

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

Interaktionen des ABC-Transporters und des Rezeptors LRP1 für die
beta-Amyloid-Transzytose über die Blut-Hirn-Schranke

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

Vorgelegt von

Jessica Bernard
aus Hermeskeil

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

16. März 2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Morbus Alzheimer ist eine schwere, neurodegenerative Demenzerkrankung	1
1.2 Die Akkumulation von A β korreliert mit Demenz	1
1.3 Der Großteil der A β -Clearance erfolgt über die Blut-Hirn-Schranke	2
1.4 Die Endothelzellschicht kontrolliert den Stoffaustausch über die Blut-Hirn-Schranke	2
1.5 Der abluminale Rezeptor LRP1 ist ein zentrales Transportprotein der A β -Clearance	4
1.6 PICALM vermittelt den Eintritt von A β in das endosomale System	4
1.7 Rab 11-positive Endosomen stellen ein zentrales Kompartiment der A β -Transzytose dar ..	5
1.8 Der luminale ABC-Transporter P-gp vermittelt den A β -Efflux in das vaskuläre System	6
1.9 Zielsetzung der Arbeit	7
2 Material	8
2.1 Primer	8
2.2 Molekulargenetische Ansätze zur Plasmidherstellung	8
2.3 Zellen	9
2.4 Zellkulturmedien	10
2.5 Antikörper	11
2.6 Enzyme	12
3 Methoden	13
3.1 Molekulargenetische Methoden zur Plasmidherstellung	13
3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	13
3.1.2 Restriktionsverdau	14
3.1.3 Dephosphorylierung	14
3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese	14
3.1.5 Assemblierung der Plasmid- und der <i>Insert</i> -DNA	15
3.1.6 Transformation	15
3.1.7 Minipräparation	15
3.1.8 Midipräparation	15

3.1.9	Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung	16
3.2	Zellkultur.....	16
3.3	Transiente Transfektion	16
3.3.1	Transfektion mit <i>PEI MAX</i>	17
3.3.2	Transfektion mit <i>X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent</i>	17
3.3.3	Transfektion mit <i>Lipofectamine LTX</i> und <i>FuGENE HD</i>	17
3.4	Immunpräzipitation.....	17
3.4.1	A β -Stimulation	17
3.4.2	Immunpräzipitation	17
3.5	Immunzytochemie	18
3.5.1	Immunzytochemische Färbemethode	18
3.5.2	Lasermikroskopische Auswertung.....	18
3.6	Molekularbiochemische Proteinnachweismethoden.....	19
3.6.1	Zellyse.....	19
3.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	19
3.6.3	Immunoblot	19
3.6.4	Reversible Ponceau S-Färbung	20
3.6.5	Blockieren	20
3.6.6	Immundetektion	20
3.6.7	Statistische Auswertung	20
4	Ergebnisse	22
4.1	Klonierung der P-gp-Plasmide.....	22
4.2	Expressionelle Verbindung zwischen P-gp und LRP1	24
4.2.1	Expression und Detektion des ABC-Transporters P-gp.....	24
4.2.2	P-gp-Überexpression führt zu gesteigerter LRP1-Expression	25
4.3	Räumliche Beziehung von P-gp und LRP1	30
4.3.1	P-gp und LRP1 co-lokalisieren intrazellulär	31
4.3.2	Die Co-Lokalisation von P-gp und LRP1 findet in <i>Sorting</i> -Endosomen statt	32
4.3.3	P-gp und LRP1 werden Clathrin-vermittelt endozytiert	33
4.4	Funktionelle Zusammenarbeit von P-gp und LRP1 in der endothelialen A β -Transzytose..	34
4.4.1	Assoziation von PICALM mit P-gp und LRP1	34
4.4.2	Pathophysiologische Konzentrationen von A β verstärken die Interaktion von PICALM mit P-gp, LRP1 und Rab 11.....	35

4.4.3	Immunzytochemischer Nachweis von P-gp und LRP1 in bEnd.3-Zellen	37
5	Diskussion.....	39
5.1	Überexpression von P-gp führt zu gesteigerter LRP1-Menge.....	39
5.2	<i>Sorting</i> -Endosomen: Kompartiment der Co-Lokalisation von P-gp und LRP1	42
5.3	Zellmembranständiges P-gp und LRP1 unterliegen Clathrin-vermittelter Endozytose	44
5.4	PICALM - Mediator der P-gp/LRP1-Interaktion im endothelialen A β -Transport.....	45
5.5	Immunzytochemie bestätigt die intrazelluläre Co-Lokalisation von P-gp und LRP1 in primären zerebralen Kapillaren der Maus	49
6	Zusammenfassung.....	50
7	Literatur.....	53
8	Anhang	69
8.1	Vektorkarten.....	69
8.2	Immunoblots der Immunpräzipitationen von P-gp und LRP1 aus bEnd.3-Zelllysaten mit CHAPS- und NP40-Lysepuffer	72

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	<i>Adenosine-triphosphate-binding cassette-transporter</i>
APO J.....	Apolipoprotein J
APS.....	Ammoniumpersulfat
A β	beta-Amyloid
BHS.....	Blut-Hirn-Schranke
bp.....	Basenpaare
CALM	<i>Clathrin-assembly lymphoid myeloid leukaemia protein</i>
CME	Clathrin-vermittelte Endozytose
ctrl	Kontrolle
d	Durchmesser
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dt.....	deutsch
FCS.....	Fetales Kälberserum
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
ISF	Interstitielle Flüssigkeit
kb	Kilobasen
kDa.....	Kilodalton
LB.....	<i>Lysogeny Broth</i>
LDLR.....	<i>Low-density lipoprotein receptor</i>
LRP1	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
LRP2	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 2</i>
MDR1	<i>Multidrug resistance-1</i>
MEM α	<i>Minimum Essential Media α</i>
NEB.....	<i>New England Biolabs GmbH</i>
PBS.....	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P-gp	P-Glykoprotein

PICALM.....	<i>Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i>
PXR.....	Pregnan-X-Rezeptor
Rab	<i>Ras-related in brain</i>
rcf.....	<i>relative centrifugal force</i>
rpm.....	<i>rounds per minute</i>
SDS.....	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
UV-Belichtung	Ultraviolett-Belichtung
vgl	vergleiche
WB	<i>Western Blot</i>
ZNS.....	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Restriktionsanalyse der klonierten P-gp-Konstrukte.....	23
Abbildung 2: Expression der P-gp-Konstrukte in HEK 293T-Zellen.....	25
Abbildung 3: Überexpression von P-gp führt zu einer erhöhten Expression von LRP1 in CHO-K1-Zellen.....	27
Abbildung 4: Endotheliale P-gp-Überexpression führt zu erhöhten LRP1-Mengen.	29
Abbildung 5: Signifikante positive Korrelation zwischen der Proteinexpression von P-gp und LRP1.	30
Abbildung 6: Co-Lokalisation von LRP1, P-gp und Rab 11.....	32
Abbildung 7: Immunpräzipitationen von Rab 11 und der schweren Kette von Clathrin.....	34
Abbildung 8: PICALM liegt mit P-gp, LRP1 und Rab 11, jedoch nicht mit Rab 7 co-lokalisiert vor.	35
Abbildung 9: A β -Exposition bewirkt verstärkte Co-Lokalisation von P-gp, LRP1 und Rab 11 mit PICALM.....	36
Abbildung 10: Immunzytochemischer Expressionsnachweis von P-gp und LRP1 in bEnd.3-Zellen.	38
Abbildung 11: Schematisches Modell der potentiellen Transzytose von A β durch die Endothelzellschicht der BHS.	47
Abbildung A.1: Vektorkarte pcDNA3.1(+)/myc-His A.	69
Abbildung A.2: Vektorkarte pcDNA-P-gp.	70
Abbildung A.3: Vektorkarte pcDNA-P-gp-myc.	71
Abbildung A.4: Immunpräzipitationen von P-gp und LRP1 in bEnd.3-Zellen.....	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vorwärtsprimer	8
Tabelle 2: Rückwärtsprimer	8
Tabelle 3: PCR-Ansatz für pcDNA-P-gp	8
Tabelle 4: PCR-Ansatz für pcDNA-P-gp-myc	9
Tabelle 5: Bakterienstämme	9
Tabelle 6: Säugetierzellen	9
Tabelle 7: Zusammensetzung Kulturmedien.....	10
Tabelle 8: Primäre Antikörper	11
Tabelle 9: Sekundäre Antikörper	11
Tabelle 10: Restriktionsenzyme.....	12
Tabelle 11: Thermocycler-Einstellungen zur Amplifikation von pcDNA-P-gp	13
Tabelle 12: Thermocycler-Einstellungen zur Amplifikation von pcDNA-P-gp-myc.....	14
Tabelle 13: Plasmidgrößen nach Vektorkarten	23

1 Einleitung

1.1 Morbus Alzheimer ist eine schwere, neurodegenerative Demenzerkrankung

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung, die vor allem durch eine progressive und irreversible Abnahme kognitiver Funktionen wie der Gedächtnisleistung und Orientierung charakterisiert ist (1). Es wird zwischen der seltenen, familiär bedingten (Anteil von bis zu 5,5 %) und der sporadisch auftretenden Form unterschieden (2, 3). Letztere ist die weitaus häufigere Form und tritt ab einem Alter von 65 Jahren auf (1, 2). Zurzeit Morbus Alzheimer mit einem Anteil von 60 – 80 % die häufigste Ursache für Demenz (4–6). Epidemiologische Studien berechneten eine weltweite Prävalenz von 26,6 Millionen Erkrankten im Jahr 2006 und prognostizieren bis 2050 eine Vervierfachung der Prävalenz auf etwa 106,8 Millionen (7).

Die Ursachen der sporadischen Morbus Alzheimer-Form sind bis heute noch nicht ausreichend geklärt (8). Fortschritte in der Erforschung der pathophysiologischen Grundlagen der Erkrankung, sowie in der Entwicklung neuer Therapieoptionen werden mit der stetig zunehmenden Prävalenz von Morbus Alzheimer immer dringlicher.

Ursächlich für den kognitiven Abbau im Rahmen von Morbus Alzheimer ist die Schädigung und schließlich der Untergang von Neuronen des Zentralen Nervensystems (ZNS). Die extrazelluläre Akkumulation von beta-Amyloid (A β) im Gehirn ist ein Hauptcharakteristikum der neurodegenerativen Erkrankung (9, 10) und steht in der Diskussion wesentlich zu diesem neuronalen Verlust beizutragen (11).

1.2 Die Akkumulation von A β korreliert mit Demenz

A β wird von einer Vielzahl von Zellarten des ZNS in die interstitielle Flüssigkeit (ISF) des Hirnparenchyms sekretiert (12–15). Man vermutet, dass A β physiologisch die Aktivität von hippocampalen Synapsen reguliert (16) und die Konsolidierung von erlerntem Wissen fördert (17). Darüber hinaus wirkt A β positiv auf die synaptische Plastizität (17, 18). Neuere Studien konnten zeigen, dass A β -Monomere in physiologischen, niedrigen Konzentrationen eine neuroprotektive Wirkung entfalten, unter anderem indem sie zur Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase beitragen und Neurone unter trophischen Mangelzuständen vor dem Zelltod schützen (19–21).

Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen der Sekretion von A β -Monomeren und deren Abtransport aus dem Hirnparenchym. Gerät dieses System in eine Dysbalance und es kommt zu einem Konzentrationsanstieg von A β in Hirnparenchym, begünstigt dies die Aggregation von A β -Monomeren zu Oligomeren, welche sich, bei einer weiteren Anreicherung, schließlich in Form von unlöslichen Plaques ablagern können (22–24). Einige Autoren diskutieren, dass ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den unlöslichen A β -Aggregationsformen und Oligomeren vorliegen könnte, wobei sich aus den A β -Großaggregaten erneut Oligomere herauslösen könnten (25, 26). Im Gegensatz zu den anderen A β -Spezies weisen insbesondere A β -Oligomere eine starke Neurotoxizität auf (10, 27–29). Basierend auf der Amyloid-Hypothese, induziert ein signifikanter Konzentrationsanstieg der A β -Oligomere über verschiedene Mechanismen anfänglich neuronale Funktionsstörungen, sowie später den Untergang von Neuronen und schließlich das Auftreten von Demenz (22).

Für das Ungleichgewicht zwischen A β -Sekretion und -Abtransport sowie für die daraus resultierende pathologische Akkumulation in der sporadischen Form der Alzheimer-Erkrankung, werden beeinträchtigte Abtransportmechanismen im Gegensatz zu einer Überproduktion von A β verantwortlich gemacht (30).

1.3 Der Großteil der A β -Clearance erfolgt über die Blut-Hirn-Schranke

A β wird über verschiedene Clearance-Mechanismen aus dem ZNS eliminiert. Neben zellulärer Degradation durch Neurone und Gliazellen (31–33), proteolytischem Abbau durch extrazelluläre Enzyme (34, 35), passiver Eliminierung über ISF *bulk flow* entlang des perivaskulären Raumes (36) und der Absorption in den Liquor (37), wird A β ebenfalls über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) in den Blutkreislauf (38, 39) und anschließend zum Abbau in Leber, Nieren und Milz transportiert (40, 41). Der relative Anteil der jeweiligen Mechanismen am Gesamtabtransport von A β aus dem ZNS ist zur Zeit noch unklar (33), jedoch ist die führende Auffassung, dass der BHS-Transport, mit bis zu 73 % Gesamtanteil die übrigen Mechanismen übertrifft (38).

1.4 Die Endothelzellschicht kontrolliert den Stoffaustausch über die Blut-Hirn-Schranke

Die BHS ist eine selektive Barriere der zerebralen Kapillaren, an der der Stoffaustausch zwischen dem Gehirn und dem vaskulären System stattfindet (42, 43). Im Gegensatz zu anderen mikrovaskulären Endstromgebieten, zeichnet sich die BHS durch einen speziellen

Aufbau aus. Hierdurch wird ein optimales Milieu für eine unbeeinträchtigte neuronale Funktion erzeugt und reguliert sowie das Gehirn vor potenziell schädlichen Substanzen aus dem Blutstrom geschützt (44). Strukturell besteht die BHS aus einem dreischichtigen Verbund von Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten (42, 45, 46). Diese bilden zusammen mit den benachbarten Neuronen und Mikrogliazellen die neurovaskuläre Einheit (47).

Die äußerste, dem Hirn zugewandte Schicht der BHS bildet ein flächendeckender Mantel aus Astrozytenfortsätzen (48–50). Über diese sogenannten perivaskulären Endfüßchen stehen die Astrozyten in engem Kontakt mit den Endothelzellen der BHS und sind in der Lage im Sinne der gemeinsamen Regulation der Permeabilität der BHS und der metabolischen Homöostase des Hirnparenchyms miteinander zu kommunizieren und sich gegenseitig zu beeinflussen (51). Die Schicht der Astrozytenfortsätze ist jedoch durch ihre etwa 20 nm großen interzellulären Spalträume (52) durchlässig für Proteine nahezu jeder Größe und trägt daher nicht direkt zur Schrankenfunktion der BHS bei (53).

Die mittlere Schicht bilden die Perizyten und die Basalmembran des Endothels (54). Erstere beeinflussen durch ihre Kontraktionsfähigkeiten unter anderem die Durchlässigkeit der Endothelzellschicht der BHS und regulieren die lokale Durchblutung (55).

Die innerste, dem Blutstrom zugewandte Schicht, stellt das kontinuierliche Endothel der zerebralen Kapillaren dar (46). Das Endothel der BHS ist als Barriere zwischen dem vaskulären System und dem ZNS vor allem durch die Expression von speziellen *tight junctions* 500 bis 1000 Mal dichter (56) als das Endothel anderer Gewebe (44, 57). Die *tight junctions* erzeugen eine zirkuläre Adhäsionszone zwischen benachbarten Endothelzellen, wodurch der parazelluläre Durchtritt von Substanzen entlang der Interzellulärspalten reduziert und der Stoffaustausch zwischen Blut und Gehirn über transzelluläre Wege forciert wird. Außerdem tragen *tight junctions* zur Erzeugung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität bei, indem sie Proteine und *lipid rafts* daran hindern über die Adhäsionszone hinweg frei in der Membranebene zu diffundieren (39, 48, 57, 58). Die so erzeugte Polarisierung der Endothelzelloberfläche in apikale bzw. luminale und basolaterale bzw. abluminale Zellmembranbereiche ermöglicht eine asymmetrische Distribution von Membranbestandteilen, wie Proteinen und Lipiden, sodass strukturell und funktionell unterschiedliche Areale an der Zelle entstehen (58, 59). Diese asymmetrische Zusammensetzung der Zellmembran stellt die Grundlage für viele gerichtete transendotheliale Transportsysteme dar (59). Vor allem spezialisierte, proteinbasierte Mechanismen wie Rezeptor- und Carrier-vermittelter Transport oder aktiver Transport durch Transportproteine gewährleisten den Stoffaustausch über die BHS (60). Die spezifische Lokalisation der Transportproteine, abluminal oder luminal, determiniert die Richtung des Transports über die BHS (39). Durch die Barrierefunktion und die präzise abgestimmten Transportmechanismen, kontrolliert das Endothel der BHS sowohl

den Influx von Nährstoffen in das ZNS als auch den Efflux von potenziell schädlichen Stoffen, wie A β und anderen Stoffwechselprodukten in die Peripherie (61).

1.5 Der abluminale Rezeptor LRP1 ist ein zentrales Transportprotein der A β -Clearance

Eines der prominentesten Proteine die zum A β -Efflux aus dem Gehirn über die BHS beitragen ist der Rezeptor *Low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) (38, 62–64). LRP1 ist ein Mitglied der *Low density lipoprotein-receptor-* (LDLR-) Familie (65) - einer Gruppe von membrangebundenen Rezeptoren, die unter anderem extrazelluläre Liganden binden und deren Internalisierung vermitteln (66, 67). Der 600 kDa große Rezeptor besteht aus zwei nicht-kovalent verbundenen Untereinheiten. Die 515 kDa große extrazelluläre α -Kette bindet Liganden, während die 85 kDa große transmembranöse β -Kette über intrazelluläre Signalkaskaden die Endozytose des Rezeptor-Liganden-Komplexes einleitet (68–70). LRP1 wird von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen exprimiert (71, 72) und übernimmt neben der Rezeptor-vermittelten Endozytose viele weitere Aufgaben im Rahmen der Zellmigration, Signaltransduktion, Immunreaktion, Expressionsregulation sowie des Abbaus einiger Proteine (65, 71). Eine Interaktion mit LRP1 ist für mehr als 40 verschiedene Liganden beschrieben (73).

In Endothelzellen der BHS befindet sich LRP1 auf der abluminalen Membranoberfläche (74) und ist an einem Großteil des A β -Transports aus dem ZNS über die BHS beteiligt (75).

1.6 PICALM vermittelt den Eintritt von A β in das endosomale System

Nach der Bindung von A β -Monomeren an LRP1 wird der Rezeptor-Liganden-Komplex über Clathrin-vermittelte Endozytose (*clathrin mediated endocytosis*, CME) internalisiert (76, 77). Neben der CME gibt es ebenfalls Clathrin-unabhängige Transportmechanismen (78), die jedoch kaum zur Endozytose von größeren Molekülen beitragen. Mithilfe des mehrstufigen Prozesses der CME werden etwa 95 % aller Substanzen in die Zelle aufgenommen (79, 80).

Zu Beginn bindet *Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein* (PICALM) (vormals *Clathrin-assembly lymphoid myeloid leukaemia protein*, CALM (81)) über Phosphatidylinositol (80, 82) an die Plasmamembran und den A β -LRP1-Rezeptor-Liganden Komplex (74). PICALM ist ein zytoplasmatisches Adaptorprotein (83), welches physiologisch in zwei Isoformen, einer etwa 65 kDa großen und einer etwa 70 kDa großen Form vorliegt (84) und nach einigen genomweiten Assoziationsstudien zu einem der wichtigsten Risikofaktoren für Morbus Alzheimer zählt (85–87). Im Anschluss erfolgt die Assoziation weiterer Adaptorproteine, sowie

die PICALM-vermittelte Rekrutierung und Bindung des Clathrin-Mantels (80, 82, 88). Dieser Proteinkomplex initiiert die Invagination der Plasmamembran und führt zur Endozytose des Rezeptor-Liganden-Komplexes (82, 89–91). Nach der Abschnürung erfolgt der Eintritt des Endozytosevesikels in das endosomale System, wobei sich der Mantelproteinkomplex von der Vesikeloberfläche löst (91).

Endothelial exprimiertes PICALM spielt neben der Endozytose von LRP1-gebundenem A β auch in dessen intrazellulärem Weitertransport eine essentielle Rolle (74, 84, 92). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass PICALM an der endothelialen A β -Transzytose der BHS und somit an der A β -Clearance regulatorisch beteiligt sein könnte (84). So konnte gezeigt werden, dass eine verminderte PICALM-Expression in Hirngefäßendothelzellen mit einer verstärkten Akkumulation von A β korreliert, während eine Wiederherstellung der PICALM-Expression zu einer Reduktion der A β -Menge führt (74).

1.7 Rab 11-positive Endosomen stellen ein zentrales Kompartiment der A β -Transzytose dar

Nach der Endozytose fusioniert das Transportvesikel mit einem frühen Endosom, einem Membrankompartiment das durch das Rab-Protein (*Ras-related in brain*, Rab) Rab 5 gekennzeichnet ist (93–96). Rab-Proteine sind eine Gruppe von kleinen (21 – 25 kDa (97, 98)) GTP-bindenden Membranproteinen, die der Superfamilie der Ras-Proteine angehören (99) und ubiquitär in endosomalen Zellkompartimenten exprimiert werden (96, 98). Durch ihre jeweilige spezifische subzelluläre Lokalisation ermöglichen sie eine strukturelle und funktionelle Unterscheidung der verschiedenen Kompartimente (94, 100). Zudem regulieren sie vielfältige Funktionen in der intrazellulären Vesikelsortierung, spielen eine essenzielle Rolle in der Endo- und Exozytose von Proteinen und Lipiden und koordinieren deren intrazellulären vesikulären Weitertransport (97, 98, 101).

In den Rab 5-positiven frühen Endosomen erfolgt die Sortierung der endozytierten Substanzen entsprechend ihrer Zieldestination entlang des Degradations- oder des Recycling-Pfades (97, 102, 103). Rab 7-assoziierte späte Endosomen führen Proteine ihrem Abbau zu (94, 96, 104). Diese Vesikel reifen durch Veränderungen ihrer Membranzusammensetzung aus Rab 5-positiven Endosomen (105) und übertragen ihren Vesikelinhalt an Lysosomen (103, 106, 107), die die Proteine mittels einer Kombination von proteolytischen Enzymen bei gleichzeitig sauren pH-Werten degradieren (102, 103, 106–108). Proteine, die zur Transzytose oder zum Rücktransport zu der Plasmamembran bestimmt sind, werden in Rab 11-positiven Vesikeln weitertransportiert (96, 106). In diesen sogenannten *Sorting*-Endosomen (dt. Sortierung) wird, nach der Dissoziation des Rezeptor-Liganden-Komplexes das Recycling des Rezeptors in

seinen ursprünglichen Zellmembranabschnitt, sowie der Weitertransport des Liganden bis zur Transzytose vermittelt (109, 110).

