGGGACCATGTACTGGTCAGACTGGGGCAACCACCCCAAGATTG
AGACGGCAGCGATGGATGGGACGCTTCGGGAGACACTGGTGCAGGACAACATT
CAGTGGCCACAGGCCTGGCCGTGGATTATCACAATGAGCGGCTGTACTGGGC
AGACGCCAAGCTTTTCAGTCATCGGCAGCATCCGGCTCAATGGCACGGACCCCA
TTGTGGCTGCTGACAGCAAACGAGGCCTAAGTCACCCCTTCAGCATCGACGTCT
TTGAGGATTACATCTATGGTGTACCTACATCAATAATCGTGTCTTCAAGATCCA
TAAGTTTGGCCACAGCCCCTTGGTCAACCTGACAGGGGGCCTGAGCCACGCCT
CTGACGTGGTCCTTTACCATCAGCACAAGCAGCCCGAAGTGACCAACCCATGTG
ACCGCAAGAAATGCGAGTGGCTCTGCCTGCTGAGCCCCAGTGGGCCTGTCTGC
ACCTGTCCCAATGGGAAGCGGCTGGACAACGGCACATGCGTGCCTGTGCCCTC
TCCAACGCCCCCCCAGATGCTCCCCGGCCTGGAACCTGTAACCTGCAGTGCT
TCAACGGTGGCAGCTGTTTCCTCAATGCACGGAGGCAGCCCAAGTGCCGCTGC
CAACCCCGCTACACGGGTGACAAGTGTGAACTGGACCAGTGCTGGGAGCACTG
TCGCAATGGGGGCACCTGTGCTGCCTCCCCCTCTGGCATGCCACGTGCCGGT
GCCCCACGGGCTTCACGGGCCCCAAATGCACCCAGCAGGTGTGTGCGGGCTA
CTGTGCCAACAACAGCACCTGCACTGTCAACCAGGGCAACCAGCCCCAGTGCC

Anhang

GATGCCTACCCGGCTTCCTGGGCGACCGCTGCCAGTACCCGGCAGTGCTCTGGC
TACTGTGAGAACTTTGGCACATGCCAGATGGCTGCTGATGGCTCCCGACAATGC
CGCTGCACTGCCTACTTTGAGGGATCGAGGTGTGAGGTGAACAAGTGCAGCCG
CTGTCTCGAAGGGGCCTGTGTGGTCAACAAGCAGAGTGGGGATGTCACCTGCA
ACTGCACGGATGGCCGGGTGGCCCCAGCTGTCTGACCTGCGTCGGCCACTG
CAGCAATGGCGGCTCCTGTACCATGAACAGCAAAATGATGCCTGAGTGCCAGT
GCCACCCACATGACAGGGCCCCGGTGTGAGGAGCACGTCTTCAGCCAGCA
GCAGCCAGGACATATAGCCTCCATCCTAATCCCTCTGCTGTTGCTGCTGCTGCT
GGTTCTGGTGGCCGGAGTGGTATTCTGGTATAAGCGGCGAGTCCAAGGGGCTA
AGGGCTTCCAGCACCAACGGATGACCAACGGGGCCATGAACGTGGAGATTGGA
AACCCACCTACAAGATGTACGAAGGCGGAGAGCCTGATGATGTGGGAGGCCT
ACTGGACGCTGACTTTGCCCTGGACCCTGACAAGCCCACCAACTTCACCAACCC
CGTGTATGCCACACTCTACATGGGGGGCCATGGCAGTCGCCACTCCCTGGCCA
GCACGGACGAGAAGCGAGAACTCCTGGGCGGGGCCCTGAGGACGAGATAGG
GGACCCCTTGGCATAGGCGGCGCTTGTGCGACAGGCCTTAATGGCCTAACATC
GATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCC
ACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAA
AATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACA
GCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCA
GGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGT
AAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGT
CCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGG
ACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTT
CTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCAC
TCGGGGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAA
TAAACCCTCTTGCAAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCCTGGGAGGGT
CTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCAATTTGGGGGCTCGT
CCGGGATCGGGAGACCCCTGCCAGGGACCACCGACCCACCACCGGGAGGTA
AGCTGGCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGTGACGGTGAAAACCTCTGACACATGC
AGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAA
GCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGCAGCCATGA
CCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGA
GCAGATTGTAAGTGTGACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGT
AAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCT
GCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAA

Anhang

TACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG
GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCAT
AGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCC
TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTC
TCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTT
CGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAG
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGA
CACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAG
GTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAC
TAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAA
AAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTT
TTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCC
TTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGG
GATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA
AATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTAC
CAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCA
TAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT
CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGAT
TTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGC
AACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGT
AGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTG
GTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCA
AGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGT
CCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAAGTGTATCACTCATGGTTATG
GCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGA
CTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTT
GCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAA
AAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTAC
CGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAG
CATCTTTTACTTTACCCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCCAAAATG
CCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCC
TTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATA
TTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAA
AAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAA

Anhang

TAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCATACCAGATCACCGAAA
ACTGTCCTCCAAATGTGTCCCCCTCACACTCCCAAATTCGCGGGCTTCTGCCTC
TTAGACCACTCTACCCTATTCCCCACACTCACCGGAGCCAAAGCCGCGGCCCTT
CCGTTTCTTTGCT

In rot: Restriktionsschnittstellen

In gelb: zusätzlich an Primer angefügte Sequenzen

Anhang

8.5 Genehmigungen für Abbildungen aus Publikationen

Aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Version entfernt.

Publikationen

1. The concerted amyloid-beta clearance of LRP1 and ABCB1/P-gp across the blood-brain barrier is linked by PICALM

*Steffen E Storck, Anika M S Hartz, Jessica Bernard, Andrea Wolf, **André Kachlmeier**, Anne Mahringer, Sascha Weggen, Jens Pahnke, Claus U Pietrzik*

*Brain, Behavior, and Immunity, 2018 Oct;73:21-33. doi: 10.1016/j.bbi.2018.07.017. Epub 2018 Jul 21 (IF 2018: 6,17; **Habilitationswert A**)*

Kongressbeiträge

1. "The A η - α peptid impairs LRP1-dependent Amyloid β clearance at the BBB"
21. Barriere- und Transporter Tage, Bad Herrenalb, Deutschland, 05/2019
2. "The A η - α Peptide: A New Ligand For The LRP1 Receptor"
11th Tschagguns Meeting "Cellular And Molecular Processes In Neurodegenerative Diseases", Tschagguns, Österreich, 01/2019
3. „A mechanistic Analysis Of The A η - Peptide Uptake Via The LRP1 Receptor At The Blood Brain Barrier"
10th Tschagguns Meeting „Cellular And Molecular Processes In Neurodegenerative Diseases“, Tschagguns, Österreich, 01/2018

Danksagung

Danksagung

Aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Version entfernt.

Tabellarischer Lebenslauf

Tabellarischer Lebenslauf

Aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Version entfernt.