In einem *in vitro* Endothel-Modell der BHS konnte gezeigt werden, dass eine dominant-negative Rab 11-Mutation (S25N) zu einer Reduktion des gerichteten A β -Transports von abluminal nach luminal um 75 % führte. Eine dominant-negative Rab 7-Mutante (T22N) zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Transportrate. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass PICALM LRP1-gebundenes A β nach der Internalisierung nicht zum Abbau in Rab 7-positive späte Endosomen, sondern zu Rab 11-positiven *Sorting*-Endosomen dirigiert (74).

1.8 Der luminaire ABC-Transporter P-gp vermittelt den A β -Efflux in das vaskuläre System

Ein weiteres, essentielles Element des A β -Effluxes über die BHS ist P-Glykoprotein (P-gp) (13, 111–113). P-gp oder ABCB1 (*Adenosine triphosphate-binding cassette sub-family B member 1*) ist das Produkt des MDR1-Genes (*Multidrug resistance-1*) und beschreibt ein etwa 170 kDa großes membranassoziiertes Transportprotein der *ATP-binding cassette*-Transporter-Familie (114–118). ABC-Transporter transportieren ATP-abhängig Substanzen gegen einen Konzentrationsgradienten über Lipidmembranen (114). P-gp wird von vielen Barriere- und Exkretionsgeweben und in besonders hohem Maße auf der luminalen Seite der BHS-bildenden Endothelzellen exprimiert (119–124). Bekannt ist P-gp als Effluxpumpe mit breiter Substratspezifität die den Eintritt einer Vielzahl von Xenobiotika aus dem Blutstrom in das Endothel limitiert (118, 125). Zusätzlich zu dieser Funktion ist P-gp in den Transport einiger endogener Substanzen wie Opioide und A β aus dem ZNS in das vaskuläre System involviert (13, 111–113, 126). Während die Inhibition von P-gp mit Verapamil oder Cyclosporin A zu einer Erhöhung der A β -Menge im ZNS führt (113), weist auch die umgekehrte Korrelation zwischen der P-gp-Expression und A β -Ablagerungen in menschlichen Gehirnen auf die Bedeutung von P-gp für die A β -Clearance über die BHS hin (127).

Die exakte Funktionsweise der Effluxpumpe P-gp ist bislang nicht gänzlich geklärt; diskutiert wird ein Flippase-Mechanismus, wobei P-gp lipophile Substanzen die blutseitig die Endothelzellmembran passiert haben, bindet und unmittelbar zurück in den Blutstrom befördert (128, 129). Wie luminal lokalisiertes P-gp den Transport von A β aus dem Gehirn in das vaskuläre System vermittelt ist allerdings noch unklar (130).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung, deren Ursache in der zerebralen Akkumulation von A β vermutet wird (22). Der Transport von A β über das Endothel der BHS ist einer der wichtigsten Abtransportwege von A β aus dem ZNS (38, 61). Obwohl die exakten Mechanismen der endothelialen Transzytose von A β noch nicht vollständig geklärt sind, ist bekannt, dass der abluminale Rezeptor LRP1 und der luminal lokalisierte ABC-Transporter P-gp wesentlich zum A β -Efflux beitragen (74, 75, 111, 112, 119, 120, 124). Aufgrund ihrer gegensätzlichen Lokalisation in der Endothelzellmembran ist bislang jedoch ungeklärt, wie beide Proteine die vollständige Transzytose von A β eigenständig vermitteln sollen.

Um ein Zusammenspiel von P-gp und LRP1 zu evaluieren, wurden in dieser Arbeit beide Proteine auf mögliche Interaktionen expressioneller, struktureller und funktioneller Natur untersucht. Ein besonderes Augenmerk wurde hierbei auf eine mögliche Zusammenarbeit im Transport von A β über die BHS, sowie den potenziellen Einfluss von PICALM gelegt.

Um dies zu analysieren, wurde P-gp in verschiedenen Zelltypen transient überexprimiert und immunpräzipitiert. Proteinlevel sowie co-präzipitierte Proteine wurden qualitativ und quantitativ mittels Immunhistochemie ausgewertet. Der Nachweis via Immunfluoreszenz wurde genutzt, um eine etwaige Co-Lokalisation von P-gp und LRP1 zu visualisieren. Die vorgestellten Untersuchungen etablierten die experimentelle Grundlage für weitreichendere Experimente der Arbeitsgruppe inklusive *in vitro* A β -Transzytose-Studien.

2 Material

2.1 Primer

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) synthetisiert und bereitgestellt.

Tabelle 1: Vorwärtsprimer

Name	Sequenz 5' → 3'
fwd_pcDNA-P-gp	TA AGC TTG GTA CCG AGC TCG ATG GAT CTT GAA GGG GAC C (Überhang Expressionsvektor (rot), Überhang P-gp-Sequenz (blau))
fwd_P-gp-Seq_CMV	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG

Tabelle 2: Rückwärtsprimer

Name	Sequenz 5' → 3'
rev_P-gp-pcDNA	C CAC CAC ACT GGA CTA GTG CTA CTG GCG CTT TGT TCC (Überhang Expressionsvektor (rot), Insertion Stopcodon (grün), Überhang P-gp-Sequenz (blau))
rev_myc-P-gp-pcDNA	GAG TTT TTG TTC GAA GGG CCT CTG GCG CTT TGT TCC AGC (Überhang Expressionsvektor (rot), Insertion für Frameshift (grün), Überhang P-gp-Sequenz (blau))
rev_P-gp-Seq_BGH	TAG AAG GCA CAG TCG AGG

2.2 Molekulargenetische Ansätze zur Plasmidherstellung

Tabelle 3: PCR-Ansatz für pcDNA-P-gp

Chemikalie	Quantität
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (M0530, NEB)	1 unit
5 x Phusion HF Buffer (B0518S, NEB)	10 µl
Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix (N0447S, NEB)	200 µmol
DNA-Template	100 ng
Vorwärtsprimer: fwd_pcDNA-P-gp	0.5 µmol
Rückwärtsprime: rev_myc-P-gp-pcDNA	0.5 µmol
DEPC-behandeltes H ₂ O (T143.2, Carl Roth)	aufgefüllt auf 50 µl

Tabelle 4: PCR-Ansatz für pcDNA-P-gp-myc

Chemikalie	Quantität
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	1 unit
5 x Phusion HF Buffer	10 µl
Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix	200 µmol
DNA- <i>Template</i>	100 ng
Vorwärtsprimer: fwd_pcDNA-P-gp	0.5 µmol
Rückwärtsprimer: rev_myc-P-gp-pcDNA	0.5 µmol
DEPC-behandeltes H ₂ O	aufgefüllt auf 50 µl

2.3 Zellen

Tabelle 5: Bakterienstämme

Stamm	Spezies	Hersteller
DH5α	<i>E. coli</i>	18263012, Invitrogen

Tabelle 6: Säugetierzellen

Zelllinie	Zelltyp	Hersteller
HEK 293T	Human Embryonic Kidney 293T-Zellen	Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA
CHO-K1	Chinese Hamster Ovary-Zellen, Wildtyp	ATCC, Manassas, VA, USA
bEnd.3	Murine Endothelioma-Zellen	ATCC, Manassas, VA, USA

2.4 Zellkulturmedien

Tabelle 7: Zusammensetzung Kulturmedien

Zelllinie	Medium	Zusätze
HEK 293T	DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose medium</i>) (41965, Gibco)	10 % (v/v) FCS (10270106, Gibco) 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (P0781, Sigma-Aldrich)
CHO-K1	MEM α (<i>Minimum Essential Media α</i>) (12561056, Gibco)	10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
bEnd.3	DMEM	10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

2.5 Antikörper

Die Antikörper wurden nach den jeweiligen Herstellerempfehlungen in TBS-T (20 nM Tris-Base; 137 mmol/l NaCl; 0,1 % Tween-20 (9127.2, Carl Roth) und 0,02 % Na₃N (1066880100, Merck) gelöst. Bei Bedarf wurde bis zu 5 % (w/v) Magermilchpulver (T145.3, Carl Roth) hinzugegeben.

Tabelle 8: Primäre Antikörper

Name	Antigen	Spezies	Hersteller	Konzentration
1704	C-Terminus LRP1	Kaninchen	(131)	WB: 1:10.000; IP: 5 µl/Probe
Aktin	Aktin	Kaninchen	A2066, Sigma-Aldrich	WB: 1:1.000
B411E2	α-Kette LRP1	Maus	(75)	IF: 5,2 µg/ml
Clathrin Heavy Chain	Clathrin Heavy Chain 1	Maus	610499, BD Transduction Laboratories	WB: 1:200; IP: 5 µl/Probe
Mdr H-241	ABCB1/P-gp	Kaninchen	sc-8313, Santa Cruz Biotechnology	WB: 1:1.000; IP: 5 µl/Probe; IF: 2 µg/ml
myc/c-myc 9E10	myc-tag	Maus	sc-40, Santa Cruz Biotechnology	WB: 1:1.000
PICALM	PICALM	Kaninchen	HPA019053, Sigma- Aldrich	WB: 1:250; IP: 10 µl/Probe
Rab 7	Rab 7	Kaninchen	R4779, Sigma-Aldrich	WB: 3 µg/ml
Rab 11	Rab 11 A/B	Kaninchen	15903-1-AP, Proteintech	IP: 3 µl/Probe
Rab 11 C-19	Rab 11	Ziege	sc-6565, Santa Cruz Biotechnology	WB: 1:200

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper

Name	Spezies	Konjugat	Hersteller	Konzentration
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	HRP	A9169, Sigma-Aldrich	WB: 1:10.000
Anti-Maus-IgG	Ziege	HRP	A5278, Sigma-Aldrich	WB: 1:5.000
Anti-Ziege-IgG	Kaninchen	HRP	A5420, Sigma-Aldrich	WB: 1:2.000
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Alexa Fluor™ 546	A-11010, Thermo Fisher Scientific	IF: 2 µg/ml
Anti-Maus-IgG	Ziege	Alexa Fluor™ 488	A-11001, Thermo Fisher Scientific	IF: 2 µg/ml

2.6 Enzyme

Tabelle 10: Restriktionsenzyme

Name	Schnittstelle 5' → 3'	Hersteller
BamHI-HF	G GATCC	R3136S, NEB
Apal	GGGCC C	R0114S, NEB
NotI-HF	GC GGCCGC	R3189S, NEB
EcoRI-HF	G AATTC	R3101S, NEB
XmaI	C CCGGG	R0180S, NEB

3 Methoden

3.1 Molekulargenetische Methoden zur Plasmidherstellung

Als sogenanntes DNA-*Template* (dt. Vorlage) diente ein Konstrukt mit humaner P-gp-Sequenz in einem pGEX-Vektor.

Es wurden zwei verschiedene P-gp-Varianten kloniert (Vektorkarten vgl. 8.1). Das Konstrukt pcDNA-P-gp entspricht der nativen P-gp-Sequenz, wohingegen das Konstrukt pcDNA-P-gp-myc zusätzlich einen myc-tag besitzt. Der genutzte Zielvektor pcDNA3.1(+)/myc-His A (V80020, Thermo Fisher Scientific) enthält bereits die DNA-Sequenz für den myc-tag sowie ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion. Durch die Auswahl der Rückwärtsprimer (Primer vgl. 2.1) und der Restriktionsschnittstellen im Zielvektor (Restriktionsverdau vgl. 3.1.2) konnte der vorliegende myc-tag am 3'-terminalen Ende der P-gp-Sequenz des pcDNA-P-gp-myc-Konstruktes angefügt werden.

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die sogenannten *Insert*-Sequenzen (dt. Einsatz) wurden mit einer PCR nach den in Tabelle 11 und Tabelle 12 aufgeführten Angaben im Thermocycler *Biometra Trio 30* (846-x-070-720, Analytik Jena) amplifiziert.

Tabelle 11: Thermocycler-Einstellungen zur Amplifikation von pcDNA-P-gp

Arbeitsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	98	30	1
Denaturierung	98	10	35
Primerhybridisierung	59	30	35
Elongation	72	180	35
Finale Elongation	72	600	1
Lagerung	4	-	-

Tabelle 12: Thermocycler-Einstellungen zur Amplifikation von pcDNA-P-gp-myc

Arbeitsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	98	30	1
Denaturierung	98	10	35
Primerhybridisierung	63	30	35
Elongation	72	180	35
Finale Elongation	72	600	1
Lagerung	4	-	-

3.1.2 Restriktionsverdau

Der Zielvektor pcDNA3.1(+)/myc-His A wurde zur Erstellung der beiden Konstrukte nach zwei verschiedenen Protokollen verdaut. Für pcDNA-P-gp wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *BamHI-HF* geschnitten. Für pcDNA-P-gp-myc erfolgte erst ein Verdau mit *ApaI* und danach mit *BamHI-HF*. Der Restriktionsverdau wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

3.1.3 Dephosphorylierung

Um einer Selbstligation der linearisierten Vektoren entgegenzuwirken, wurde eine Dephosphorylierung mit dem *Rapid DNA Dephos and Ligation Kit* (04898117001, Sigma-Aldrich) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurden die DNA-Proben in einem Verhältnis von 1:6 mit einem 6 x Ladepuffer (B7024S, NEB) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Komigrationsstandard diente ein DNA-Marker (N3232L, NEB) mit einem Längenstandard von 500 - 10.000 bp. Die Elektrophorese erfolgte in einem mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml (E1510, Sigma-Aldrich)) versetzten Agarose-Gel (1 % (w/v) Agarose (840004, Biozym Scientific) in TAE-Puffer) in TAE-Puffer (40 mmol/l Tris-Base (4855.1, Carl Roth); 20 mmol/l Essigsäure (3738.2, Carl Roth); 1 mmol/l EDTA (E9884, Sigma-Aldrich)) für zunächst 10 min bei 60 V und im Anschluss für etwa 80 min bei 100 V.

Die spezifischen DNA-Banden wurden unter UV-Belichtung (256 nm) aus dem Gel extrahiert und mit dem *Monarch DNA Gel Extraction Kit* (T1020S, NEB) nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

3.1.5 Assemblierung der Plasmid- und der *Insert*-DNA

Der linearisierte Zielvektor und die entsprechenden *Inserts* wurden mittels *NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix* (E2621S, NEB) nach Herstellerangaben zusammengefügt und ligiert.

3.1.6 Transformation

Zur Transformation wurden chemisch kompetente DH5 α -Zellen nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Abweichend wurde jedoch *Lysogeny Broth* Medium (LB-Medium) (1 % (w/v) Trypton (211705, Thermo Fisher Scientific); 0,5 % (w/v) Hefeextrakt (2363.4, Carl Roth); 1 % NaCl (HN00.3, Carl Roth); in ddH₂O) anstelle des empfohlenen Mediums verwendet. Zur Antibiotikaselektion wurden LB-Ampicillin-Platten (1,5 % Agar; 50 μ g/ml Ampicillin (HP62.2, Carl Roth) in LB-Medium) verwendet. Die transformierten Bakterien wurden unter sterilen Kautelen auf den Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Herstellung der Bakterienkulturen wurden 5 ml LB-Ampicillin-Medium (50 μ g/ml Ampicillin in LB-Medium) mit einer einzelnen Kolonie beimpft und bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert.

3.1.7 Minipräparation

Mithilfe des *EasyPrep Pro Plasmid Miniprep Kit* (390052, Biozym) wurden aus den Bakterienkulturen die Plasmide nach Protokoll des Herstellers isoliert. Der Erfolg der Klonierung wurde in einer Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 3.1.4) überprüft. Dazu wurden die Plasmide zuvor in einem Restriktionsverdau mit dem Enzym *ApaI* nach dem Protokoll des Herstellers linearisiert.

3.1.8 Midipräparation

Die erfolgreich transformierten Kolonien wurden für die Midipräparation verwendet. Diese wurde mithilfe des *NucleoBond Xtra Midi EF Kit* (740420.50, Macherey-Nagel) nach den Herstellerangaben durchgeführt.

3.1.9 Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung

Die Plasmidgrößen wurden im Anschluss mittels Restriktionsanalyse, unter Verwendung der Restriktionsenzyme *NotI-HF*, *EcoRI-HF* und *XmaI* im Agarose-Gel (vgl. 3.1.4.) kontrolliert. Der Restriktionsverdau wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

Die Plasmidsequenzen wurden im Anschluss mithilfe der erstellten Sequenzierprimer (Primer vgl. 2.1: fwd_P-gp-Seq_CMV, rev_P-gp-Seq_BGH) von der Firma *StarSEQ* (Mainz) durch DNA-Sequenzierung analysiert. Ausgewertet wurden die Daten mit den Programmen ClustalX (Version 2.1) und Bioedit (BioEdit Sequence Alignment Editor, Version 5.0).

3.2 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator (Galaxy 170 S, New Brunswick, Eppendorf, Hamburg) mit 5 % CO₂-Partialdruck bei einer konstanten Temperatur von 37 °C. Die Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer Sterilbank (S@femate 1.2 Vision, Euroclone, Pero, Italien) behandelt. Das Zellwachstum wurde täglich mithilfe eines Lichtmikroskops (Axiovert 25, Carl Zeiss AG) kontrolliert. Abhängig von ihrem Wachstum wurden die Zellen mithilfe von Trypsin-EDTA (0,05 % Trypsin-EDTA (15400054, Gibco) in PBS (D8537, Sigma-Aldrich)) passagiert.

Die Gewebekulturschalen zur Kultivierung von HEK 293T-Zellen wurden mit einer Poly-L-Ornithin-Lösung (P4957, Sigma-Aldrich) beschichtet.

Für immunzytochemische Versuche wurden Zellen auf teilsterilisierten und beschichteten Deckgläschen (d: 10 mm) kultiviert. Die Deckgläschen wurden dazu vorab in Aceton getränkt, anschließend abgeflammt und einseitig mit der Beschichtungslösung (400 µg/ml Kollagen Typ IV (C5533, Sigma-Aldrich); 100 µg/ml Fibronectin (F0162, Sigma-Aldrich)) benetzt.

3.3 Transiente Transfektion

Die Zellen wurden 24 h vor Transfektion in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/Well einer 6-Wellplatte in 1,5 ml Zellmedium ausgesät. 1 h vor Transfektion wurde das Medium gewechselt. Die klonierten P-gp-Konstrukte wurden mithilfe verschiedener Reagenzien nach entsprechenden Protokollen transfiziert (vgl. 3.3.1, 3.3.2 und 3.3.3). 24 – 48 h nach Transfektion wurden die Zellen einfach mit PBS gewaschen, mit NP40-Puffer lysiert (Zelllyse vgl. 3.6.1) und anschließend mittels SDS-PAGE und Immunoblotting (vgl. 3.6.2 und 3.6.3) analysiert.

3.3.1 Transfektion mit *PEI MAX*

1 µg DNA und 4 µl *PEI MAX* (24765-2, Polysciences) wurden zu je 30 µl serum- und antibiotikafreiem Kulturmedium gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden DNA- und *PEI MAX*-Lösung zusammengeführt, für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich zu den Zellen gegeben. Nach 6 h wurde das Zellmedium mitsamt des Transfektionsgemisches durch Kulturmedium ersetzt.

3.3.2 Transfektion mit *X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent*

Die Transfektion mit *X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent* (04476093001, Roche) wurde abweichend vom Herstellerprotokoll in Wells einer 6-Wellplatte durchgeführt. Die Chemikalien wurden entsprechend der kleineren Volumina angepasst. 10 µl *X-tremeGENE Transfection Reagent* wurde in 90 µl Opti-MEM I (31985047, Gibco) und 1 µg DNA in 100 µl Opti-MEM I verdünnt. Folgend wurde die Transfektion nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

3.3.3 Transfektion mit *Lipofectamine LTX* und *FuGENE HD*

2 µl *FuGENE HD* (E2311, Promega) und 0,5 µg DNA wurden für 15 min, 2 µl *Lipofectamine LTX* (15338500, Thermo Fisher Scientific) und 0,5 µg DNA hingegen für 5 min in 50 µl Opti-MEM I bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die *FuGENE HD*- und *Lipofectamine LTX*-Ansätze zusammengeführt und nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur zur Transfektion der Zellen genutzt. Nach 6 h wurde das Zellmedium mitsamt des Transfektionsgemisches durch Kulturmedium ersetzt.

3.4 Immunpräzipitation

3.4.1 A β -Stimulation

Zur A β -Stimulation wurden bEnd.3-Zellen einfach mit PBS gewaschen und folgend mit 1 nmol/l A β ₁₋₄₀ (Genosphere Biotechnologies, Stuttgart) in serumfreiem Kulturmedium für 5 min bei 37 °C inkubiert.

3.4.2 Immunpräzipitation

Für Immunpräzipitationen wurde 1 mg bEnd.3-Lysat mit entsprechenden Primärantikörpern versetzt und über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Am Folgetag wurde entsprechend des

Herstellerprotokolls 40 µl equilibrierte *Protein G-Sepharose 4 Fast Flow-beads* (17-0618-01, GE Healthcare) hinzugegeben und erneut für 4 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Elution der Proteine erfolgte mit 15 µl 2 x Roti Load 1 (K929.1, Carl Roth) für 5 min bei 95 °C.

3.5 Immunzytochemie

3.5.1 Immunzytochemische Färbemethode

Der experimentelle Ablauf orientierte sich an einem etablierten Immunzytochemieprotokoll von [REDACTED] (Institut für Pathobiochemie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) und [REDACTED] (Leibniz-Institut für Alternsforschung – Fritz-Lipmann-Institut e.V., Jena).

Subkonfluente bEnd.3-Zellen auf Deckgläschen wurden mit einer Fixierungslösung (4 % (w/v) Paraformaldehyd (1040051000, Merck Millipore); 0,12 mol/l D(+)-Saccharose (4661.1, Carl Roth) in PBS) für 20 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler fixiert. In einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 50 mmol/l Ammoniumchlorid (A4514, Sigma-Aldrich) in PBS wurden freie Aldehyd-Gruppen entfernt. Die Zellmembran wurde anschließend mit 0,2 % Triton X-100 (10789704001, Sigma-Aldrich) in PBS für 2 min bei Raumtemperatur permeabilisiert und freie Bindungsstellen durch die Verwendung von verdünntem Serum (10 % (v/v) Ziegen Serum (16210064, Gibco); 1 % (w/v) bovines Serumalbumin (8076.3, Carl Roth) in PBS) für 10 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler blockiert. Folgend wurden die vorbereiteten Zellen zunächst für 30 min mit einer Primäantikörper-, dann lichtgeschützt mit der Sekundäantikörperlösung bei Raumtemperatur auf einem Schüttler behandelt. Zur Sichtbarmachung des Nukleus erfolgte die Kerngegenfärbung lichtgeschützt mit 5 µmol/l DRAQ5 (DR50200, Biostatus) für 10 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Die auf den Deckgläschen fixierten und angefärbten Zellen wurden in *ProLong Gold Antifade Mountant* (P36930, Thermo Fisher Scientific) auf Objektträgern eingebettet, lichtgeschützt bei Raumtemperatur getrocknet und bei 4 °C bis zur Auswertung gelagert.

3.5.2 Lasermikroskopische Auswertung

Zur Analyse der immunzytochemischen Färbungen wurde das konfokale Lasermikroskop LSM710 (Carl Zeiss AG), ausgestattet mit der dazugehörigen Software ZEN 2011 SP2 Software (Version 3.3), verwendet.

3.6 Molekularbiochemische Proteinnachweismethoden

3.6.1 Zellyse

Alle Schritte der Zellyse wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1 ml PBS vorsichtig mechanisch von der Kulturschale gelöst. Im Anschluss wurden die Zellen bei 4 °C für 4 min bei 4.500 rcf pelletiert, der Überstand verworfen und das resuspendierte Zellpellet für 20 min auf Eis lysiert. Für Immunpräzipitationen und deren Kontrolllysate wurde ein CHAPS-basierter Lysepuffer (0,5 % (w/v) CHAPS (1479.4, Carl Roth); 50 mmol/l Tris-Base, pH 7,5; 150 mmol/l NaCl; 0,02 % (v/v) NaN₃; 1 x Proteaseinhibitor-Cocktail (11697498001, Roche)) für alle weiteren Versuche wurde ein NP40-haltiger Lysepuffer (1 % (v/v) Nonidet P40 (11754599001, Roche); 150 mmol/l NaCl; 50 mM Tris-Base, pH 8,0; 0,02 % NaN₃; 1 x Proteaseinhibitor-Cocktail verwendet. Ungelöste Zellreste wurden bei 4 °C für 20 min bei 18.620 rcf pelletiert und die Lysate isoliert. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des *PierceTM BCA Protein Assay Kit* (23225, Thermo Fisher Scientific) nach Protokoll des Herstellers bestimmt.

3.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Größenaufftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelen in Tris/Glycin-Elektrophoresepuffer (192 mmol/l Glycin (3908.3, Carl Roth); 25 mmol/l Tris-Base, pH 8,3; 1 % (w/v) SDS (161-0302, Bio-Rad Laboratories)). Das Sammelgel (4 % T (v/v) / 3,3 % C Acrylamid (1610146, Bio-Rad Laboratories); 0,5 mol/l Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS; 0,5 % (w/v) APS (A1142, AppliChem); 0,1 % (v/v) TEMED (2367.1, Carl Roth)) wurde dem Trenngel (8 – 10 % T (v/v) / 3,3 % C Acrylamid; 1,5 mol/l Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS; 0,5 % (w/v) APS; 0,1 % (v/v) TEMED) im Vertikalminigelsystem aufgelagert. Als Molekulargewichtsmarker diente der *PageRuler Prestained Protein Ladder* (10 – 180 kDa) (26616, Thermo Fisher Scientific). Zellysate wurden vor elektrophoretischer Auftrennung mit 1 x Protein-Gelladepuffer Roti Load 1 versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Bis die Lauffront die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatte, wurde eine Spannung von 100 V angelegt und diese bis zur vollständigen Auftrennung (60 – 80 min) auf 160 V erhöht.

3.6.3 Immunoblot

Die Übertragung der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (10600001, GE Healthcare) erfolgte in einem *Tank-Blotting*-System (1703930, Bio-Rad Laboratories). Dazu wurden die Komponenten zunächst in Transferpuffer (25 mmol/l Tris-

Base; 192 mmol/l Glycin; 20 % (v/v) Methanol (4627.6, Carl Roth)) getränkt und in der folgenden Reihenfolge, von der Anode zur Kathode, luftblasenfrei geschichtet: Schaumstoffpolster, Blotting-Filterpapier (1703956, Bio-Rad Laboratories), Nitrozellulosemembran, SDS-Polyacrylamidgel, Blotting-Filterpapier, Schaumstoffpolster. Der Transfer wurde gekühlt für 90 min bei 80 V durchgeführt.

3.6.4 Reversible Ponceau S-Färbung

Zur Visualisierung der übertragenen Proteine wurden Nitrozellulosemembranen für 5 min in Ponceau S-Lösung (0,1 % (w/v) Ponceau S (P3504-50G, Sigma-Aldrich); 5 % (v/v) Essigsäure) geschwenkt und folgend in Wasser entfärbt.

3.6.5 Blockieren

Nitrozellulosemembranen wurden für 1 h in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T (20 nmol/l Tris-Base; 137 mmol/l NaCl; 0,1 % Tween-20) bei Raumtemperatur blockiert.

3.6.6 Immundetektion

Nitrozellulosemembranen wurden auf einem Schüttler für 90 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit primärem Antikörper inkubiert. Nach dreifachem Waschen mit TBS-T wurden die Nitrozellulosemembranen für 60 min bei Raumtemperatur mit einem entsprechenden HRP-konjugierten sekundären Antikörper auf einem Schüttler inkubiert. Vor Immundetektion wurde dreifach mit TBS-T und einfach mit TBS gewaschen. Die Chemilumineszenzsignale wurden mithilfe der HRP-Substratlösungen (WBKLS0500, Millipore) und des *LAS-3000 mini Imaging System* (FUJIFILM Corporation, Tokyo, Japan) detektiert und unter Verwendung von der Software *NIH ImageJ* (Version 1.44) (132) quantifiziert.

3.6.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm *GraphPad Prism* (Version 8.0.0 für Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Der ungepaarte, zweiseitige t-Test wurde für Vergleiche zweier Gruppen, die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem *post-hoc* Tukey-B-Test für Vergleiche von mehr als zwei Gruppen verwendet. Für Korrelationen wurde der Pearson'sche Korrelationskoeffizient, gefolgt von

einer linearen Regression berechnet. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung der P-gp-Plasmide

P-gp wurde in zwei verschiedenen Varianten kloniert (Vektorkarten vgl. 8.1). Das Konstrukt pcDNA-P-gp-myc besitzt zusätzlich zur P-gp-Sequenz einen 3'-terminal angehängten myc-tag. Ein myc-tag ist ein Polypeptid (EQKLISEEDL), welches mithilfe des hochaffinen 9E10-Antikörpers nachgewiesen werden kann (133). Diese Variante wurde gewählt, um das Protein zusätzlich zu einem P-gp-Antikörper, mit dem myc-tag-Antikörper nachweisen zu können. Des Weiteren wurde das Plasmid pcDNA-P-gp hergestellt, welches die P-gp-Sequenz in nativer Form beinhaltet. Dieses Konstrukt wurde kloniert, um auszuschließen, dass der myc-tag die Proteineigenschaften von P-gp beeinflusst.

Die DNA-Sequenz der klonierten Konstrukte wurde mittels Restriktionsanalyse überprüft, indem die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung (Abbildung 1) mit den Größenangaben aus den zur Klonierung erstellten Vektorkarten verglichen wurden (Tabelle 13).

Die Restriktionsendonukleasen *NotI* und *XmaI* erzeugen für pcDNA-P-gp DNA-Fragmente der Größe 8167 bp und 1165 bp und sind im Agarose-Gel anhand der Banden bei ~ 8,1 kb und ~ 1,1 kb erkennbar (s. Spur *pcDNA-P-gp*). Die Restriktion von pcDNA-P-gp-myc mit den Enzymen *EcoRI* und *XmaI* erzeugen DNA-Fragmente der Größe von 5455 bp und 3811 bp und sind nach der elektrophoretischen Auftrennung bei ~ 5,4 kb und ~ 3,8 kb sichtbar (s. Spur *pcDNA-P-gp-myc*). Zusätzlich sind in der Auftrennung beider Konstrukte schwache Signale bei ~ 9 kb erkennbar (s. Spuren *pcDNA-P-gp* und *pcDNA-P-gp-myc*), die mit der Gesamtgröße der Plasmide übereinstimmen. Wahrscheinlich ist, dass ein kleiner Anteil der Plasmid-DNA im Rahmen des Restriktionsverdau nicht vollständig geschnitten wurde, sodass die DNA linearisiert (einmaliger Verdau) oder zirkulär (kein Verdau oder Re-Ligation) vorliegt und daher in der Gesamtlänge im Gel sichtbar ist.

Um die Funktionsfähigkeit der Enzyme zu kontrollieren, wurde der Leervektor mit den zuvor verwendeten Restriktionsendonukleasen, *NotI* und *XmaI* (s. Spur *ctrl pcDNA-P-gp*), sowie *EcoRI* und *XmaI* (s. Spur *ctrl pcDNA-P-gp-myc*), verdaut. Wie erwartet, sind in beiden Ansätzen Banden der Größe ~ 4,3 kb und ~ 1,2 kb im Agarosegel erkennbar. Im Verdau mit *NotI* und *XmaI* ist zudem ein weiteres Signal bei ~ 5,5 kb sichtbar (s. Spur *ctrl pcDNA-P-gp*), welches der Größe des linearisierten Leervektors entspricht. Vergleichend wurde dazu der linearisierte Leervektor auf das Agarosegel aufgetragen. Um eine Re-Ligation zu vermeiden, wurde der Leervektor mit *BamHI* und *ApaI*, wodurch DNA-Fragmente der Größe 5421 bp und 72 bp entstanden sind. Während das kleinere Fragment in der elektrophoretischen

Auftrennung aufgrund der geringen Größe nicht detektiert werden konnte, entspricht das größere Fragment nahezu der linearisierten Gesamtgröße des Leervektors von ~ 5,5 kb (s. Spur *Leervektor, linearisiert*). Darüber hinaus wurde der Leervektor in seiner zirkulären Form aufgetragen. Aufgrund von *supercoil-* (*coil*, dt. Windung), die grundsätzlich schneller, und *nick-* Strukturen (dt. Kerbe), welche gewöhnlich langsamer aufgetrennt werden, weist zirkuläre DNA in einer Elektrophorese nach Größe ein abweichendes Laufverhalten auf. Die verschiedenen Spezies sind bei ~ 9 kb, ~ 5,5 kb und ~ 3,8 kb erkennbar (s. Spur *Leervektor, zirkulär*). Das schwächste Signal der Größe ~ 5,5 kb, zeigt das Laufverhalten des linearisierten Leervektors (s. Spur *Leervektor, zirkulär*) und entspricht demnach der realen Größe des Plasmids.

Tabelle 13: Plasmidgrößen nach Vektorkarten

Plasmid	Gesamt	Vektor	Insert
pcDNA-P-gp	9332 bp	5493 bp	3843 bp
pcDNA-P-gp-myc	9266 bp	5351 bp	3915 bp
Leervektor pcDNA3.1(+)/myc-His A	5493 bp	5493 bp	--

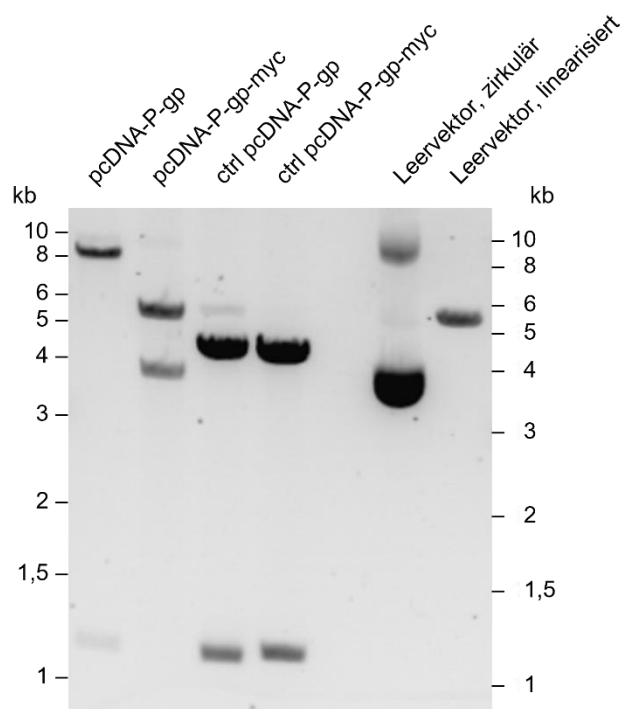


Abbildung 1: Restriktionsanalyse der klonierten P-gp-Konstrukte. Elektrophoretische Auftrennung der P-gp-Konstrukte, sowie des Leervektors nach vorherigem Restriktionsverdau in einem Agarose-Gel (1 %). pcDNA-P-gp und der Leervektor wurden mit *NotI* sowie *XmaI* geschnitten. pcDNA-P-gp-myc und der Leervektor wurden mit *EcoRI* sowie *XmaI* verdaut. Der Leervektor wurde zudem zirkulär und, durch einen Restriktionsverdau mit *BamHI* und *ApaI*, linearisiert aufgetragen.

Die Ergebnisse der Restriktionsanalyse bestätigten die erfolgreiche Klonierung der beiden Konstrukte und weisen auf die Integrität der Plasmide hin. Zur Verifizierung der Nukleotidfolge, sowie zum Ausschluss von Punktmutationen und Leserasterverschiebungen wurde eine Sequenzierung der Konstrukte angeschlossen. Die Auswertung ergab eine vollständige Übereinstimmung der Chromatogramme mit der humanen P-gp-cDNA, sowie eine erfolgreiche Inserierung an gewünschter Stelle. Die Ergebnisse bestätigen somit eine erfolgreiche Klonierung, sowie die grundsätzliche Möglichkeit zur Transkription der generierten P-gp-Konstrukte.

4.2 Expressionelle Verbindung zwischen P-gp und LRP1

4.2.1 Expression und Detektion des ABC-Transporters P-gp

Um die Transfizierbarkeit der DNA-Konstrukte und die Bindung der Antikörper an die exprimierten Proteinen zu überprüfen, wurden HEK 293T-Zellen mit den zuvor klonierten P-gp-Konstrukten und dem Leervektor als Negativkontrolle transient transfiziert.

Als Transfektionsreagenz wurde *PEI MAX* verwendet, da die Methode in Kombination mit der Zelllinie eine etablierte, vergleichsweise unkomplizierte und erfolgsversprechende Methode darstellt.

In Übereinstimmung mit vorherigen Studien, zeigt die Leervektor-Transfektion in HEK 293T-Zellen in diesem Versuchsaufbau lediglich ein schwaches endogenes P-gp-Signal (Abbildung 2) (134). Bei der immunhistochemischen Auswertung der Transfektionen mit dem kommerziellen P-gp-Antikörper, zeigt sich – im Einklang mit weiteren Veröffentlichungen ein diverses Bandenmuster (134, 135). Zusätzlich unterscheiden sich die beiden P-gp-Konstrukte in den resultierenden Signalen im Western Blot. Zellen, die mit pcDNA-P-gp, und somit ausschließlich der P-gp-Sequenz transfiziert wurden, weist ein Signal bei 175 – 180 kDa auf, sowie ein zusätzliches Signal bei ~ 190 kDa, während Zellen, die mit pcDNA-P-gp-myc transfiziert wurden, ein klares Signal bei ~ 180 kDa und ein zusätzliches Signal bei ~ 190 kDa zeigten. Die hierbei auftretenden Größenunterschiede lassen sich durch die ungleichen Konstruktgrößen (lediglich 24 Aminosäuren (Tabelle 13)) nicht hinreichend erklären. Studien, die ebenfalls den kommerziellen P-gp-Antikörper verwendet haben, zeigten ein ähnliches Bandenmuster für HEK 293T-Zellen (134). P-gp wird als *core*-glykosylierte (dt. Kern) Vorläuferform mit einer Größe von ~ 150 kDa im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und im Anschluss im Golgi-Apparat glykosyliert. Die finale glykosylierte Form besitzt eine Größe von ~ 170 kDa (124) – das bei beiden Formen übereinstimmende Signal bei ~ 180 kDa könnte sich verschiedenen Zwischenstufen im Glykosylierungsprozess von P-gp zuordnen lassen (115, 124).

Nach der Verwendung des P-gp-Antikörpers, wurde die Membran erneut mit einem Antikörper, spezifisch gegen den myc-tag gerichtet, behandelt. Die Auswertung lässt, wie erwartet, keine Signale im Bereich der Leervektor- und der pcDNA-P-gp-, also der reinen P-gp-Transfektion erkennen. Die pcDNA-P-gp-myc-Transfektion weist korrespondierend mit den zuvor gezeigten P-gp-Signalen, Banden bei ~ 175 – 180 kDa und ~ 190 kDa auf.

Zuletzt wurde die Membran mit einem Antikörper gegen Aktin inkubiert. Aktin wurde in diesem Versuchsaufbau als Ladekontrolle verwendet. Im Immunoblot zeigt sich bei allen Proben ein Signal für Aktin bei ~ 40 kDa. Die Bande der pcDNA-P-gp-Probe, stellt sich im Vergleich zu den anderen Proben sehr schwach dar, was darauf hinweist, dass bei dieser Probe eine geringere Proteinmenge auf das Gel aufgetragen wurde.

Diese Daten lassen darauf schließen, dass P-gp mithilfe beider Konstrukte in HEK 293T-Zellen überexprimiert werden kann und mit den entsprechenden Antikörpern gegen P-gp und den myc-tag nachweisbar ist. Nichtsdestotrotz zeigt der P-gp-Antikörper in diesem Versuchsaufbau ein diverses Bandenmuster, wodurch Signale unspezifischer Natur nicht auszuschließen sind.

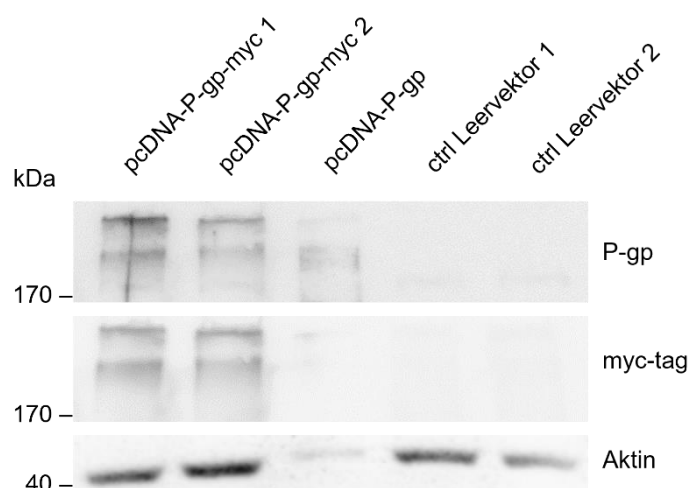


Abbildung 2: Expression der P-gp-Konstrukte in HEK 293T-Zellen. Zellysat (40 µg) von transient mit pcDNA-P-gp-myc, pcDNA-P-gp und Leervektor (von links nach rechts) transfizierten HEK 293T-Zellen wurde mittels Immunoblot qualitativ auf die Expression von P-gp, myc-tag und Aktin analysiert und repräsentativ dargestellt.

4.2.2 P-gp-Überexpression führt zu gesteigerter LRP1-Expression

CHO-K1-Zellen sind aufgrund ihres hohen LRP1-Gehalts (75, 136) ein nützliches Zellmodell, um den Einfluss einer P-gp-Überexpression auf die endogene Expression von LRP1 zu untersuchen. Darüber hinaus weisen sie als epithelartige Zelllinie (137), insbesondere

aufgrund ihrer Barrierefunktion als Oberflächengewebe, Ähnlichkeiten zu Endothelzellen auf (138).

Die beiden P-gp-Konstrukte und der Leervektor wurden mittels der Transfektionsreagenzien *PEI MAX* (Abbildung 3A) und *X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent* (Abbildung 3B) eingebracht.

Als Positivkontrolle dienten bei beiden Versuchen mit pcDNA-P-gp-myc transfizierte HEK 293T-Zellen. Hier zeigt sich, analog zum vorherigen Versuch, eine P-gp-Bande bei ~ 190 kDa (Abbildung 3A + B). Im Vergleich zum Vorversuch lässt sich jedoch in diesem Versuchsaufbau diverse Bandenmuster nicht reproduzieren. In den transfizierten CHO-K1-Zellen zeigt sich, unabhängig vom verwendeten Konstrukt, ein P-gp-Signal als Doppelbande bei ~ 180 kDa und 190 kDa. An den mit dem Leervektor transfizierten Zellen ist anhand dieser Banden die basale P-gp-Expression der CHO-K1-Zellen zu erkennen. Die P-gp-überexprimierenden Zellen zeigen P-gp-Signale in unterschiedlichen Intensitäten. Der Membranabschnitt zwischen ~ 70 kDa und ~ 100 kDa wurde mit dem 1704-Antikörper gegen den C-Terminus der transmembranösen β -Kette von LRP1 behandelt. Die Auswertung der Leervektortransfektionen zeigt durch ein Signal bei ~ 95 kDa, wie für CHO-K1-Zellen erwartet, eine starke LRP1-Grundexpression. In den mit P-gp transfizierten Zellen zeigt sich auf identischer Höhe ebenfalls ein starkes Signal. Des Weiteren weisen die HEK 293T-Zellen, bei erhöhtem Kontrast deutlicher zu sehen, ebenfalls eine Bande für LRP1 auf. Im Anschluss wurde die Membran mit einem Antikörper erneut gegen Aktin inkubiert und die Proben weisen ein entsprechendes Signal bei ~ 40 kDa auf.

Zur quantitativen Analyse wurden die Proteinmengen von P-gp und LRP1 auf Aktin normalisiert. Hier zeigt sich für P-gp-transfizierte Zellen eine im Vergleich zur Leervektor-Transfektion signifikant gesteigerte P-gp-Expression um ~ 30 % (Abbildung 3C). In diesen P-gp überexprimierenden Zellen ist zusätzlich eine Tendenz zu einer um ~ 30 % gesteigerten LRP1-Expression erkennbar (Abbildung 3D).

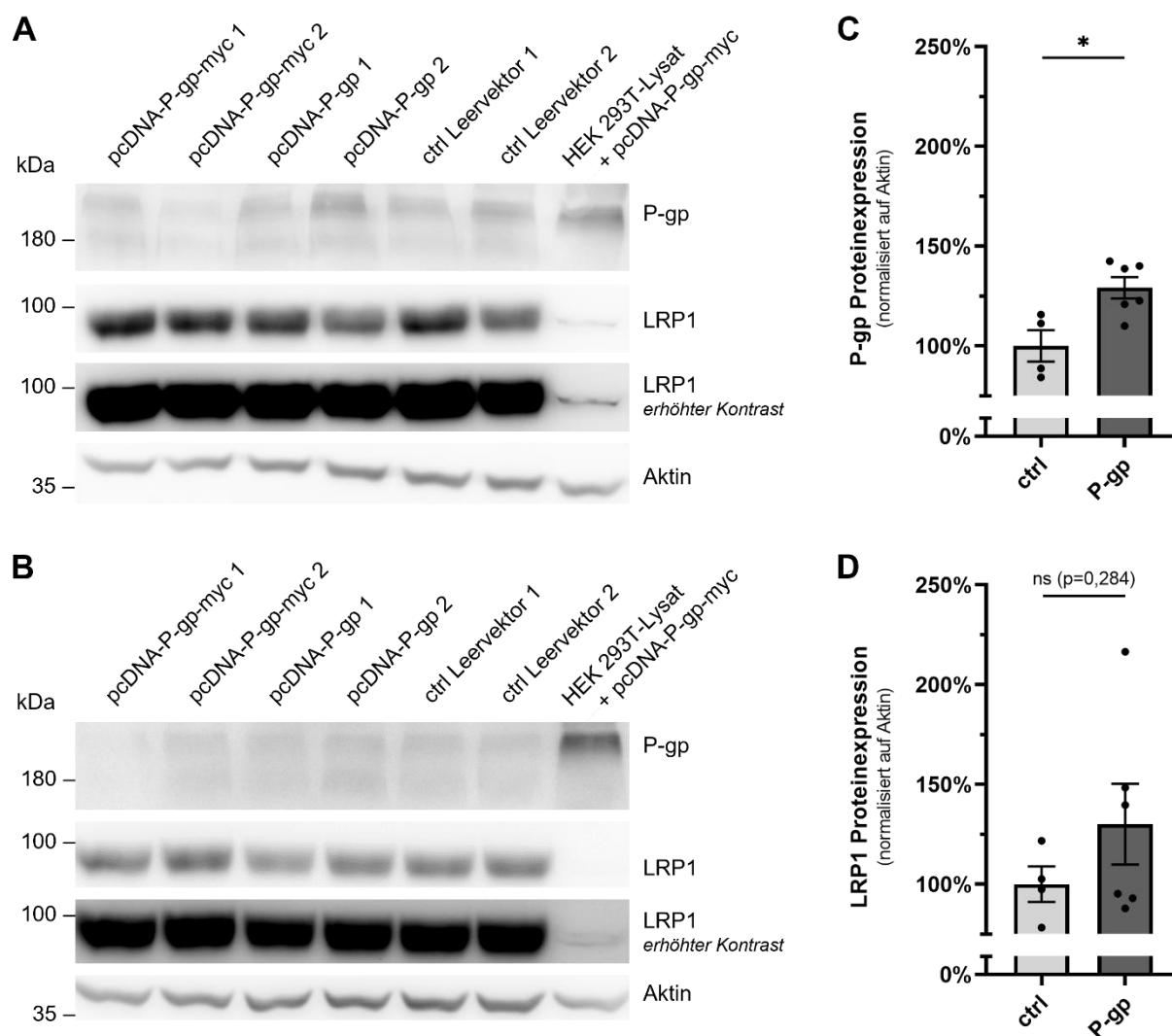


Abbildung 3: Überexpression von P-gp führt zu einer erhöhten Expression von LRP1 in CHO-K1-Zellen. **A + B** Zelllysate (40 µg) von transient mit pcDNA-P-gp-myc, pcDNA-P-gp und Leervektor (von links nach rechts) transfizierten CHO-K1-Zellen wurde mittels Immunoblot auf die Expression von P-gp, LRP1 und Aktin analysiert und repräsentativ dargestellt. Transfektionen wurden mit **A** PEI MAX und **B** X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent als Transfektionsreagenz durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde Zelllysate von transient mit pcDNA-P-gp-myc transfizierten HEK 293T-Zellen verwendet.

C + D Statistische Auswertung der Immunblots **A** und **B**. **C** P-gp- und **D** LRP1-Expressionssteigerung in Zellen mit P-gp-Überexpression (P-gp) (pcDNA-P-gp-myc und pcDNA-P-gp) im Vergleich zu Zellen mit Leervektor-Transfektion (ctrl).

Die Proteinmengen wurden zunächst jeweils auf Aktin normalisiert und als Prozentwert zum Mittelwert der Kontrollen dargestellt. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung abgebildet. In **C** und **D** mit jeweils $n = 4$ Kontrollen und $n = 8$ P-gp-Transfektionen von zwei unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Analyse wurde der ungepaarte, zweiseitige t-Test verwendet (ns = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Um die expressionelle Beziehung zwischen P-gp und LRP1 an einem BHS-Modell zu überprüfen, wurden die aus Hirngewebe isolierten und immortalisierten bEnd.3-Endothelzellen verwendet. Diese wurden mithilfe einer Kombination aus *Lipofectamine LTX* und *FuGENE HD* mit beiden P-gp-Konstrukten und dem Leervektor transfiziert (Abbildung 4A).

In der immunhistochemischen Auswertung zeigt sich in dem mit dem P-gp-Antikörper behandelten Membranabschnitt in allen Transfektionen eine gleichförmige Bande bei ~ 180 kDa. Der gegen LRP1 behandelte Membranabschnitt weist in allen Zellen ein Signal für LRP1 bei einer Höhe von ~ 100 kDa auf. Des Weiteren ist bei allen Proben bei ~ 40 kDa ein Signal für das als Ladekontrolle verwendete Aktin.

Die quantitative Auswertung der P-gp-Transfektionen zeigt im Vergleich zu den Kontrollen eine Zunahme der P-gp-Expression um mehr als 80 % (Abbildung 4B). Darüber hinaus war in den P-gp-überexprimierenden Zellen eine signifikante LRP1-Expressionsteigerung von ~ 140 % messbar (Abbildung 4C).

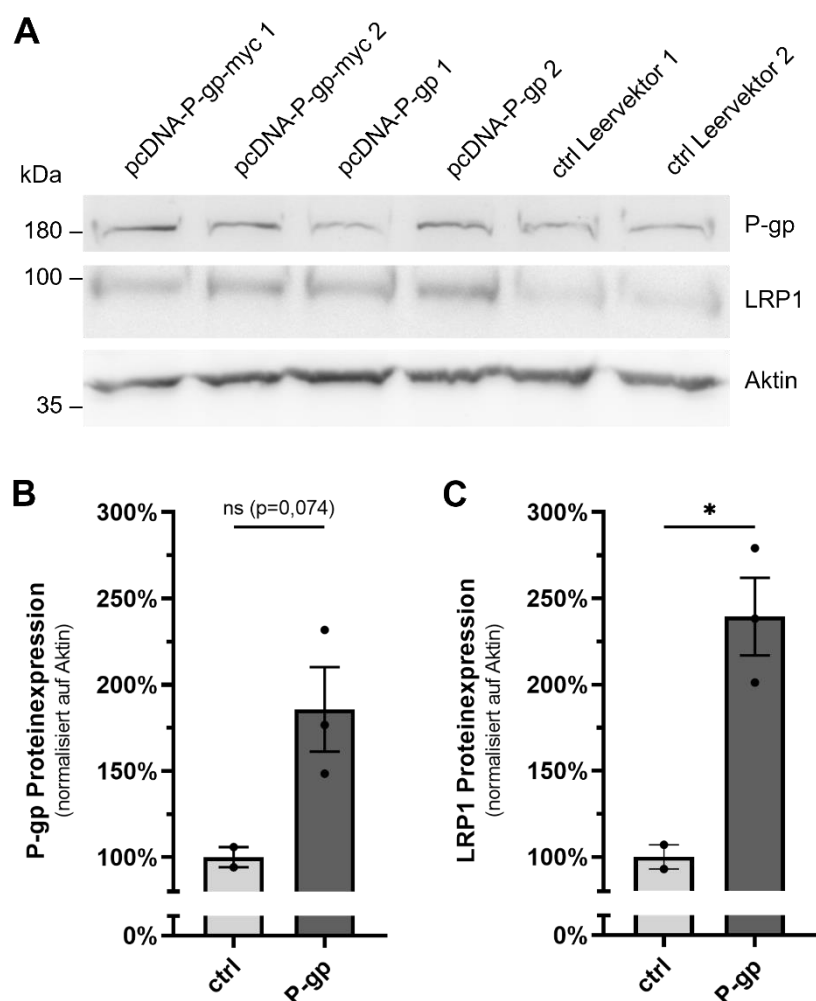


Abbildung 4: Endotheliale P-gp-Überexpression führt zu erhöhten LRP1-Mengen. **A** Zellysat (40 µg) von transient mit pcDNA-P-gp-myc, pcDNA-P-gp und Leervektor (von links nach rechts) transfizierten bEnd.3-Zellen wurde mittels Immunoblot auf die Expression von P-gp, LRP1 und Aktin analysiert.

B + C Statistische Auswertung des Immunoblots **A**. **B** P-gp- und **C** LRP1-Expressionssteigerung in Zellen mit P-gp-Transfektion (P-gp) (pcDNA-P-gp-myc und pcDNA-P-gp) im Vergleich zu Zellen mit Leervektor-Transfektion (ctrl).

Zum Vergleich der Gruppen wurden die Proteinmengen zunächst jeweils auf Aktin normalisiert und als Prozentwert zum Mittelwert der Kontrollen dargestellt. Die Daten werden als Mittelwert ± Standardabweichung abgebildet. In **B** und **C** mit jeweils n = 2 Kontrollen und n = 4 P-gp-Transfektionen eines Experiments. Zur statistischen Analyse wurde der ungepaarte, zweiseitige t-Test verwendet (ns = nicht signifikant, *p < 0,05, **p < 0,01).

Die detektierten Proteinmengen der Endothelzelllinie bEnd.3 korrelieren mit den vorausgegangenen Beobachtungen der CHO-K1-Zellen (Abbildung 3), dass eine Erhöhung der P-gp-Expression zu einer gesteigerten LRP1-Expression führt.

Wertet man die Daten der CHO-K1- und bEnd.3-Transfektionsversuche gemeinsam aus, ergibt sich eine signifikante positive Korrelation ($r = 0,6491$) zwischen der Expressionssteigerung von P-gp und der Zunahme der LRP1-Expression (Abbildung 5).

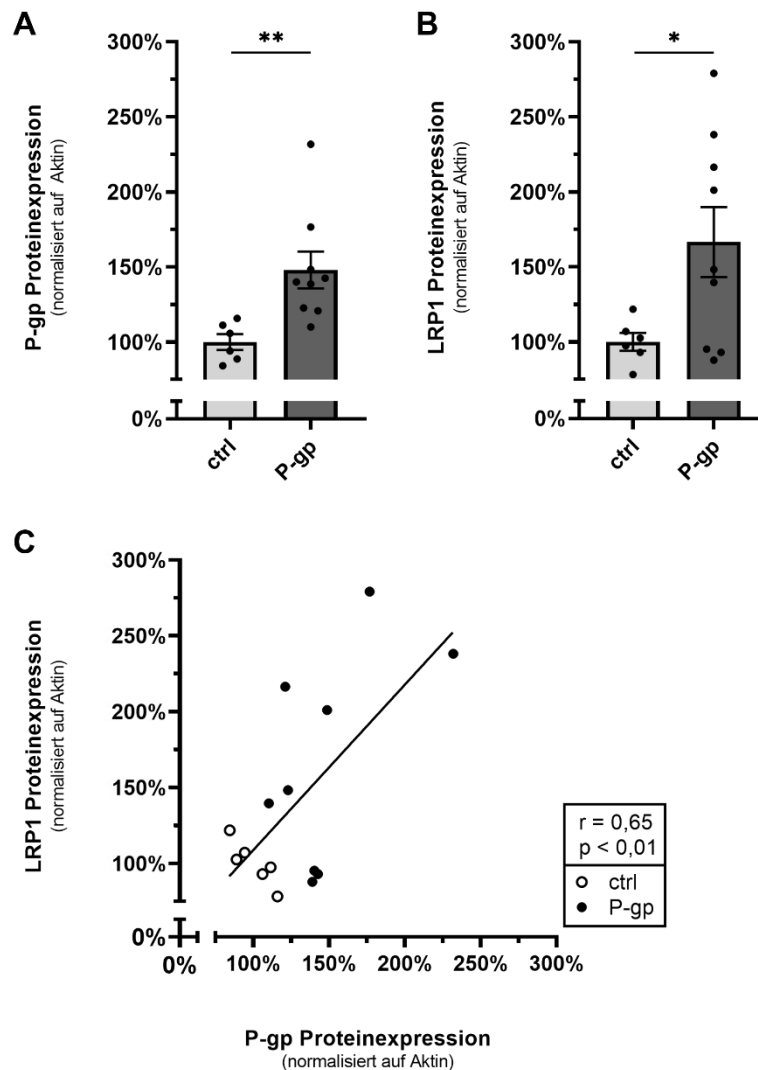


Abbildung 5: Signifikante positive Korrelation zwischen der Proteinexpression von P-gp und LRP1. A + B Statistische Auswertung der Immunoblots aus Abb. 3A + B und 4A. A P-gp- und B LRP1-Expressionssteigerung in CHO-K1- und bEnd.3-Zellen mit P-gp-Überexpression (P-gp) (pcDNA-P-gp-myc und pcDNA-P-gp) im Vergleich zu Zellen mit Leervektor-Transfektion (ctrl).

Zum Vergleich der Gruppen wurden die Proteinmengen zunächst jeweils auf Aktin normalisiert und als Prozentwert zum Mittelwert der Kontrollen dargestellt. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung abgebildet. In A und B mit jeweils $n = 6$ Kontrollen und $n = 10$ P-gp-Transfektionen von drei unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Analyse wurde der ungepaarte, zweiseitige t-Test verwendet (ns = nicht signifikant, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$).

C Streudiagramm mit Regressionsgerade zur Darstellung des Verhältnisses der LRP1-Expression zur Expression von P-gp in CHO-K1- und bEnd.3-Zellen mit P-gp-Überexpression (P-gp) (pcDNA-P-gp-myc und pcDNA-P-gp) und Leervektor-Transfektion (ctrl). Pearson'scher Korrelationskoeffizient $r = 0,65$ (ns = nicht signifikant, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$).

4.3 Räumliche Beziehung von P-gp und LRP1

LRP1 und P-gp befinden sich zu einem hohen Anteil an der Zelloberfläche – LRP1 an der abluminalen und P-gp an der luminalen Zellmembran des BHS-Endothels (74, 119, 120, 122, 123). Um gemeinsam A β von basolateral nach apikal über die BHS zu transportieren, ist es notwendig, dass sich die beiden Interaktionspartner temporär in demselben intrazellulären Zellkompartiment befinden. Diese räumliche Beziehung zwischen P-gp und LRP1 wurde in der aus Hirngewebe isolierten und immortalisierten Endothelzelllinie bEnd.3 mithilfe von Immunpräzipitationen untersucht.

4.3.1 P-gp und LRP1 co-lokalisieren intrazellulär

Zunächst wurden Immunpräzipitationen mit dem 1704-Antikörper gegen LRP1 durchgeführt. Wie zu erwarten, zeigt sich in der immunhistochemischen Auswertung ein LRP1-Signal (Abbildung 6A + B). In dem als Kontrolle verwendeten unbehandelten bEnd.3-Lysat ist nach längerer Belichtung ebenfalls eine LRP1-Bande auf gleicher Höhe sichtbar. Nach Behandlung der Membran mit dem P-gp-Antikörper, zeigt sich ein Signal, was darauf schließen lässt, dass P-gp mit dem LRP1-Immunpräzipitat co-präzipitiert wurde. Eine schwache P-gp-Bande ist nach längerer Belichtung auch im Kontrolllysate erkennbar.

Zur Verifizierung dieser Beobachtungen, wurde der Versuch im umgekehrten Versuchsaufbau wiederholt. Die Immunpräzipitation mit dem P-gp-Antikörper zeigt nach der Auswertung des Immunoblots mit dem P-gp- und dem 1704-Antikörper gegen LRP1 ebenfalls deutliche Banden für beide Proteine (Abbildung 6B). Diese Banden lassen darauf schließen, dass die Präzipitation von P-gp grundsätzlich erfolgreich war und LRP1 mit P-gp co-präzipitiert werden kann.

Um die räumliche Nähe der Proteine weiter zu definieren, wurden die Immunpräzipitationen von LRP1 und P-gp vergleichend mit CHAPS- und NP40-Lysepuffer wiederholt (vgl. 8.2 und Abbildung A.4). Die Ergebnisse der Immunpräzipitation von P-gp zeigen bei beiden Verfahren Signale für P-gp und co-präzipitiertes LRP1. Im direkten Vergleich erscheint die LRP1-Bande im Versuch mit dem NP40-Puffer etwas schwächer ausgeprägt. Die Auswertung der LRP1-Immunpräzipitation mit dem CHAPS-Lysepuffer ergibt ein Signal für LRP1, jedoch keine Bande für co-präzipitiertes P-gp. Mit dem NP40-Lysepuffer ist weder ein LRP1- noch ein P-gp-Signal detektierbar. Die aufgetragenen Kontrolllysate zeigen (mit Ausnahme des bEnd.3-Lysats mit CHAPS-Lysepuffer) in beiden Verfahren lediglich eine LRP1-Bande. Ein Signal für P-gp konnte in keiner der Kontrollen gezeigt werden.

Um die intrazelluläre Lokalisation dieses Zusammentreffens zu bestimmen, wurden die Präzipitate zusätzlich auf Rab 11 und Rab 7 untersucht. Rab-Proteine besitzen eine spezifische Zuordnung zu einem subzellulären Kompartiment (94, 100). Wird ein Protein mit einem Rab-Protein co-präzipitiert, kann daraus abgeleitet werden, in welchen Vesikeln sich das Protein befindet.

Die Auswertung der Immunpräzipitationen von LRP1 und P-gp weisen ein Signal für Rab 11 auf. Im bEnd.3-Zelllysat zeigt sich hingegen kein Signal für Rab 11 (Abbildung 6B). Nach Inkubation der Membran mit einem Rab 7-spezifischen Antikörper ließ sich weder in der Kontrolle noch in den Immunpräzipitaten ein Signal für Rab 7 nachweisen (Abbildung 6B).

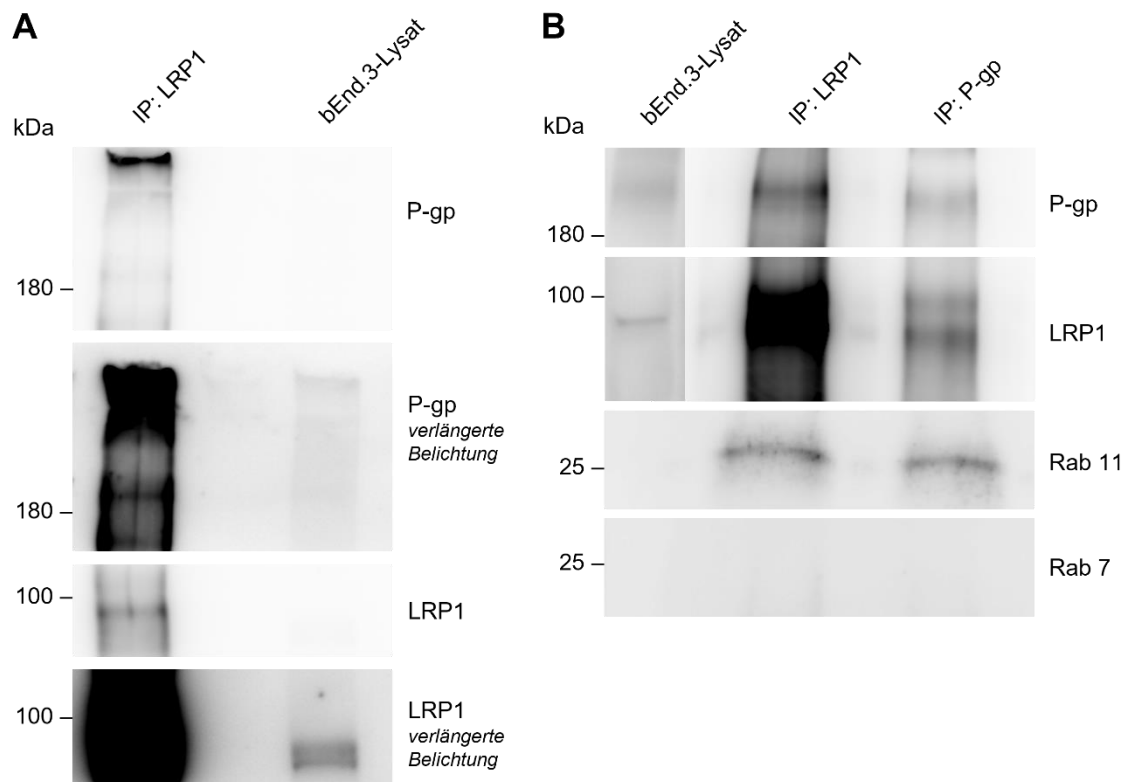


Abbildung 6: Co-Lokalisation von LRP1, P-gp und Rab 11. **A + B** Immunblots von **A** LRP1- (IP: LRP1) und **B** LRP1- (IP: LRP1) und P-gp-Immunpräzipitationen (IP: P-gp) in bEnd.3-Zellen. Zur Immunpräzipitation wurde 1 mg Zelllysat, generiert durch die Nutzung von CHAPS-Lysepuffer, eingesetzt. **A** und **B** zeigen repräsentative Immunoblots aus drei (LRP1), respektive zwei (P-gp) unabhängigen Experimenten.

4.3.2 Die Co-Lokalisation von P-gp und LRP1 findet in *Sorting*-Endosomen statt

Zur Bestätigung der Co-Lokalisation von LRP1, P-gp und Rab 11, wurde eine Immunpräzipitation mit einem Rab 11-Antikörper durchgeführt (Abbildung 7A).

Die Auswertung mit einem Rab 11-spezifischen Antikörper zeigt erwartungsgemäß eine Bande für Rab 11. Bei ~ 25 kDa ist eine zusätzliche Bande erkennbar, welche auf die leichten Ketten des zur Immunpräzipitation verwendeten Antikörpers zurückgeführt werden kann. Die leichten Ketten eines Antikörpers besitzen eine Größe von ~ 25 kDa (139) und sind hier erkennbar, da der zur Immunpräzipitation verwendete und durch das Aufkochen von den Beads gelöste Rab 11-Antikörper aus der Spezies Ziege stammt und der zur Immunodetektion verwendete Sekundärantikörper gegen Ziege gerichtet ist. Die Kontrolllysate aus CHO-K1- und bEnd.3-Zellen weisen kein Signal für Rab 11 auf. Nach Inkubation der Membran mit einem P-gp-spezifischen Antikörper lässt sich bei ~ 185 und 200 kDa ein Signal für P-gp feststellen. Für das CHO-K1-Lysat ist erneut eine P-gp-Doppelbande erkennbar (vgl. 4.2.2 und Abbildung 3A + B), während das bEnd.3-Kontrolllysate kein P-gp-Signal aufweist. Des Weiteren weisen die bEnd.3- und CHO-K1-Lysate eine LRP1-Bande auf, die in den Immunpräzipitaten jedoch nicht detektiert werden konnte.

4.3.3 P-gp und LRP1 werden Clathrin-vermittelt endozytiert

Die Ergebnisse der Immunpräzipitationen von P-gp und LRP1 (Abbildung 6B) haben gezeigt, dass beide Proteine in Rab 11-positiven Vesikeln, dem zentralen Kompartiment der Transzytose, gemeinsam vorliegen. Die initiale Aufnahme des Liganden in die Zelle ist ein weiterer kritischer Schritt im Prozess der Transzytose. Es ist beschrieben, dass sowohl die LRP1-vermittelte Transzytose von A β in menschlichen Hirnendothelzellen (74) als auch die Aufnahme von P-gp in das endosomale System in menschlichen Darmkrebszellen über CME eingeleitet wird (140). Um den Transzytosemechanismus in bEnd.3-Zellen zu verifizieren, wurden Immunpräzipitationen gegen die schwere Kette von Clathrin durchgeführt (Abbildung 7B).

Die Auswertung zeigt eine Co-Präzipitation von P-gp und LRP1 mit der schweren Kette von Clathrin und bekräftigt die Annahme, dass Untersuchungen des Transzytosemechanismus der immortalisierten bEnd.3-Zellen Rückschlüsse auf menschliche Zustände ermöglicht.

Es liegen bislang nur wenige Daten zum Zeitpunkt der Ablösung des Clathrinmantels von der Vesikelmembran vor (91, 141). Die Immunpräzipitation der schweren Kette von Clathrin hat ein Signal bei ~ 30 kDa für co-präzipitiertes Rab 11 ergeben, was darauf hindeutet, dass nach der CME zumindest Teile des Clathrinmantels bis zum *Sorting*-Endosom an der Membran gebunden bleiben.

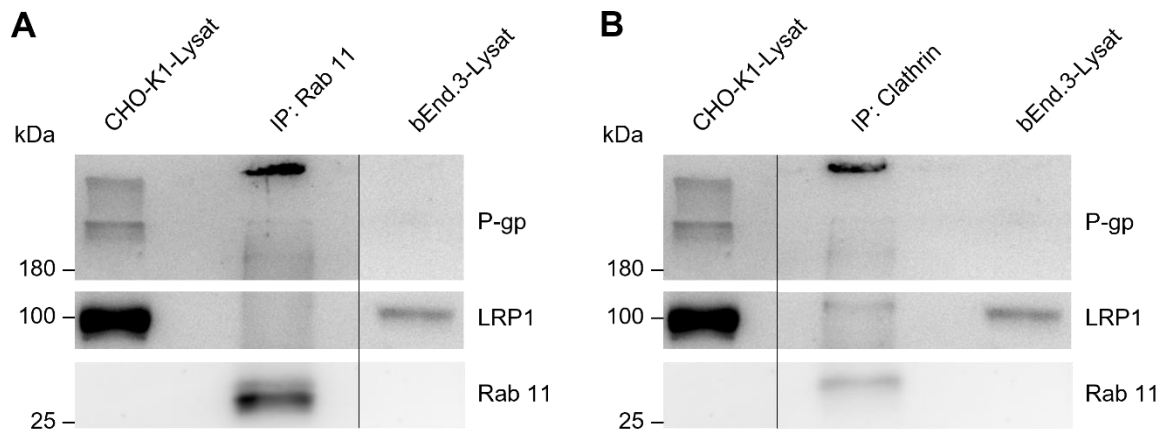


Abbildung 7: Immunpräzipitationen von Rab 11 und der schweren Kette von Clathrin.

Immunoblots von Immunpräzipitationen von **A** Rab 11 (IP: Rab 11) und **B** der schweren Kette von Clathrin (IP: Clathrin). Zur Immunpräzipitation wurde 1 mg Zellysate, generiert durch die Nutzung von CHAPS-Lysepuffer, eingesetzt. **A** und **B** zeigen einen Immunoblot aus einem Experiment. Die Immunpräzipitationen wurden auf demselben Gel der SDS-Page aufgetragen – hier zur Übersichtlichkeit getrennt in **A** und **B** dargestellt.

4.4 Funktionelle Zusammenarbeit von P-gp und LRP1 in der endothelialen A β -Transzytose

4.4.1 Assoziation von PICALM mit P-gp und LRP1

PICALM ist ein bekannter Risikofaktor für Morbus Alzheimer (85–87) und als Regulator an der CME beteiligt (80, 82, 90, 91). Nach Bindung von A β an LRP1 erleichtert PICALM die Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes und vermittelt anschließend den A β -Transport durch die Zelle in Rab 11-positive Vesikel. Die Wechselwirkung zwischen PICALM und LRP1 ist bereits ausführlich beschrieben worden (74), wohingegen noch nicht untersucht worden ist, ob PICALM ebenfalls mit P-gp assoziiert ist und an dessen intrazellulärer Distribution beteiligt sein könnte.

Um dies zu evaluieren, wurde eine PICALM-Immunpräzipitation durchgeführt (Abbildung 8). Als Kontrolle wurde unbehandeltes bEnd.3-Lysat aufgetragen. Übereinstimmend mit den Herstellerangaben des PICALM-Antikörpers zeigt sich sowohl im Immunpräzipitat als auch in der Kontrolle bei ~ 70 kDa eine für PICALM typische Doppelbande. Diese Doppelbande könnte die zwei Isoformen (65 und 70 kDa) von PICALM repräsentieren (84). Nach Inkubation mit einem P-gp-Antikörper war im Immunpräzipitat von PICALM – und nach Kontrasterhöhung auch im unbehandelten bEnd.3-Lysat – ein Signal für P-gp darstellbar, das wie zuvor ein diverses Bandenmuster aufweist (vgl. 4.2.1 und Abbildung 2). Darüber hinaus lässt sich im Immunpräzipitat ein Signal für LRP1 detektieren, welches die Co-Lokalisation von PICALM

und LRP1 bestätigt (74). Das Kontrolllysat zeigt bei erhöhtem Kontrast ebenfalls eine Bande für LRP1.

Um herauszufinden, ob sich PICALM ebenfalls in dem Kompartiment der Co-Lokalisation von P-gp und LRP1 befindet, wurde das Immunpräzipitat auf Rab 11 untersucht. Sowohl das Immunpräzipitat als auch – bei längerer Belichtung – das bEnd.3-Zelllysat zeigen ein Rab 11-Signal. Darüber hinaus sollte ausgeschlossen werden, dass PICALM präzipitiert worden ist, welches sich in Rab 7-positiven Endosomen und somit im Degradationspfad, statt in der Transzytoseroute befindet. Die Auswertung des Immunoblots mit einem Antikörper gegen Rab 7 ergab eine Bande im Kontrolllysat, jedoch kein Signal im Immunpräzipitat, was im Einklang mit vorherigen Studien steht (74).

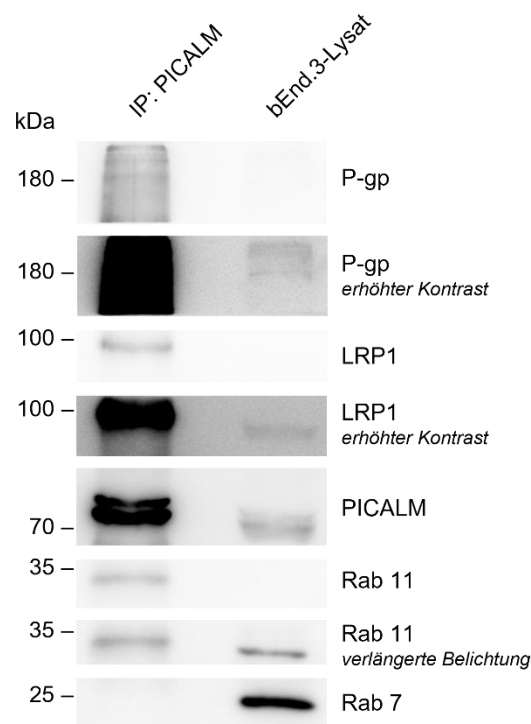


Abbildung 8: PICALM liegt mit P-gp, LRP1 und Rab 11, jedoch nicht mit Rab 7 co-lokalisiert vor. Immunoblot einer Immunpräzipitation von PICALM (IP: PICALM). Zur Immunpräzipitation wurde 1 mg Zelllysat, generiert durch die Nutzung von CHAPS-Lysepuffer, eingesetzt. Das bEnd.3-Kontrolllysat wurde mit einer Proteinmenge von 60 µg verwendet. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Immunoblot aus zwei unabhängigen Experimenten.

4.4.2 Pathophysiologische Konzentrationen von A β verstärken die Interaktion von PICALM mit P-gp, LRP1 und Rab 11

Die Proteine P-gp (13, 111–113), LRP1 (38, 62–64) und PICALM (74) weisen jeweils eine funktionelle Verbindung zu A β auf. Ein erhöhtes A β -Angebot könnte demnach zu einer

verstärkten PICALM-vermittelten Internalisierung von P-gp und LRP1 und somit einer vermehrten Co-Lokalisation von PICALM mit P-gp, LRP1 und Rab 11 führen. Dies könnte die Hypothese untermauern, dass eine Interaktion der Proteine zum Zweck der Transzytose von A β erfolgt. Dazu wurden bEnd.3-Zellen für 4 min mit der pathophysiologischen Konzentration von 1 nmol/l A β_{1-40} inkubiert und anschließend eine Immunpräzipitation mit einem PICALM-spezifischen Antikörper durchgeführt (Abbildung 9A). Als Kontrolle diente eine PICALM-Immunpräzipitation ohne vorherige A β -Stimulation. Außerdem wurde Lysat von A β -stimulierten und nicht-stimulierten bEnd.3-Zellen aufgetragen.

Die Auswertung des Immunoblots zeigt in beiden Immunpräzipitationen Signale für P-gp, LRP1, PICALM und Rab 11. P-gp stellt sich hier als verbreiterte Bande zwischen ~ 170 und 180 kDa dar. In Übereinstimmung mit der vorherigen Immunpräzipitation von PICALM (Abbildung 8) lässt sich kein Signal für Rab 7 nachweisen. Die als Kontrollen verwendeten bEnd.3-Lysate zeigen keine Signale für P-gp und LRP1, jedoch lassen sich PICALM, Rab 11 und Rab 7 detektieren.

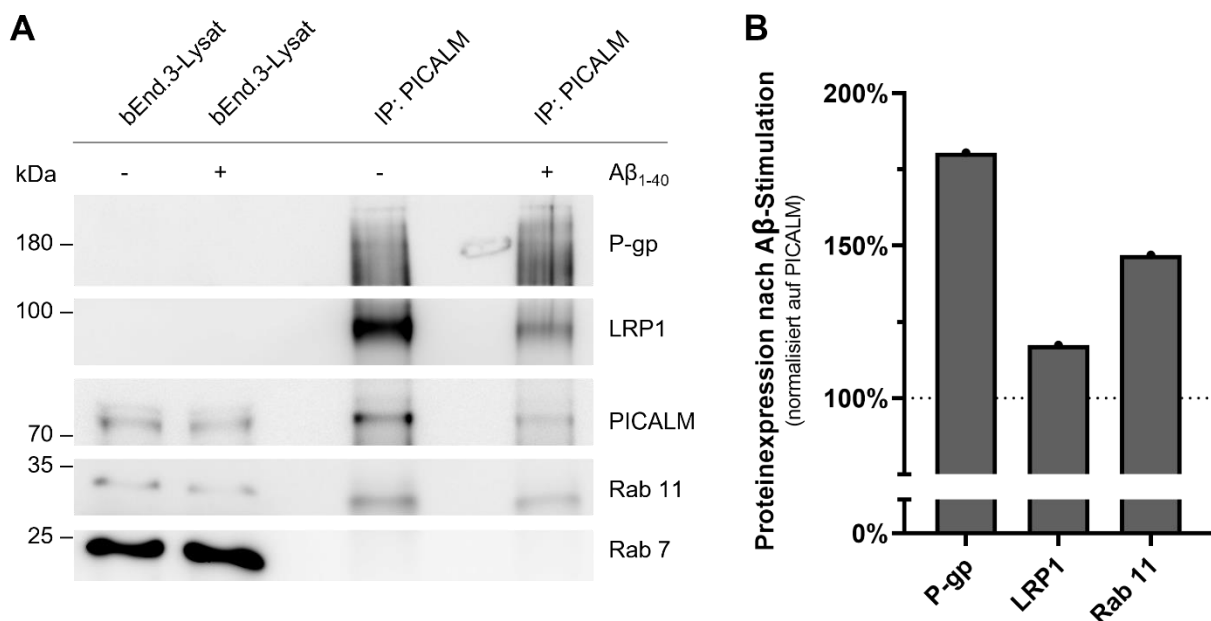


Abbildung 9: A β -Exposition bewirkt verstärkte Co-Lokalisation von P-gp, LRP1 und Rab 11 mit PICALM. **A** Immunoblot einer PICALM-Immunpräzipitation (IP: PICALM) nach Zellstimulation mit 1 nmol/l A β_{1-40} für 4 min. Als Kontrolle diente eine Immunpräzipitation von PICALM (IP: PICALM) ohne vorherige A β -Stimulation, sowie bEnd.3-Zelllysate mit und ohne zuvor stattgefundenener A β -Stimulation. Zur Immunpräzipitation wurde 1 mg Zelllysate, generiert durch die Nutzung von CHAPS-Lysepuffer, eingesetzt. Die bEnd.3-Kontrolllysate wurden mit einer Proteinmenge von 60 μ g aufgetragen. **A** zeigt einen Immunoblot eines Versuchsdurchlaufs.

B Graphische Darstellung und statistische Auswertung des Immunoblots **A** nachdem co-präzipitierte Proteinsignale von P-gp, LRP1 und Rab 11 auf PICALM normalisiert und als Prozentwert zur Kontrolle (- A β_{1-40} -Stimulation) dargestellt wurden.

Diese Daten bestätigen die Ergebnisse der vorausgegangenen PICALM-Immunpräzipitationen (Abbildung 8), indem eine räumliche Beziehung von PICALM, P-gp, LRP1 und Rab 11, jedoch nicht Rab 7 gezeigt werden kann. Darüber hinaus wird deutlich, dass PICALM nach 4-minütiger Applikation von 1 nmol/l A β ₁₋₄₀ eine stärkere Assoziation mit P-gp, LRP1 und Rab 11 aufweist, als nicht-stimuliertes PICALM (Abbildung 9B). Nach A β -Exposition erhöht sich die mit PICALM co-präzipitierte Proteinmenge von P-gp um ~ 80 %, von LRP1 um ~ 20 % und von Rab 11 um ~ 50 %. Nach A β -Inkubation lässt sich darüber hinaus weiterhin keine Assoziation zwischen PICALM und Rab 7 erkennen.

4.4.3 Immunzytochemischer Nachweis von P-gp und LRP1 in bEnd.3-Zellen

Um die Co-Lokalisation von P-gp und LRP1 im Verlauf der Transzytose von A β zu visualisieren, wurden immunzytochemische Färbungen von bEnd.3-Zellen abgeschlossen.

Zunächst musste eine Färbemethode entwickelt werden, um die immunzytochemische Detektion beider Proteine in den Zellen zu ermöglichen. Um das Signal der Färbung spezifisch auf das Zielprotein zurückzuführen und Hintergrundsignale oder eine Autofluoreszenz der Zelle auszuschließen, wurden zur Kontrolle bEnd.3-Zellen – ohne vorherige Inkubation mit einem Primärantikörper – mit dem fluoreszierenden, sekundären Antikörper und dem Kernfarbstoff DRAQ5 inkubiert und mit derselben Wellenlänge angeregt. In diesen Kontrollfärbungen konnte keine substantielle Hintergrundfärbung oder Autofluoreszenz der Zellen detektiert werden (Abbildung 10A + C).

Abbildung 10 zeigt die visualisierte Expression von P-gp (B) und LRP1 (D) in bEnd.3-Zellen. Die teils schwachen Signale beider Proteine sind homogen über die Zelle verteilt, was auf eine Lokalisation der Proteine an der Zellmembran, als auch im Zytosol oder intrazellulären Vesikeln hindeuten könnte.

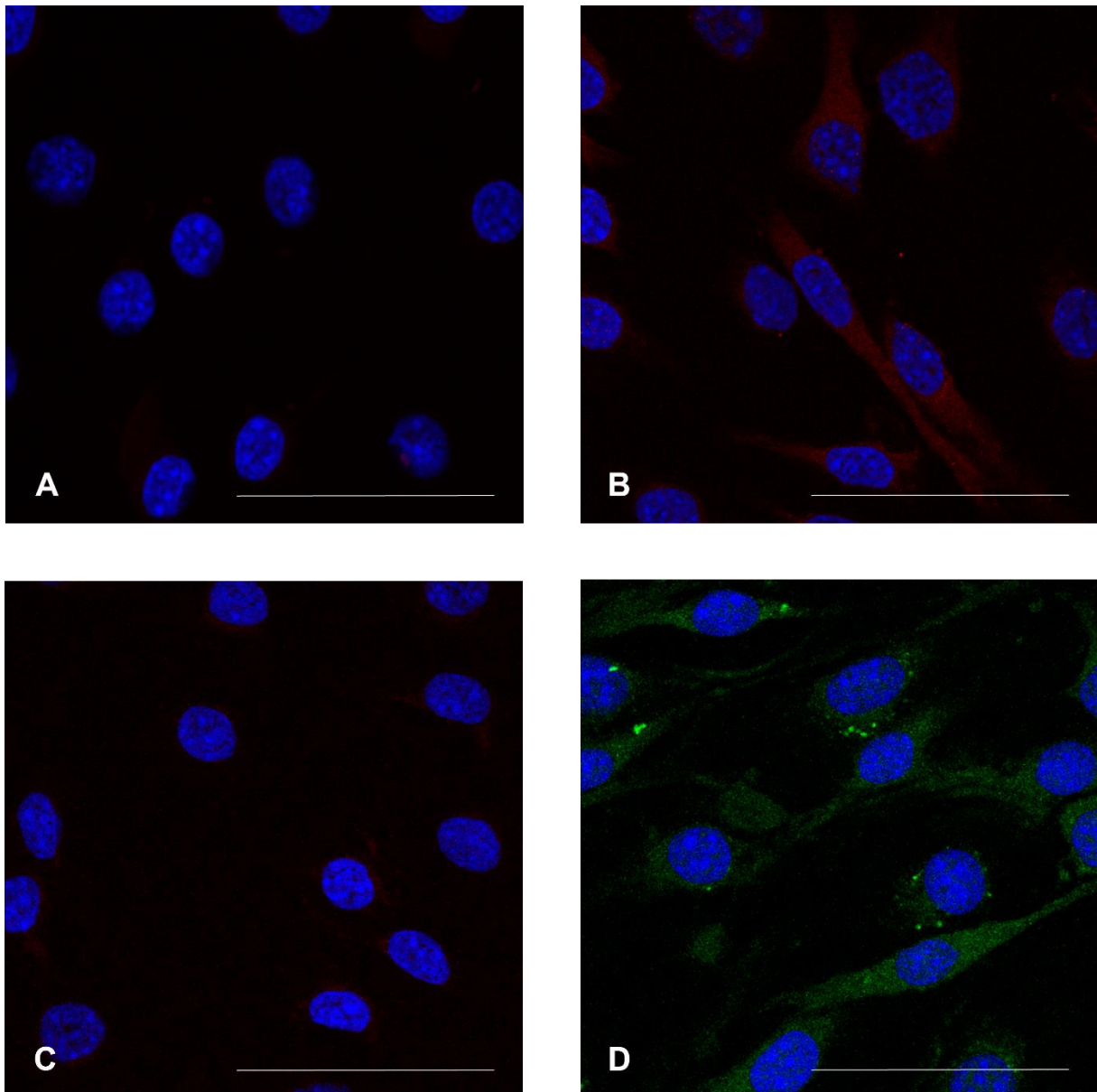


Abbildung 10: Immunzytochemischer Expressionsnachweis von P-gp und LRP1 in bEnd.3-Zellen. Konfokale Lasermikroskopie von immunzytochemischen Färbungen von bEnd.3-Zellen. **A + C** Kontrollfärbungen wurden ohne Primärantikörper, sondern nur mit dem fluoreszierenden sekundären Antikörper **A** Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor™ 546 (rot) und **C** Ziege-anti-Maus Alexa Fluor™ 488 (rot) durchgeführt. **B + D** Immunfluoreszierende Färbungen von **B** P-gp mithilfe des Mdr H-241- und des Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor™ 546-Antikörpers (rot) sowie **D** LRP1 mit dem B411E2- und dem Ziege-anti-Maus Alexa Fluor™ 488-Antikörper (grün). Kerngegenfärbung mit 5 µmol/l DRAQ5 (blau). Maßstabskala: 50 µm.

Die erfolgreiche Etablierung der Methode bildete die Grundlage für immunzytochemische Co-Färbungen von P-gp, LRP1, PICALM und Rab 11 nach vorheriger A β -Stimulation (63).

5 Diskussion

Die Akkumulation des neurotoxischen A β -Peptids ist ein Hauptmerkmal der Pathologie von Morbus Alzheimer (9, 10). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass der Transport über die BHS ein wichtiger Eliminationsweg für den A β -Abtransport aus dem Gehirn darstellt (13, 38, 75, 142). Proteine wie der luminal exprimierte ABC-Transporter P-gp (119–121, 124) und der abluminale Rezeptor LRP1 (74) spielen eine entscheidende Rolle bei dem transendothelialen A β -Efflux aus dem Gehirn (13, 75, 111–113, 127). Die exakten molekularen Mechanismen der A β -Transzytose durch das Endothel der BHS sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Basierend auf unserer Hypothese eines direkt verknüpften A β -Eliminationsweges von LRP1 als Endozytose- und P-gp als Exozytosepartner, wurde die Beziehung beider Proteine zueinander auf unterschiedlichen Ebenen evaluiert.

5.1 Überexpression von P-gp führt zu gesteigerter LRP1-Menge

Einige Studien konnten sowohl im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses, als auch in Patienten und Mausmodellen mit Morbus Alzheimer, eine Herunterregulation von P-gp und LRP1 in Gehirn und Kapillaren feststellen (13, 75, 127, 142, 143). Zusätzlich wurde gezeigt, dass zerebrale Blutgefäße von P-gp^{-/-}-Mäusen, verglichen mit wildtypischen-Mäusen eine Reduktion der LRP1-Expression um etwa 50 % aufweisen (13).

Um zu klären, ob die Expression der beiden Proteine miteinander in Verbindung steht, wurde die LRP1 Expression nach transienter Überexpression von P-gp in CHO-K1- und bEnd.3-Zellen untersucht. In den epithelartigen CHO-K1-Zellen führte die Transfektion zu einer signifikanten Expressionssteigerung von P-gp um etwa 30 % im Vergleich zum endogenen Expressionslevel sowie zu einer um etwa 30 % erhöhten LRP1-Menge (Abbildung 3C + D). Analog hierzu zeigten bEnd.3-Zellen nach Transfektion neben einer erhöhten P-gp-Expression von etwa 80 %, eine um etwa 140 % gesteigerte LRP1-Menge im Vergleich zum endogenen Zustand (Abbildung 4B + C). Während die Proteinmengen von P-gp und LRP1 in CHO-K1-Zellen im gleichen Verhältnis zunahm, zeigte die Endothelzelllinie bEnd.3 eine um den Faktor 1,75 erhöhte Expressionssteigerung im Vergleich zu P-gp.

Eine gemeinsame Auswertung der Ergebnisse beider Zelllinien zeigte bei einer Erhöhung der Expression von P-gp um 40 % (Abbildung 5A), eine Zunahme von LRP1 um etwa 60 % (Abbildung 5B) und somit eine signifikante positive Korrelation ($r = 0,649$) der P-gp-Expressionsszunahme zu der Steigerung der LRP1-Proteinmenge in den Zellen (Abbildung 5C).

Unglücklicherweise konnte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss einer transienten LRP1-Überexpression auf die Expression von P-gp nicht untersucht werden, da die Größe des LRP1-Proteins und demnach die des DNA-Konstruktes eine effektive Transfektion mit den zur Verfügung stehenden Methoden verhindert. Der umgekehrte Einfluss der LRP1-Überexpression auf die Expression von P-gp bleibt daher noch zu untersuchen.

Unsere Arbeitsgruppe war jedoch in der Lage eine wesentliche expressionelle Verbindung beider Proteine *ex vivo* festzustellen. Hierbei ging eine genetische Deletion von endothelialem LRP1 in zerebralen Kapillaren von Mäusen mit einer Verringerung der endothelialen P-gp-Expression um etwa 60 % einher (63), was die Hypothese bekräftigt, dass sich die Expression beider Proteine gegenseitig signifikant reguliert.

Die unterschiedlich starke Zunahme von P-gp in CHO-K1- und bEnd.3-Zellen nach Transfektion lässt sich bereits durch verschiedene experimentelle Faktoren begründen. Die Auswahl der Zelllinie und des Transfektionsreagenzes können Transfektionseffizienzen wesentlich beeinflussen (144). Betrachten wir jedoch die Wechselwirkung der beiden Proteine untereinander, könnte die expressionelle Abhängigkeit des gegensätzlich lokalisierten P-gp und LRP1 auf einen zugrundeliegenden intrazellulären Transportmechanismus hindeuten, an dem beide Proteine funktionell beteiligt sind. Gegeben, dass Endothelzellen eine höhere Transzytoserate als ovarielle Epithelzellen (CHO-K1-Zellen) aufweisen, könnte dies erklären weshalb die Expressionssteigerung von LRP1 in bEnd.3-Zellen höher ausfällt als dies in CHO-K1-Zellen zu beobachten ist. Es ist möglich, dass für diese Korrelation eine indirekte Verbindung von P-gp und LRP1 über Mediatoren ursächlich sein könnte. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren wie *Peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR) die Expression von P-gp und anderen ABC-Transportern regulieren (145). LRP1 gilt als Co-Aktivatoren von PPAR γ (146). Demnach könnte bei einer Deletion des PPAR-Co-Aktivatoren LRP1, die Expression von P-gp beeinflusst bzw. verringert werden.

Verschiedene pharmakologische Substanzen modulieren P-gp und beeinflussen infolgedessen den Transport von P-gp-Substraten. Zu den Stoffen mit inhibitorischer Aktivität zählen unter anderem Verapamil, Ciclosporin A, Erythromycin, Progesteron und HIV-Proteaseinhibitoren. Hyperforin, Dexamethason, β -Östradiol und Koffein induzieren hingegen sowohl die Funktion als auch die Expression von P-gp (147–149). Ebenso bewirken Rifampicin und Doxycyclin über eine Aktivierung des nukleären Rezeptors Pregnan-X-Rezeptor (PXR), eine Erhöhung der P-gp-Expression (150). Medikamente mit inhibitorischen oder induzierenden Effekten auf P-gp finden im klinischen Alltag in vielfältigen Bereichen Anwendung (151–153). Aufgrund der beobachteten expressionellen Verknüpfung von P-gp

und LRP1 sind beim Einsatz der Medikamente, neben der P-gp-Regulation, weitere Auswirkungen auf LRP1 und dessen Liganden zu vermuten. Bislang gibt es nur wenige Studien, die den Einfluss der genannten Substanzen auf die LRP1-Expression und -Funktion untersucht haben. Eine Studie konnte jedoch das Antibiotikum Rifampicin als Induktor für P-gp und auch LRP1 identifizieren (64). Die Anwendung von Medikamenten wie Rifampicin, welche die P-gp- sowie die LRP1-Expression erhöhen, könnten konsekutiv zu einem verstärkten A β -Transport und einer verringerten A β -Akkumulation im Gehirn führen. Es konnte gezeigt werden, dass bereits geringe Plasmakonzentrationen von Rifampicin die A β -Clearance erhöhen (64). P-gp-induzierende Wirkstoffe könnten somit eine effektive therapeutische Strategie darstellen, um die Menge an neurotoxischem A β im Gehirn zu verringern und bei frühzeitiger Einnahme so das Erkrankungsrisiko für Morbus Alzheimer vermindern. Denkbar wäre darüber hinaus, dass eine Verringerung der A β -Last zu einem verlangsamten Krankheitsprozess oder gar einer Besserung der Demenzsymptomatik führt. In einer randomisierten, kontrollierten Dreifachblindstudie mit 101 Probanden mit leichter bis mittelschwerer Alzheimer-Erkrankung, führte die kombinierte tägliche Verabreichung der Antibiotika von Rifampicin und Doxycyclin über einen Zeitraum von drei Monaten zu einem signifikant geringeren dysfunktionalen Verhalten und kognitiven Abbau im Vergleich zur Placebogruppe (154). Unglücklicherweise konnten diese Ergebnisse in einer größeren Studie mit 406 Probanden über den Zeitraum von zwölf Monaten nicht reproduziert werden (155).

Im Gegensatz zu Induktoren könnte die Einnahme von Medikamenten mit inhibitorischer Wirkung auf P-gp zu einer Verringerung der A β -Clearance über die BHS führen und die zerebrale A β -Akkumulation verstärken. So konnte gezeigt werden, dass Rifampicin in hohen Konzentrationen als P-gp-Inhibitor wirkt und infolgedessen den A β -Transport verringert (64). Des Weiteren konnte in einer Studie nach Applikation von Verapamil und Ciclosporin A eine Erhöhung der A β -Menge in Rattengehirnen festgestellt werden (113). Interessanterweise zeigte sich, dass A β selbst dazu in der Lage ist die P-gp-Expression zu beeinträchtigen und somit die eigene Akkumulation zu begünstigen (156). Eine Studie mit nicht dementen, älteren Menschen konnte zeigen, dass die vaskuläre Expression von P-gp invers mit der Ablagerung von A β korreliert (127). Studien zur Langzeiteinnahme von P-gp-Inhibitoren, wie Verapamil in der Hypertonie- oder HIV-Proteaseinhibitoren in der HIV-Therapie könnten genauere Daten über die Auswirkungen der veränderten P-gp-Expression auf die zerebrale Akkumulation von A β liefern.

Somit lässt sich festhalten, dass die pharmakologische Beeinflussung von P-gp, und indirekt auch LRP1, komplexe Auswirkungen hat. Beide Proteine besitzen neben dem Transport von A β an der BHS weitere vielseitige Funktionen (157, 158). Ein Eingriff in die Expression und Aktivität der Proteine könnte somit weitreichende Konsequenzen haben. Die weitere Erforschung der expressionellen Regulierung der beiden Proteine und dessen Folgen, könnten

einen wichtigen Beitrag zu unserem Verständnis der Pathophysiologie von Morbus Alzheimer und dessen Therapie leisten.

5.2 *Sorting*-Endosomen: Kompartiment der Co-Lokalisation von P-gp und LRP1

P-gp als auch LRP1 nehmen wichtige Rollen im endothelialen A β -Transport über die BHS ein (13, 75, 112, 159) und weisen nach unseren Untersuchungen eine deutliche expressionelle Abhängigkeit auf. Wenn beide Proteine den A β -Efflux durch Hirnendothelzellen gemeinsam vermitteln, wäre eine direkte Bindung zwischen P-gp und LRP1 oder eine indirekte Interaktion über gemeinsam genutzte intrazelluläre Vesikel denkbar.

Um eine räumliche Beziehung von P-gp und LRP1 in Endothelzellen zu überprüfen, wurden bEnd.3-Zellen mit dem Lysepuffer CHAPS lysiert. CHAPS ist ein zwitterionisches Detergens (160), das sehr effektiv Protein-Protein-Interaktionen und Proteinkomplexe aufbricht, ohne die Sekundär- oder Tertiärstrukturen der Proteine zu verändern. Bei Verwendung mit reinen Lipidmembranen wird CHAPS als „schwaches“ Detergens charakterisiert, welches die Membrananordnung weitestgehend erhält, wodurch größere Membranfragmente entstehen (161). Für Proteine aus Immunpräzipitationen mit Lysaten, die mithilfe von CHAPS-Lysepuffer gewonnen wurden, wurde daher angenommen, dass sie mit den co-präzipitierten Proteinen in räumlicher Nachbarschaft zueinanderstehen.

Im Gegensatz hierzu wird das bereits zuvor verwendete Nonidet P40, ein nicht-ionisches Detergens (160), hinsichtlich seines Verhaltens gegenüber reinen Lipidmembranen als „starkes“ Detergens mit einer störenden Wirkung auf die Membrananordnung beschrieben und bewirkt somit eine Fragmentierung der Membran (161). Im Vergleich zu CHAPS scheint es weniger effektiv im Aufbrechen von Protein-Protein-Interaktionen zu sein (162). Für Immunpräzipitationen mit Lysaten, die unter Gebrauch von NP40-Lysepuffer gewonnen wurden, wurde daher angenommen, dass die co-präzipitierten Proteine in einem direkten Komplex miteinander vorliegen.

Mittels beider P-gp-Immunpräzipitationsverfahren konnte LRP1 co-präzipitiert werden (Abbildung 6B und Abbildung A.4). Diese Versuche weisen darauf hin, dass eine räumliche Co-Lokalisation (bspw. innerhalb von Vesikeln) stattfinden, sowie eine direkte Bindung vorliegen könnte. Im direkten Vergleich ist die LRP1-Bande bei der Immunpräzipitation mit dem NP40-Lysepuffer schwächer ausgeprägt (Abbildung A.4), was darauf hindeuten könnte, dass eine direkte Interaktion seltener stattfindet oder von kürzerer Dauer ist als die räumliche Co-Lokalisation in einer Lipidmembran.

In zwei der drei LRP1-Immunpräzipitationsversuche mit CHAPS-Lysepuffer (Abbildung 6A + B) konnte ein Signal für P-gp im Co-Präzipitat nachgewiesen werden, während dies für einen Versuchsdurchlauf nicht gelang (Abbildung A.4A). Zusätzlich konnte weder LRP1 noch P-gp in der LRP1-Immunpräzipitation mit NP40-Lysepuffer präzipitiert werden (Abbildung A.4B). Da nicht einmal das Zielprotein LRP1 immunpräzipitiert werden konnte, ist anzunehmen, dass die LRP1-Immunpräzipitation in diesem Versuchsaufbau nicht funktioniert hat. Es ist zu berücksichtigen, dass die Aussagekraft der Immunpräzipitationen mit NP40-Lysepuffer aufgrund der geringen Versuchsdurchläufe ($n = 1$) als eingeschränkt zu bewerten ist und das Experiment zur Überprüfung der Daten wiederholt werden sollten.

Die Daten der Immunpräzipitationen können erstmalig zeigen, dass beide Proteine nicht nur gemeinsam innerhalb einer Endothelzelle vorliegen, sondern direkt miteinander in Interaktion treten könnten. Da sich beide Proteine an verschiedenen Bereichen der Endothelzellmembran zu befinden scheinen (119, 120, 122–124), liegt die Vermutung nahe, dass die Interaktion der Proteine intrazellulär stattfindet und womöglich der A β -Transzytose dienen könnte. Es bleibt jedoch anzumerken, dass im Widerspruch zu einer Vielzahl an Studien eine Arbeit besagt, dass P-gp in Hirnendothelzellen von Ratten nicht ausschließlich auf der apikalen, sondern auch an der basolateralen Membran exprimiert wird (163) und es wird zudem spekuliert, dass auch LRP1 in geringen Mengen auf der luminalen Seite exprimiert werden könnte (73). Außerdem ist zu berücksichtigen, dass diverse Umgebungsfaktoren Endothelzellen in ihren Eigenschaften beeinflussen und die typischen Merkmale der BHS verändern können (48). So können selbst kleinere Abweichungen im Versuchsaufbau zu unterschiedlichen Resultaten in Studien führen. Dies kann unter anderem die Transportbarriere betreffen und zu Veränderungen der Expression und polarisierten Lokalisation von Transportern, einschließlich P-gp und LRP1 führen (48). So gibt es unter anderem Hinweise, dass in Zellkulturschalen kultivierte bEnd.3-Zellen nicht die klar definierte Polarisation ausbilden können (164).

Eine definitive Erklärung der Zellmembranlokalisation der beiden Proteine und somit der Ausschluss der Co-Lokalisation der beiden Proteine an der Zellmembran, könnte durch Oberflächenbiotinylierungsassays oder hoch-auflösende Immunfluoreszenzfärbungen (vgl. 4.4.3) erzielt werden.

Da jedoch die Mehrheit der Studien darauf hindeutet, dass die beiden Proteine an getrennten Zellmembranbereichen vorkommen, wird im Folgenden angenommen, dass es sich um eine intrazelluläre Interaktion der beiden Proteine handelt. P-gp und LRP1 konnten in Endothelzellen in einer Vielzahl von Zellorganellen nachgewiesen werden (124, 165), wodurch genauer bestimmt werden sollte, in welchem Zellkompartiment die Interaktion stattfinden könnte. Unter anderem sind beide in Organellen der Proteinbiosynthese zu finden (166, 167). Die Prozessierung der LRP1-Vorläufervariante (600 kDa) in α - (515 kDa) und β -Kette (85 kDa)

und die nicht-kovalente Verbindung der beiden Ketten (68), erfolgt erst unmittelbar vor der Distribution an die Zellmembran im trans-Golgi-Kompartiment (168). Da der in den LRP1-Immunpräzipitationen verwendete 1704-Antikörper spezifisch an den C-Terminus von LRP1 – im Bereich der β -Kette – bindet (131), könnte P-gp sowohl unprozessiertem (600 kDa) als auch der β -Kette des prozessierten LRP1 (85 kDa) co-präzipitiert worden sein. Es lässt sich zu diesem Zeitpunkt somit nicht feststellen, ob die Interaktion erst nach dem trans-Golgi-Kompartiment stattfindet.

Zur genaueren subzellulären Lokalisationsbestimmung der Interaktion von P-gp und LRP1 wurde ihre Assoziation mit Rab-Proteinen untersucht. Anhand von Rab-Proteinen lassen sich die verschiedenen Kompartimente des endosomalen-lysosomalen Systems eindeutig strukturell und funktionell unterscheiden (94, 100).

Hierbei konnten die Immunpräzipitationsversuche zeigen, dass die Co-Lokalisation von P-gp und LRP1 nicht in Rab 7-positiven späten Endosomen und somit entlang des darauffolgenden lysosomalen Abbaupfades stattfindet (Abbildung 6B). Während das native Kontrolllysate im Immunoblot ebenso keine Rab 7-Bande aufwies (Abbildung 6B), konnte jedoch das bEnd.3-Kontrolllysate mit einer erhöhten Gesamtproteinkonzentration in einem anderen Versuch ein spezifisches Signal wiedergeben (Abbildung 8 und Abbildung 9A). Dies belegt somit die Nachweisbarkeit von Rab 7 in bEnd.3-Zellen sowie die Funktionsfähigkeit des Rab 7-Antikörpers.

Rab 11-positive *Sorting*-Endosomen hingegen konnten als Kompartiment identifiziert werden, in dem P-gp und LRP1 gemeinsam vorliegen und möglicherweise miteinander interagieren (Abbildung 6B). Analog zu Rab 7 zeigte das bEnd.3-Kontrolllysate erst nach Erhöhung der Gesamtproteinmenge ein Rab 11-Signal (Abbildung 8 und Abbildung 9A). Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass eine Assoziation zwischen P-gp und Rab 11 in polarisierten Zellen existiert (124). Obwohl die Rab 11-Immunpräzipitation kein Signal für LRP1 ergeben hat (Abbildung 7A), ist dennoch aufgrund zuvor erhobener Daten (Abbildung 6B) sowie anderen Studien davon auszugehen, dass LRP1 in Rab 11-Vesikeln vorliegt (169, 170). Unsere Experimente weisen demnach auf eine Co-Lokalisation von prozessiertem LRP1 und P-gp in Rab 11-positiven *Sorting*-Endosomen hin. Einem im basolateral nach apikal gerichteten Transzytoseprozess essentiellen Kompartiment (109).

5.3 Zellmembranständiges P-gp und LRP1 unterliegen Clathrin-vermittelter Endozytose

Clathrin ist ein Mantelprotein, welches als essentieller Bestandteil der CME die Aufnahme vieler Substanzen in die Zelle vermittelt (91, 171). Da LRP1 nach Bindung von A β über CME

internalisiert wird (74, 76, 77) und auch für P-gp die CME als Transportmechanismus in das Zellinnere beschrieben wurde (140), wurde Clathrin als Indikator genutzt, um zu verifizieren, dass von der Zelloberfläche internalisiertes LRP1 und P-gp intrazellulär co-lokalisieren. In Übereinstimmung mit weiteren Studiendaten konnten die Ergebnisse der Clathrin-Immunpräzipitation (Abbildung 7B) zeigen, dass sowohl P-gp als auch LRP1 mit Clathrin assoziiert sind (74, 76, 77, 140). Um jedoch zu klären, ob P-gp im Rahmen des A β -Transports durch Clathrin in *Sorting*-Endosomen gelangt, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Während die Rolle von Clathrin in der Endozytose von zellmembranständigen Substanzen bereits ausführlich beschrieben wurde (91, 171), konnten neuere Studien die Rolle von Clathrin in der Abschnürung von Vesikeln als *clathrin coated vesicles* (dt. Clathrin ummantelte Vesikel) aus anderen Organellen, wie dem Mitochondrium, zeigen (172). Bis heute ist jedoch noch unklar welchen Gesamtanteil die intrazelluläre Vesikelformation im Vergleich zur CME an der Zelloberfläche einnimmt. Nichtsdestotrotz könnte dies für unsere Beobachtungen bedeuten, dass zumindest ein kleiner Anteil von P-gp und LRP1 mit Clathrin co-lokalisiert, welcher nicht von der Zellmembran stammt.

Es ist beschrieben, dass nach Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes und Maturation des Endozytosevesikels Clathrin mithilfe anderer Proteine von der Vesikelmembran gelöst wird (173). Interessanterweise konnte nach der initialen Ablösung des Clathrinmantels eine dynamische Balance aus Clathrin-Polymerisation und -Depolarisation an der Vesikeloberfläche beobachtet werden, was darauf hinweist, dass der Clathrinmantel während der Vesikelformation weiterhin zumindest teilweise bestehen bleibt (91). Die vorgestellten Ergebnisse zeigen erstmalig eine Assoziation der schweren Kette von Clathrin mit Rab 11 und sprechen für eine Clathrinbindung entlang des Endozytosepfades bis hin zum Rab 11-positiven *Sorting*-Endosom oder für die Assemblierung eines Clathrinmantels am *Sorting*-Endosom zur Abschnürung eines Membranabschnittes als *clathrin coated vesicle* (91).

5.4 PICALM - Mediator der P-gp/LRP1-Interaktion im endothelialen A β -Transport

Ein weiterer wichtiger Regulator des A β -Effluxes über die BHS ist das zytosolische Protein PICALM. Bereits zuvor wurde gezeigt, dass PICALM eine zentrale Rolle in der endothelialen A β -Transzytose der BHS übernimmt: PICALM-Mangel führte bei Mäusen zu einem verminderten A β -Abtransport aus dem Gehirn über die BHS und beschleunigte die A β -Akkumulation bzw. -Pathologie in einer Weise, die durch eine endotheliale PICALM-Reexpression wiederhergestellt werden konnte (74). Darüber hinaus zeigte dieselbe Arbeitsgruppe unter Verwendung von primären menschlichen Hirnendothelzellen, dass die

PICALM/Clathrin-vermittelte Internalisierung von LRP1-gebundenem A β sowie der intrazelluläre Weitertransport von A β in Rab 11-positive Endosomen durch PICALM reguliert wird. Während die Rolle von PICALM im LRP1-Transport durch die Endothelzelle bereits ausführlich beschrieben wurde (74), zeigen unsere Ergebnisse (Abbildung 8) erstmalig, dass PICALM ebenfalls mit P-gp co-lokalisiert vorliegt. Die Ergebnisse dieser Immunpräzipitationsversuche stehen im Einklang mit unseren vorherigen Daten (Abbildung 6B) und der Literatur (74), dass PICALM P-gp nach der Internalisierung zum Weitertransport in Rab 11-positive *Sorting*-Endosomen, und nicht zum Abbau in Rab 7-positive späte Endosomen leitet.

So wie P-gp und LRP1, wird PICALM stark in Hirngefäßendothel exprimiert (74), was darauf hindeutet, dass PICALM eine zentrale Rolle im Protein-Transport durch Endothelzellen spielt. PICALM könnte hierbei als intrazelluläres Bindeglied zwischen beiden Proteinen fungieren und in seiner Funktion als Endozytose-Regulator LRP1 und P-gp zum gemeinsamen Interaktionsort dirigieren.

Unsere Ergebnisse weisen auf eine direkte Interaktion von P-gp und LRP1 mit PICALM als Vermittler hin. Da bereits bekannt ist, dass A β ein Substrat beider Proteine ist (13, 75, 111–113, 127), wollten wir die funktionelle Beziehung von P-gp und LRP1 im Hinblick auf den Transport von A β durch Endothelzellen untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Immunpräzipitationen von PICALM unter pathophysiologischer A β -Exposition durchgeführt (Abbildung 9A). Als Kontrolle dienten sowohl Immunpräzipitationen von PICALM ohne vorherige A β -Stimulation als auch native und A β -stimulierte bEnd.3-Zelllysate.

In APP-überexprimierenden Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte A β -Konzentration die PICALM-Expression weder steigert noch vermindert (74). Wenn wir annehmen, dass die PICALM-Expression nicht von der A β -Applikation beeinflusst wird, erlaubt uns dies die Normalisierung der co-präzipitierten Proteinmengen auf PICALM und somit eine quantitative Auswertung.

Die vermehrte Verfügbarkeit von A β führt zu einer vermehrten Co-Lokalisation von PICALM mit P-gp um etwa 80 %, mit LRP1 um etwa 20 % und mit Rab 11 um etwa 50 % (Abbildung 9B). Eine Assoziation von PICALM mit Rab 7 konnte weder in der nativen Immunpräzipitation noch nach A β -Stimulation festgestellt werden, sodass davon auszugehen ist, dass die pathophysiologische Konzentration von A β nicht zu einem verstärkten PICALM-Abbau führt.

Basierend auf unseren Ergebnissen mutmaßen wir, dass das erhöhte A β -Angebot zu einer gesteigerten Bindung von A β an LRP1 führt. Die häufiger stattfindende PICALM-vermittelte Endozytose resultiert in einem vermehrten intrazellulären Weitertransport des A β -LRP1-Komplexes in Rab 11-positive Endosomen. Gleichzeitig kommt es über eine zunehmende Assoziation von PICALM mit P-gp zu einer gesteigerten Distribution von P-gp in *Sorting*-Endosomen, wo anschließend die Übergabe des Liganden A β von LRP1 an P-gp vermittelt wird. P-gp vollführt seinerseits im Anschluss die Exozytose von A β auf der luminalen Seite der Endothelzelle (Abbildung 11).

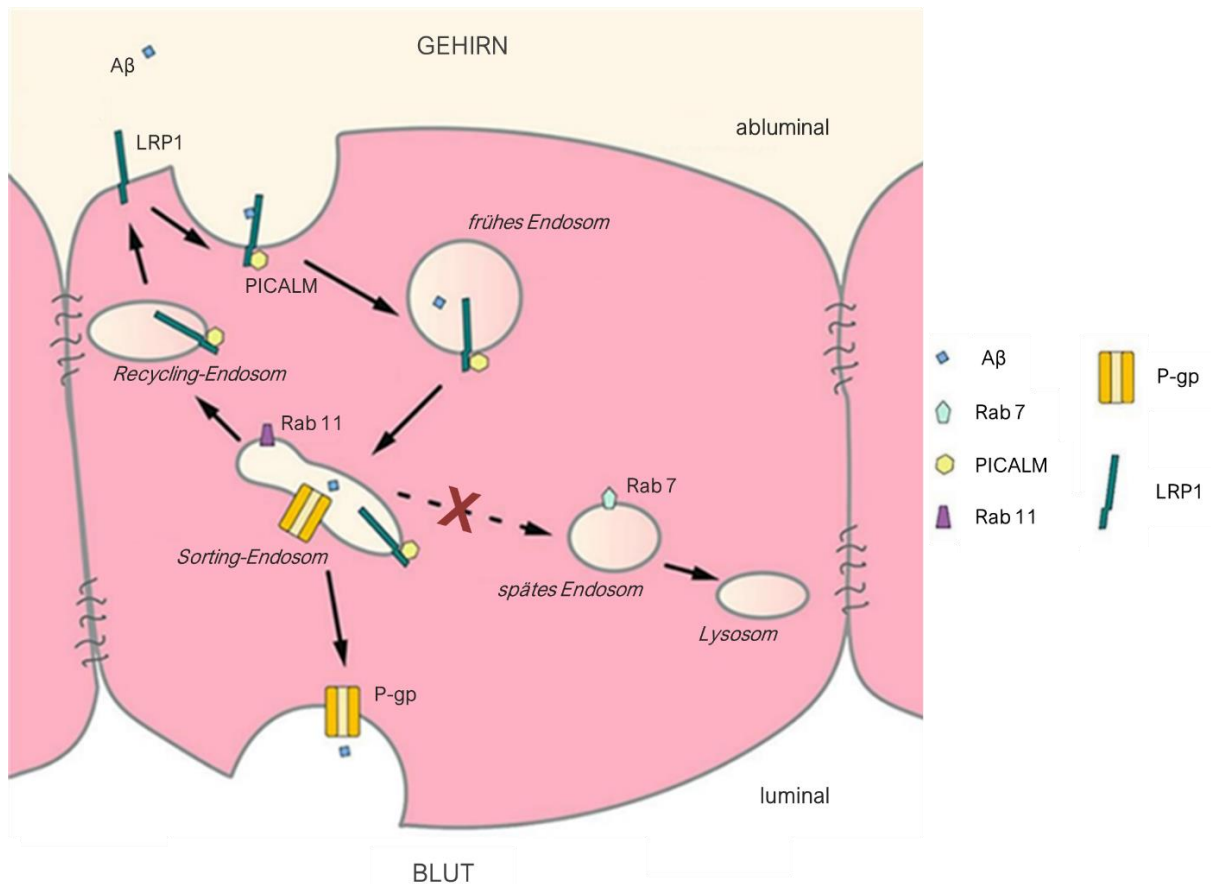


Abbildung 11: Schematisches Modell der potentiellen Transzytose von A β durch die Endothelzellschicht der BHS. Das Zusammenspiel des abluminalen Partners LRP1 und des luminalen Gegenübers P-gp im transendothelialen Transport von A β wird von PICALM geleitet. Nach der Bindung von A β an LRP1, dirigiert PICALM den Rezeptor-Liganden-Komplex in das Rab 11-positive *Sorting*-Endosom. Der gleichzeitig im Vesikel vorliegende Transporter P-gp vermittelt anschließend die luminalen Abgabe von A β in das vaskuläre System. Abbildung modifiziert nach: (61).

Spekuliert werden könnte auch, dass das erhöhte A β -Angebot lediglich die PICALM-vermittelte Endozytoserate der Proteine, unabhängig vom spezifischen A β -Transport, beeinflusst. Andere Studien zeigten jedoch bereits, dass eine Exposition von A β zu einer

Zunahme des PICALM-vermittelten A β -Transports durch LRP1 führt und nicht nur die Endozytoserate der Zellen erhöht (74).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen haben wir *in vitro* Transportversuche mit radioaktiv-markiertem A β in pathophysiologischen Konzentrationen durch primäre Endothelzellen von LRP1^{-/-}- und Kontrollmäusen durchgeführt, um das funktionelle Zusammenspiel von P-gp und LRP1 im A β -Transport zu verifizieren. Für die hierbei verwendeten permeablen Trägersysteme (Transwell®) konnte bei Kultivierung von bEnd.3-Zellen eine klare Polarisierung der Zellen in einen basolateralen und einen apikalen Zellmembrananteil sowie eine spezifische Zuordnung von P-gp und LRP1 zu der jeweiligen Seite und somit eine gerichtete A β -Transzytose von basolateral nach apikal gezeigt werden (164). In diesem Versuchsaufbau konnte eine Reduktion des A β -Transports im Vergleich zu wildtypischen Endothelzellen gezeigt werden. Darüber hinaus führte die Inhibition von P-gp durch PSC833, einem P-gp-spezifischen Inhibitor, zu einem reduzierten A β -Transport in den Kontrollen, jedoch zu keiner zusätzlichen Verminderung des A β -Transports in LRP1^{-/-}-Endothelzellen. Die Inhibition von P-gp mit Ciclosporin A, einem P-gp-Substrat und -Inhibitor zeigte vergleichbare Resultate (63). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass LRP1 den von abluminal nach luminal gerichteten transendothelialen A β -Transport im Zusammenspiel mit P-gp vermittelt.

Weitere Studien geben zu bedenken, dass eine A β -Exposition von Ratten-Hirnkapillaren jedoch zur Ubiquitinierung, Internalisierung und konsekutiv zum Abbau von P-gp durch das Proteasom führen kann (143). Darüber hinaus existiert eine Vielzahl von Studien zum P-gp-vermittelten A β -Transport, welche unterschiedlichste Ergebnissen erbracht haben (174). In Anbetracht dessen, dass diese Studien mit uneinheitlichen Rahmenbedingungen, wie verschiedenen Zelllinien und Tiermodellen durchgeführt wurden, wäre es sinnvoll die Rolle von P-gp im A β -Transport mithilfe einheitlicherer Modelle genauer zu untersuchen.

Um den exakten Mechanismus der endothelialen A β -Transzytose durch P-gp und LRP1 zu verstehen – insbesondere den Schritt der Übergabe von A β zwischen LRP1 und P-gp – sowie zur Klärung der Frage wie genau P-gp dazu in der Lage ist A β zu binden, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Neben der beschriebenen Transzytose von A β durch das LRP1-P-gp-System, existieren weitere transendotheliale A β -Clearance-Mechanismen. So wurde beispielsweise gezeigt, dass an Apolipoprotein J (APO J) gebundenes A β durch den abluminalen Rezeptor *Low density lipoprotein receptor-related protein 2* (LRP2) – ein weiteres Mitglied der LDLR-Familie – abtransportiert wird (175). Neben P-gp tragen auch andere ABC-Transporter nachweislich zum A β -Efflux aus dem Gehirn bei (176, 177). Ob LRP2 im Rahmen der endothelialen A β -Clearance ebenfalls einen Partner, wie beispielsweise einen ABC-Transporter, auf der luminalen Seite nach dem Vorbild der LRP1-P-gp-Interaktion benötigt, bleibt noch zu

untersuchen. In zukünftigen Studien wäre es interessant zu untersuchen, ob diese Membrantransporter in Endothelzellen ebenfalls einen Interaktionspartner auf der gegensätzlichen Zellmembranseite oder sogar einen gemeinsamen funktionellen Mediator wie PICALM besitzen.

5.5 Immunzytochemie bestätigt die intrazelluläre Co-Lokalisation von P-gp und LRP1 in primären zerebralen Kapillaren der Maus

Mit den immunfluoreszierenden Färbungen konnte die flächendeckende und gleichmäßig verteilte Expression von P-gp und LRP1 in bEnd.3-Zellen visualisiert werden (Abbildung 10B + D). Bei der zur Verfügung stehenden Auflösung konnte hierbei nicht zwischen abluminaler und luminaler Membranseite unterschieden werden.

Im Rahmen der immunzytochemischen Versuche wurde, abweichend von zuvor durchgeführten Experimenten, der B411E2-LRP1-Antikörper aus der Spezies Maus anstelle des 1704-LRP1-Antikörpers aus der Spezies Kaninchen verwendet. Da die dargestellten Einzelfärbungen der Methodenetablierung für folgende Co-Färbungen dienten und die Durchführung von Co-Färbungen die Verwendung von Primärantikörpern aus verschiedenen Spezies erfordert, wurde der B411E2-Antikörper als Alternative etabliert. Der B411E2-Antikörper richtet sich, im Gegensatz zum 1704-Antikörper, gegen die extrazelluläre bzw. intravesikuläre α -Kette von LRP1.

Um die subzelluläre Lokalisation der P-gp-LRP1-Interaktion einzugrenzen und zu verifizieren, dass es sich um eine funktionelle Interaktion beider Proteine im Kontext der endothelialen Transzytose von A β handelt, hat die Arbeitsgruppe aufbauend auf den Einzelfärbungen, immunzytochemische Co-Färbungen nach A β Stimulation durchgeführt. Die Resultate zeigen eine starke Expression von P-gp sowie LRP1 an der Zelloberfläche, sowie eine intrazelluläre Co-Lokalisation in der Nähe des Zellkerns. Bei der Detektion von PICALM wird ein punktuelleres Signal deutlich, welches auf das vordringliche Vorhandensein in Endozytosevesikeln hinweisen könnte. Zusammen mit P-gp lässt sich eine Co-Lokalisation der beiden Proteine in diesen vesikulären Strukturen nachweisen. Signale von Rab 11 konnten in Strukturen, die wie kleine Vesikel imponieren dargestellt werden. Die Überlagerung der Signale von P-gp und Rab 11 zeigt eine Co-Lokalisation in perinukleären Bereichen der Zelle (63). Diese Ergebnisse bestätigen somit, dass eine intrazelluläre Co-Lokalisation von P-gp und LRP1 sowie von P-gp mit weiteren am A β -Transport beteiligten Proteinen wie PICALM und Rab 11 infolge einer Exposition der Zellen mit A β stattfindet.

6 Zusammenfassung

Die Akkumulation des neurotoxischen A β ist ein Hauptcharakteristikum der Demenzerkrankung Morbus Alzheimer. Die BHS hat sich als einer der wichtigsten Abtransportwege von A β aus dem Gehirn erwiesen. Sowohl der luminal exprimierte ABC-Transporter P-gp als auch der abluminale Rezeptor LRP1 nehmen eine entscheidende Rolle im A β -Efflux aus dem Gehirn ein.

In dieser Arbeit wurde mittels Transfektions- und Immupräzipitationsexperimenten sowie immunzytochemischen Färbungen die Beziehung zwischen P-gp und LRP1 auf verschiedenen Ebenen untersucht.

Mithilfe transienter Transfektionen konnte gezeigt werden, dass eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Expressionslevel von P-gp und der Proteinmenge von LRP1 besteht. Demnach erhöht sich die Proteinmenge beider Proteine durch eine Steigerung der P-gp-Expression.

Weiterhin wurde die strukturelle Beziehung der beiden Proteine in Endothelzellen untersucht. Anhand von Immunpräzipitationsversuchen ließ sich erstmalig zeigen, dass P-gp und LRP1 nicht nur in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander vorliegen, sondern auch eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung miteinander eingehen können. Zudem wurde eine Co-Lokalisation der beiden Proteine mit Rab 11 festgestellt, was die Vermutung zulässt, dass P-gp und LRP1 gemeinsam in Rab 11-positiven *Sorting*-Endosomen vorliegen und eine Interaktion in diesem Vesikel stattfinden könnte. Zusätzlich konnten P-gp, LRP1 und Rab 11 mit Clathrin co-präzipitiert werden, was darauf hindeutet, dass LRP1 und P-gp Zelloberfläche mittels CME internalisiert und entlang des endosomalen Systems in *Sorting*-Endosomen geleitet werden.

Die funktionelle Zusammenarbeit der beiden A β -transportierenden Proteine in Endothelzellen wurde ebenfalls mittels Immunpräzipitationen evaluiert. Die Experimente ergaben eine Assoziation von PICALM mit P-gp, LRP1 und Rab 11, welche sich durch eine Exposition der Zellen mit pathophysiologischen Konzentrationen A β verstärken ließ. Daraus wurde geschlussfolgert, dass eine Erhöhung der A β -Konzentration den transendothelialen Abtransportmechanismus stimuliert, wodurch die hierbei involvierten Proteine vermehrt colokalisieren und interagieren. Daran angeschlossene *in vitro* Transzytosestudien bestätigten die gemeinsame Vermittlung des A β -Transports durch P-gp und LRP1.

Immunzytochemische Färbungen bestätigten die flächendeckende Expression von P-gp und LRP1 in Endothelzellen und bildeten die methodische Grundlage für folgende Co-Färbungen, bei denen der vermutete transendotheliale Transportmechanismus von A β , beginnend bei LRP1 über Rab 11-positive *Sorting*-Endosomen zu P-gp unter Vermittlung von PICALM, visualisiert werden konnte.

Die Resultate dieser Arbeit – bestätigt durch Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe – deuten darauf hin, dass die Transzytose von A β durch die Endothelzellen der BHS ein zweischrittiger Prozess ist, der mit der LRP1-vermittelten Aufnahme von A β an der abluminalen Oberfläche der Zelle beginnt. Der zweite Schritt umfasst den aktiven Transfer zur luminalen Seite der Endothelzelle und die Abgabe von A β in das vaskuläre System durch P-gp. Die Interaktion von P-gp und LRP1 sowie der Transfer von A β zwischen beiden Proteinen könnte in Rab 11-positiven *Sorting*-Endosomen stattfinden, während PICALM hierbei den intrazellulären Transport sowie die funktionelle Zusammenarbeit von P-gp und LRP1 zu koordinieren scheint.

Obwohl die dargestellten Resultate einen weiteren Schritt im Mechanismus des zerebralen A β -Effluxes über das Endothel der BHS erläutert haben könnte, bleibt die vollständige Aufklärung der A β -Clearance und somit das Verständnis der pathophysiologischen Grundlagen der Alzheimer-Erkrankung weiterhin eine große wissenschaftliche Herausforderung.

Abschließend ist zu sagen, dass die Alzheimer-Demenz eine schwere neurodegenerative Erkrankung ist, unter der eine zunehmende Zahl von Menschen weltweit leidet. Nach jahrzehntelanger Forschung sind noch etliche Fragen unbeantwortet, die Ätiologie und die zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesse noch nicht ausreichend geklärt, und auch eine kausale Therapie ist noch nicht gelassen worden. Wie diese Arbeit jedoch gezeigt hat, spielt jedes der drei Proteine P-gp, LRP1 und PICALM seine eigene entscheidende Rolle in der Pathologie der Alzheimer-Erkrankung. Eine vollständigere Erforschung der Interaktion der drei Proteine in der A β -Transzytose, sowie die Identifikation der Faktoren, die diese Maschinerie regulieren, könnten einen wichtigen Beitrag zu unserem Verständnis von Morbus Alzheimer leisten. Darüber hinaus sollte die Entwicklung zukünftiger therapeutischer Strategien, die auf die Elimination von übermäßigem zerebralem A β abzielen, das funktionelle Zusammenspiel der verschiedenen Transzytose-Komponenten sowie die Verknüpfung der P-gp- und LRP1-Expression für die Therapie oder Prävention der Pathologie von Morbus Alzheimer berücksichtigen.

7 Literatur

1. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 2016; 12(4):459–509. doi: 10.1016/j.jalz.2016.03.001.
2. Alzheimer's Disease International, McGill University. *World Alzheimer Report 2021: Journey through the diagnosis of dementia*; 2021. Verfügbar unter: <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2021/>.
3. Zhu X-C, Tan L, Wang H-F, Jiang T, Cao L, Wang C et al. Rate of early onset Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Translational Medicine* 2015; 3(3):38. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4356853/>.
4. Qiu C, Kivipelto M, Strauss E von. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci* 2009; 11(2):111–28.
5. Barker WW, Luis CA, Kashuba A, Luis M, Harwood DG, Loewenstein D et al. Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2002; 16(4):203–12. doi: 10.1097/00002093-200210000-00001.
6. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 2020. doi: 10.1002/alz.12068.
7. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2007; 3(3):186–91. doi: 10.1016/j.jalz.2007.04.381.
8. National Institute on Aging. *What Causes Alzheimer's Disease?*; 2021 [Stand: 02.01.2022]. Verfügbar unter: <https://www.nia.nih.gov/health/what-causes-alzheimers-disease>.
9. Hardy J. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal. *J Alzheimers Dis* 2006; 9(3 Suppl):151–3. doi: 10.3233/jad-2006-9s317.
10. Aleksis R, Oleskovs F, Jaudzems K, Pahnke J, Biverstål H. Structural studies of amyloid- β peptides: Unlocking the mechanism of aggregation and the associated toxicity. *Biochimie* 2017; 140:176–92. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908417301827>.
11. Wilkins HM, Swerdlow RH. Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Res Bull* 2017; 133:71–9. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.08.009.

12. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL et al. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 1992; 359(6393):322–5. doi: 10.1038/359322a0.
13. Cirrito JR, Deane R, Fagan AM, Spinner ML, Parsadanian M, Finn MB et al. P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 2005; 115(11):3285–90. doi: 10.1172/JCI25247.
14. Zhao J, O'Connor T, Vassar R. The contribution of activated astrocytes to A β production: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation* 2011; 8:150. doi: 10.1186/1742-2094-8-150.
15. Kitazume S, Tachida Y, Kato M, Yamaguchi Y, Honda T, Hashimoto Y et al. Brain endothelial cells produce amyloid {beta} from amyloid precursor protein 770 and preferentially secrete the O-glycosylated form. *J Biol Chem* 2010; 285(51):40097–103. doi: 10.1074/jbc.M110.144626.
16. Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I. Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 2009; 12(12):1567–76. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/nn.2433>.
17. Finnie PSB, Nader K. Amyloid Beta Secreted during Consolidation Prevents Memory Malleability. *Curr Biol* 2020. doi: 10.1016/j.cub.2020.02.083.
18. Puzzo D, Arancio O. Amyloid- β peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *J Alzheimers Dis* 2013; 33 Suppl 1(0 1):S111-20. doi: 10.3233/JAD-2012-129033.
19. Giuffrida ML, Caraci F, Pignataro B, Cataldo S, Bona P de, Bruno V et al. Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J. Neurosci.* 2009; 29(34):10582–7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1736-09.2009.
20. Copani A. The underexplored question of β -amyloid monomers. *Eur J Pharmacol* 2017; 817:71–5. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.05.057.
21. Bate C, Williams A. Monomeric amyloid- β reduced amyloid- β oligomer-induced synapse damage in neuronal cultures. *Neurobiol Dis* 2018; 111:48–58. doi: 10.1016/j.nbd.2017.12.007.
22. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 2016; 8(6):595–608. doi: 10.15252/emmm.201606210.

23. Nag S, Sarkar B, Bandyopadhyay A, Sahoo B, Sreenivasan VKA, Kombrabail M et al. Nature of the amyloid-beta monomer and the monomer-oligomer equilibrium. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(16):13827–33. doi: 10.1074/jbc.M110.199885.
24. Chen G-F, Xu T-H, Yan Y, Zhou Y-R, Jiang Y, Melcher K et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin* 2017; 38(9):1205–35. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/aps201728>.
25. Schnabel J. Amyloid: little proteins, big clues. *Nature* 2011; 475(7355):S12-4. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/475S12a>.
26. Mucke L, Selkoe DJ. Neurotoxicity of amyloid β -protein: synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(7):a006338. doi: 10.1101/cshperspect.a006338.
27. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS et al. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002; 416(6880):535–9. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/416535a>.
28. Ferreira ST, Lourenco MV, Oliveira MM, Felice FG de. Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci* 2015; 9:191. doi: 10.3389/fncel.2015.00191.
29. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 2008; 14(8):837–42. doi: 10.1038/nm1782.
30. Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC et al. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 2010; 330(6012):1774. doi: 10.1126/science.1197623.
31. Guénette SY. Astrocytes: a cellular player in A β clearance and degradation. *Trends in Molecular Medicine* 2003; 9(7):279–80. doi: 10.1016/S1471-4914(03)00112-6.
32. Wilcock DM, Munireddy SK, Rosenthal A, Ugen KE, Gordon MN, Morgan D. Microglial activation facilitates Abeta plaque removal following intracranial anti-Abeta antibody administration. *Neurobiol Dis* 2004; 15(1):11–20. doi: 10.1016/j.nbd.2003.09.015.
33. Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E et al. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2015; 11(8):457–70. doi: 10.1038/nrneurol.2015.119.
34. Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X et al. Enhanced Proteolysis of β -Amyloid in APP Transgenic Mice Prevents Plaque Formation, Secondary Pathology,

- and Premature Death. *Neuron* 2003; 40(6):1087–93. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00787-6.
35. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP et al. Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 2001; 292(5521):1550–2. doi: 10.1126/science.1059946.
36. Weller RO, Subash M, Preston SD, Mazanti I, Carare RO. Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2008; 18(2):253–66. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1750-3639.2008.00133.x>.
37. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med* 2012; 4(147):147ra111. doi: 10.1126/scitranslmed.3003748.
38. Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B et al. Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 2000; 106(12):1489–99. doi: 10.1172/JCI10498.
39. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 2010; 37(1):13–25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.
40. Ghiso J, Shayo M, Calero M, Ng D, Tomidokoro Y, Gandy S et al. Systemic catabolism of Alzheimer's Abeta40 and Abeta42. *J Biol Chem* 2004; 279(44):45897–908. doi: 10.1074/jbc.M407668200.
41. Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci* 2011; 12(12):723–38. doi: 10.1038/nrn3114.
42. Risau W, Wolburg H. Development of the blood-brain barrier. *Trends in Neurosciences* 1990; 13(5):174–8. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016622369090043A>.
43. Spray DC, Nedergaard M, Dermietzel R. Blood-brain barriers: From ontogeny to artificial interfaces. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2006. Verfügbar unter: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9783527611225>.
44. Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood–brain barrier. *Vascular Pharmacology* 2002; 38(6):323–37. doi: 10.1016/S1537-1891(02)00200-8.
45. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 2008; 57(2):178–201. Verfügbar unter:

- [https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273\(08\)00034-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627308000342%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273(08)00034-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627308000342%3Fshowall%3Dtrue).
46. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 2004; 16(1):1–13. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996103002833>.
 47. Muoio V, Persson PB, Sendeski MM. The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiologica* 2014; 210(4):790–8. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/apha.12250>.
 48. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7(1):41–53. doi: 10.1038/nrn1824.
 49. Anderson CM, Nedergaard M. Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation. *Trends in Neurosciences* 2003; 26(7):340–4. doi: 10.1016/S0166-2236(03)00141-3.
 50. Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 1998; 23(1):1–10.
 51. Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 2002; 200(6):629–38. doi: 10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x.
 52. Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* 2010; 58(9):1094–103. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/glia.20990>.
 53. Thrane AS, Rangroo Thrane V, Nedergaard M. Drowning stars: reassessing the role of astrocytes in brain edema. *Trends in Neurosciences* 2014; 37(11):620–8. doi: 10.1016/j.tins.2014.08.010.
 54. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Developmental Cell* 2011; 21(2):193–215. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580711002693>.
 55. Hamilton NB, Attwell D, Hall CN. Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front. Neuroenergetics* 2010; 2:5. doi: 10.3389/fnene.2010.00005.
 56. Abbott NJ. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem Int* 2004; 45(4):545–52. doi: 10.1016/j.neuint.2003.11.006.

57. Hartwig Wolburg. The Endothelial Frontier. In: Blood-Brain Barriers: John Wiley & Sons, Ltd; 2007. S. 75–107 Verfügbar unter:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527611225.ch4>.
58. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 2005; 57(2):173–85. Verfügbar unter:
<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/57/2/173.long>.
59. Thuenauer R, Müller SK, Römer W. Pathways of protein and lipid receptor-mediated transcytosis in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2017; 14(3):341–51. doi: 10.1080/17425247.2016.1220364.
60. Pardridge WM. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol Interv* 2003; 3(2):90-105, 51. doi: 10.1124/mi.3.2.90.
61. Dermietzel R, Spray DC, Nedergaard M, Hrsg. Blood-Brain Barriers. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006.
62. Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K et al. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron* 2004; 43(3):333–44. doi: 10.1016/j.neuron.2004.07.017.
63. Storck SE, Hartz AMS, Bernard J, Wolf A, Kachlmeier A, Mahringer A et al. The concerted amyloid-beta clearance of LRP1 and ABCB1/P-gp across the blood-brain barrier is linked by PICALM. *Brain Behav Immun* 2018; 73:21–33. doi: 10.1016/j.bbi.2018.07.017.
64. Qosa H, Abuznait AH, Hill RA, Kaddoumi A. Enhanced brain amyloid- β clearance by rifampicin and caffeine as a possible protective mechanism against Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2012; 31(1):151–65. doi: 10.3233/JAD-2012-120319.
65. Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* 2001; 108(6):779–84. doi: 10.1172/JCI13992.
66. Willnow TE, Nykjaer A, Herz J. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol* 1999; 1(6):E157-62. Verfügbar unter:
https://www.nature.com/articles/ncb1099_E157.
67. Go G, Mani A. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J Biol Med* 2012; 85(1):19–28.
68. Herz J, Kowal RC, Goldstein JL, Brown MS. Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *EMBO J* 1990; 9(6):1769–76.

69. Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 1994; 63:601–37. doi: 10.1146/annurev.bi.63.070194.003125.
70. Obermoeller-McCormick LM, Li Y, Osaka H, FitzGerald DJ, Schwartz AL, Bu G. Dissection of receptor folding and ligand-binding property with functional minireceptors of LDL receptor-related protein. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 5):899–908. Verfügbar unter: <https://jcs.biologists.org/content/114/5/899.long>.
71. Lillis AP, van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev* 2008; 88(3):887–918. doi: 10.1152/physrev.00033.2007.
72. Jaeger S, Pietrzik CU. Functional role of lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2008; 5(1):15–25. doi: 10.2174/156720508783884675.
73. Zlokovic BV, Deane R, Sagare AP, Bell RD, Winkler EA. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid β -peptide elimination from the brain. *J Neurochem* 2010; 115(5):1077–89. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07002.x.
74. Zhao Z, Sagare AP, Ma Q, Halliday MR, Kong P, Kisler K et al. Central role for PICALM in amyloid- β blood-brain barrier transcytosis and clearance. *Nat Neurosci* 2015; 18(7):978–87. doi: 10.1038/nn.4025.
75. Storck SE, Meister S, Nahrath J, Meißner JN, Schubert N, Di Spiezio A et al. Endothelial LRP1 transports amyloid- β (1-42) across the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 2016; 126(1):123–36. doi: 10.1172/JCI81108.
76. Fuentealba RA, Liu Q, Zhang J, Kanekiyo T, Hu X, Lee J-M et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates neuronal Abeta42 uptake and lysosomal trafficking. *PLoS One* 2010; 5(7):e11884. doi: 10.1371/journal.pone.0011884.
77. Kanekiyo T, Bu G. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid- β clearance in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 2014; 6:93. doi: 10.3389/fnagi.2014.00093.
78. Mayor S, Parton RG, Donaldson JG. Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 6(6). doi: 10.1101/cshperspect.a016758.
79. Bitsikas V, Corrêa IR, Nichols BJ. Clathrin-independent pathways do not contribute significantly to endocytic flux. *Elife* 2014; 3:e03970. doi: 10.7554/eLife.03970.
80. Ford MG, Pearse BM, Higgins MK, Vallis Y, Owen DJ, Gibson A et al. Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on

- membranes. *Science* 2001; 291(5506):1051–5. Verfügbar unter: <https://science.sciencemag.org/content/291/5506/1051.long>.
81. Dreyling MH, Martinez-Climent JA, Zheng M, Mao J, Rowley JD, Bohlander SK. The t(10;11)(p13;q14) in the U937 cell line results in the fusion of the AF10 gene and CALM, encoding a new member of the AP-3 clathrin assembly protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(10):4804–9. doi: 10.1073/pnas.93.10.4804.
82. Xu W, Tan L, Yu J-T. The Role of PICALM in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 2015; 52(1):399–413. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-014-8878-3>.
83. Xiao Q, Gil S-C, Yan P, Wang Y, Han S, Gonzales E et al. Role of phosphatidylinositol clathrin assembly lymphoid-myeloid leukemia (PICALM) in intracellular amyloid precursor protein (APP) processing and amyloid plaque pathogenesis. *J Biol Chem* 2012; 287(25):21279–89. doi: 10.1074/jbc.M111.338376.
84. Baig S, Joseph SA, Tayler H, Abraham R, Owen MJ, Williams J et al. Distribution and expression of picalm in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010; 69(10):1071–7. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181f52e01.
85. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 2009; 41(10):1088–93. doi: 10.1038/ng.440.
86. Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet* 2013; 45(12):1452–8. doi: 10.1038/ng.2802.
87. Lambert J-C, Zelenika D, Hiltunen M, Chouraki V, Combarros O, Bullido MJ et al. Evidence of the association of BIN1 and PICALM with the AD risk in contrasting European populations. *Neurobiol Aging* 2011; 32(4):756.e11-5. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197458010005154>.
88. Tebar F, Bohlander SK, Sorkin A. Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Mol Biol Cell* 1999; 10(8):2687–702. doi: 10.1091/mbc.10.8.2687.
89. Wu F, Yao PJ. Clathrin-mediated endocytosis and Alzheimer's disease: an update. *Ageing Research Reviews* 2009; 8(3):147–9. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156816370900018X>.

90. Miller SE, Mathiasen S, Bright NA, Pierre F, Kelly BT, Kladt N et al. CALM regulates clathrin-coated vesicle size and maturation by directly sensing and driving membrane curvature. *Developmental Cell* 2015; 33(2):163–75. doi: 10.1016/j.devcel.2015.03.002.
91. Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19(5):313–26. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/nrm.2017.132>.
92. Ando K, Brion J-P, Stygelbout V, Suain V, Authelet M, Dedecker R et al. Clathrin adaptor CALM/PICALM is associated with neurofibrillary tangles and is cleaved in Alzheimer's brains. *Acta Neuropathol* 2013; 125(6):861–78. doi: 10.1007/s00401-013-1111-z.
93. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(8):513–25. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/nrm2728#ref-CR3>.
94. Chavrier P, Parton RG, Hauri HP, Simons K, Zerial M. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 1990; 62(2):317–29. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009286749090369P>.
95. Rubino M, Miaczynska M, Lippé R, Zerial M. Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *J Biol Chem* 2000; 275(6):3745–8. doi: 10.1074/jbc.275.6.3745.
96. Galvez T, Gilleron J, Zerial M, O'Sullivan GA. SnapShot: Mammalian Rab proteins in endocytic trafficking. *Cell* 2012; 151(1):234-234.e2. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.013.
97. Bhui T, Roy JK. Rab proteins: the key regulators of intracellular vesicle transport. *Experimental Cell Research* 2014; 328(1):1–19. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482714003188>.
98. Schwartz SL, Cao C, Pylypenko O, Rak A, Wandinger-Ness A. Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 22):3905–10. Verfügbar unter: <https://jcs.biologists.org/content/120/22/3905.long>.
99. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 5):843–6. Verfügbar unter: https://jcs.biologists.org/content/118/5/843?ijkey=64eafaa635fcef3985c04b097e0801fad72f6d6&keytype2=tf_ipsecsha.
100. Wandinger-Ness A, Zerial M. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 6(11):a022616. doi: 10.1101/cshperspect.a022616.
101. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(2):107–17. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/35052055>.

102. Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; 12:575–625. doi: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.575.
103. Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J* 2011; 30(17):3481–500. doi: 10.1038/emboj.2011.286.
104. Feng Y, Press B, Wandinger-Ness A. Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* 1995; 131(6 Pt 1):1435–52. doi: 10.1083/jcb.131.6.1435.
105. Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 2005; 122(5):735–49. Verfügbar unter: [https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674\(05\)00697-5](https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674(05)00697-5).
106. Scott CC, Vacca F, Gruenberg J. Endosome maturation, transport and functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2014; 31:2–10. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952114000706>.
107. Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(8):622–32. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/nrm2217>.
108. Xu H, Ren D. Lysosomal physiology. *Annu Rev Physiol* 2015; 77:57–80. doi: 10.1146/annurev-physiol-021014-071649.
109. Xu S, Edman M, Kothawala MS, Sun G, Chiang L, Mircheff A et al. A Rab11a-enriched subapical membrane compartment regulates a cytoskeleton-dependent transcytotic pathway in secretory epithelial cells of the lacrimal gland. *J Cell Sci* 2011; 124(Pt 20):3503–14. doi: 10.1242/jcs.088906.
110. Takahashi S, Kubo K, Waguri S, Yabashi A, Shin H-W, Katoh Y et al. Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 17):4049–57. doi: 10.1242/jcs.102913.
111. Lam FC, Liu R, Lu P, Shapiro AB, Renoir JM, Sharom FJ et al. beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J Neurochem* 2001; 76(4):1121–8. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00113.x.
112. Kuhnke D, Jedlitschky G, Grube M, Krohn M, Jucker M, Mosyagin I et al. MDR1-P-Glycoprotein (ABCB1) Mediates Transport of Alzheimer's amyloid-beta peptides--implications for the mechanisms of Abeta clearance at the blood-brain barrier. *Brain Pathol* 2007; 17(4):347–53. doi: 10.1111/j.1750-3639.2007.00075.x.
113. Liu Y, Liu H, Yang J, Liu X, Lu S, Wen T et al. Increased amyloid beta-peptide (1-40) level in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuroscience* 2008; 153(3):796–802. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030645220800393X>.

114. Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8:67–113. doi: 10.1146/annurev.cb.08.110192.000435.
115. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1976; 455(1):152–62. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0005273676901607>.
116. DeGorter MK, Xia CQ, Yang JJ, Kim RB. Drug transporters in drug efficacy and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012; 52:249–73. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134529.
117. Ueda K, Cornwell MM, Gottesman MM, Pastan I, Roninson IB, Ling V et al. The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1986; 141(3):956–62. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X8680136X>.
118. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003; 55(1):3–29. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X02001692>.
119. Beaulieu E, Demeule M, Ghitescu L, Béliveau R. P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain. *Biochem J* 1997; 326 (Pt 2)(Pt 2):539–44. doi: 10.1042/bj3260539.
120. Tanaka Y, Abe Y, Tsugu A, Takamiya Y, Akatsuka A, Tsuruo T et al. Ultrastructural localization of P-glycoprotein on capillary endothelial cells in human gliomas. *Virchows Arch* 1994; 425(2):133–8. doi: 10.1007/bf00230349.
121. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(21):7735–8. doi: 10.1073/pnas.84.21.7735.
122. Sugawara I, Hamada H, Tsuruo T, Mori S. Specialized localization of P-glycoprotein recognized by MRK 16 monoclonal antibody in endothelial cells of the brain and the spinal cord. *Japanese journal of cancer research : Gann* 1990; 81(8):727–30. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1975805/>.
123. Haqqani AS, Hill JJ, Mullen J, Stanimirovic DB. Methods to Study Glycoproteins at the Blood-Brain Barrier Using Mass Spectrometry. In: *The Blood-Brain and Other Neural Barriers*: Humana Press; 2011. S. 337–53.

124. Fu D, Arias IM. Intracellular trafficking of P-glycoprotein. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2012; 44(3):461–4. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3288648/>.
125. Schinkel AH. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood–brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999; 36(2-3):179–94. doi: 10.1016/S0169-409X(98)00085-4.
126. King M, Su W, Chang A, Zuckerman A, Pasternak GW. Transport of opioids from the brain to the periphery by P-glycoprotein: peripheral actions of central drugs. *Nat Neurosci* 2001; 4(3):268–74. Verfügbar unter: https://www.nature.com/articles/nn0301_268#Sec3.
127. Vogelgesang S, Cascorbi I, Schroeder E, Pahnke J, Kroemer HK, Siegmund W et al. Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans. *Pharmacogenetics* 2002; 12(7):535–41. doi: 10.1097/00008571-200210000-00005.
128. Romsicki Y, Sharom FJ. Phospholipid flippase activity of the reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemistry* 2001; 40(23):6937–47. doi: 10.1021/bi0024456.
129. Sharom FJ. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem* 2011; 50(1):161–78. Verfügbar unter: <https://portlandpress.com/essaysbiochem/article-lookup/doi/10.1042/bse0500161>.
130. Sita G, Hrelia P, Tarozzi A, Morroni F. P-glycoprotein (ABCB1) and Oxidative Stress: Focus on Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017:7905486. doi: 10.1155/2017/7905486.
131. Pietrzik CU, Busse T, Merriam DE, Weggen S, Koo EH. The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing. *EMBO J* 2002; 21(21):5691–700. doi: 10.1093/emboj/cdf568.
132. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; 9(7):671–5. doi: 10.1038/nmeth.2089.
133. Anti-Myc/c-Myc Antibody (9E10); 2022 [Stand: 20.09.2022]. Verfügbar unter: <https://www.scbt.com/p/c-myc-antibody-9e10>.
134. Koh J, Itahana Y, Mendenhall IH, Low D, Soh EXY, Guo AK et al. ABCB1 protects bat cells from DNA damage induced by genotoxic compounds. *Nat Commun* 2019; 10(1):2820. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-10495-4>.
135. Liu Q, Liu D-W, Zheng M-J, Deng L, Wang H-M, Jin S et al. Human epididymis protein 4 promotes P-glycoprotein-mediated chemoresistance in ovarian cancer cells

- through interactions with Annexin II. *Mol Med Rep* 2021; 24(1). doi: 10.3892/mmr.2021.12135.
136. Mazura AD, Ohler A, Storck SE, Kurtyka M, Scharfenberg F, Weggen S et al. PCSK9 acts as a key regulator of A β clearance across the blood-brain barrier. *Cell. Mol. Life Sci.* 2022; 79(4):212. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-022-04237-x>.
137. PUCK TT, CIECIURA SJ, ROBINSON A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *The Journal of experimental medicine* 1958; 108(6):945–56. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13598821/>.
138. Milton SG, Knutson VP. Comparison of the function of the tight junctions of endothelial cells and epithelial cells in regulating the movement of electrolytes and macromolecules across the cell monolayer. *J Cell Physiol* 1990; 144(3):498–504. doi: 10.1002/jcp.1041440318.
139. Charles A Janeway, JR, Paul Travers, Mark Walport, Mark J Shlomchik. The structure of a typical antibody molecule. In: Charles A Janeway, JR, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, Hrsg. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition: Garland Science; 2001 Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27144/>.
140. Kim H, Barroso M, Samanta R, Greenberger L, Sztul E. Experimentally induced changes in the endocytic traffic of P-glycoprotein alter drug resistance of cancer cells. *Am J Physiol* 1997; 273(2 Pt 1):C687-702. doi: 10.1152/ajpcell.1997.273.2.C687.
141. Robinson MS. Forty Years of Clathrin-coated Vesicles. *Traffic* 2015; 16(12):1210–38. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tra.12335>.
142. Hartz AMS, Miller DS, Bauer B. Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid-beta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* 2010; 77(5):715–23. doi: 10.1124/mol.109.061754.
143. Hartz AMS, Zhong Y, Wolf A, LeVine H, Miller DS, Bauer B. A β 40 Reduces P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier through the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *J. Neurosci.* 2016; 36(6):1930–41. Verfügbar unter: <https://www.jneurosci.org/content/36/6/1930>.
144. Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ* 2021; 9:e11165. doi: 10.7717/peerj.11165.

145. Apostoli AJ, Nicol CJB. PPAR Medicines and Human Disease: The ABCs of It All. PPAR Research 2012; 2012:504918. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3423947/>.
146. Mao H, Lockyer P, Li L, Ballantyne CM, Patterson C, Xie L et al. Endothelial LRP1 regulates metabolic responses by acting as a co-activator of PPAR γ . Nat Commun 2017; 8:14960. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5394236/>.
147. Inhibitors and inducers of P-glycoprotein drug efflux - UpToDate; 2022 [Stand: 26.09.2022]. Verfügbar unter: https://www.uptodate.com/contents/image/print?imageKey=EM%2F73326&topicKey=RHEUM%2F1666&source=outline_link.
148. Abuznait AH, Patrick SG, Kaddoumi A. Exposure of LS-180 cells to drugs of diverse physicochemical and therapeutic properties up-regulates P-glycoprotein expression and activity. J Pharm Pharm Sci 2011; 14(2):236–48. doi: 10.18433/j36016.
149. Kim RB. Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers. Drug Metabolism Reviews 2002; 34(1-2):47–54. doi: 10.1081/DMR-120001389.
150. Wolf A, Bauer B, Hartz AMS. ABC Transporters and the Alzheimer's Disease Enigma. Front Psychiatry 2012; 3:54. doi: 10.3389/fpsy.2012.00054.
151. McTavish D, Sorkin EM. Verapamil. An updated review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension. Drugs 1989; 38(1):19–76. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2670511/>.
152. Faulds D, Goa KL, Benfield P. Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. Drugs 1993; 45(6):953–1040. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7691501/>.
153. Grobbelaar M, Louw GE, Sampson SL, van Helden PD, Donald PR, Warren RM. Evolution of rifampicin treatment for tuberculosis. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 2019; 74:103937. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31247337/>.
154. Loeb MB, Molloy DW, Smieja M, Standish T, Goldsmith CH, Mahony J et al. A randomized, controlled trial of doxycycline and rifampin for patients with Alzheimer's disease. Journal of the American Geriatrics Society 2004; 52(3):381–7. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14962152/>.
155. Molloy DW, Standish TI, Zhou Q, Guyatt G. A multicenter, blinded, randomized, factorial controlled trial of doxycycline and rifampin for treatment of Alzheimer's disease:

- the DARAD trial. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 2013; 28(5):463–70.
Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/gps.3846>.
156. Chai AB, Leung GKF, Callaghan R, Gelissen IC. P-glycoprotein: a role in the export of amyloid- β in Alzheimer's disease? *The FEBS Journal* 2020; 287(4):612–25. Verfügbar unter: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.15148>.
157. Y. Li, H. Yuan, K. Yang, W. Xu, W. Tang, X. Li. The Structure and Functions of P-Glycoprotein. *Current Medicinal Chemistry*; 17(8):786–800. Verfügbar unter: <https://www.eurekaselect.com/article/15939>.
158. Lin L, Hu K. LRP-1: functions, signaling and implications in kidney and other diseases. *Int J Mol Sci* 2014; 15(12):22887–901. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4284744/>.
159. Silke Vogelgesang, Gabriele Jedlitschky, Anja Brenn and Lary C. Walker. The Role of the ATP-Binding Cassette Transporter P-Glycoprotein in the Transport of β -Amyloid Across the Blood-Brain Barrier. *Curr Pharm Des* 2011; 17(26):2778–86. Verfügbar unter: <http://www.eurekaselect.com/75239/article>.
160. Shehadul Islam M, Aryasomayajula A, Selvaganapathy P. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines* 2017; 8(3):83. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6190294/>.
161. Rodi PM, Bocco Gianello MD, Corregido MC, Gennaro AM. Comparative study of the interaction of CHAPS and Triton X-100 with the erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1838(3):859–66. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273613004033>.
162. Labeta MO, Fernandez N, Festenstein H. Solubilisation effect of Nonidet P-40, Triton X-100 and CHAPS in the detection of MHC-like glycoproteins. *Journal of Immunological Methods* 1988; 112(1):133–8. doi: 10.1016/0022-1759(88)90043-9.
163. Bendayan R, Ronaldson PT, Gingras D, Bendayan M. In situ localization of P-glycoprotein (ABCB1) in human and rat brain. *J Histochem Cytochem* 2006; 54(10):1159–67. doi: 10.1369/jhc.5A6870.2006.
164. Qosa H, Abuasal BS, Romero IA, Weksler B, Couraud P-O, Keller JN et al. Differences in amyloid- β clearance across mouse and human blood-brain barrier models: kinetic analysis and mechanistic modeling. *Neuropharmacology* 2014; 79:668–78. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3965363/>.

165. LRP1 - Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt; 2022 [Stand: 23.09.2022]. Verfügbar unter: https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q07954/entry#subcellular_location.
166. Fu D. Where is it and How Does it Get There - Intracellular Localization and Traffic of P-glycoprotein. *Frontiers in Oncology* 2013; 3:321. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3874554/>.
167. Auderset L, Landowski LM, Foa L, Young KM. Low Density Lipoprotein Receptor Related Proteins as Regulators of Neural Stem and Progenitor Cell Function. *Stem Cells International* 2016; 2016:2108495. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4754494/>.
168. Willnow TE, Moehring JM, Inocencio NM, Moehring TJ, Herz J. The low-density-lipoprotein receptor-related protein (LRP) is processed by furin in vivo and in vitro. *Biochem J* 1996; 313 (Pt 1)(Pt 1):71–6. doi: 10.1042/bj3130071.
169. Barcelona PF, Jaldín-Fincati JR, Sánchez MC, Chiabrando GA. Activated α 2-macroglobulin induces Müller glial cell migration by regulating MT1-MMP activity through LRP1. *The FASEB Journal* 2013; 27(8):3181–97. Verfügbar unter: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.12-221598>.
170. Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(2):121–32. doi: 10.1038/nrm1315.
171. Chen Z, Schmid SL. Evolving models for assembling and shaping clathrin-coated pits. *J Cell Biol* 2020; 219(9). doi: 10.1083/jcb.202005126.
172. Küey C, Sittewelle M, Larocque G, Hernández-González M, Royle SJ. Recruitment of clathrin to intracellular membranes is sufficient for vesicle formation. *Elife* 2022; 11. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9337851/>.
173. Lemmon SK. Clathrin uncoating: Auxilin comes to life. *Current Biology* 2001; 11(2):R49-R52. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982201000100>.
174. Abuznait AH, Kaddoumi A. Role of ABC transporters in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci* 2012; 3(11):820–31. doi: 10.1021/cn300077c.
175. Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, Holtzman DM, Deane R et al. Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and*

Metabolism 2007; 27(5):909–18. Verfügbar unter:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2853021/>.

176. Do TM, Noel-Hudson M-S, Ribes S, Besengez C, Smirnova M, Cisternino S et al. ABCG2- and ABCG4-mediated efflux of amyloid- β peptide 1-40 at the mouse blood-brain barrier. *J Alzheimers Dis* 2012; 30(1):155–66. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22391220/>.
177. Dodacki A, Wortman M, Saubaméa B, Chasseigneaux S, Nicolic S, Prince N et al. Expression and function of Abcg4 in the mouse blood-brain barrier: role in restricting the brain entry of amyloid- β peptide. *Sci Rep* 2017; 7(1):13393. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-13750-0>.

8 Anhang

8.1 Vektorkarten

Die folgenden Vektorkarten wurden mithilfe der Software SnapGene (Insightful Science, Version 4.1) erstellt.

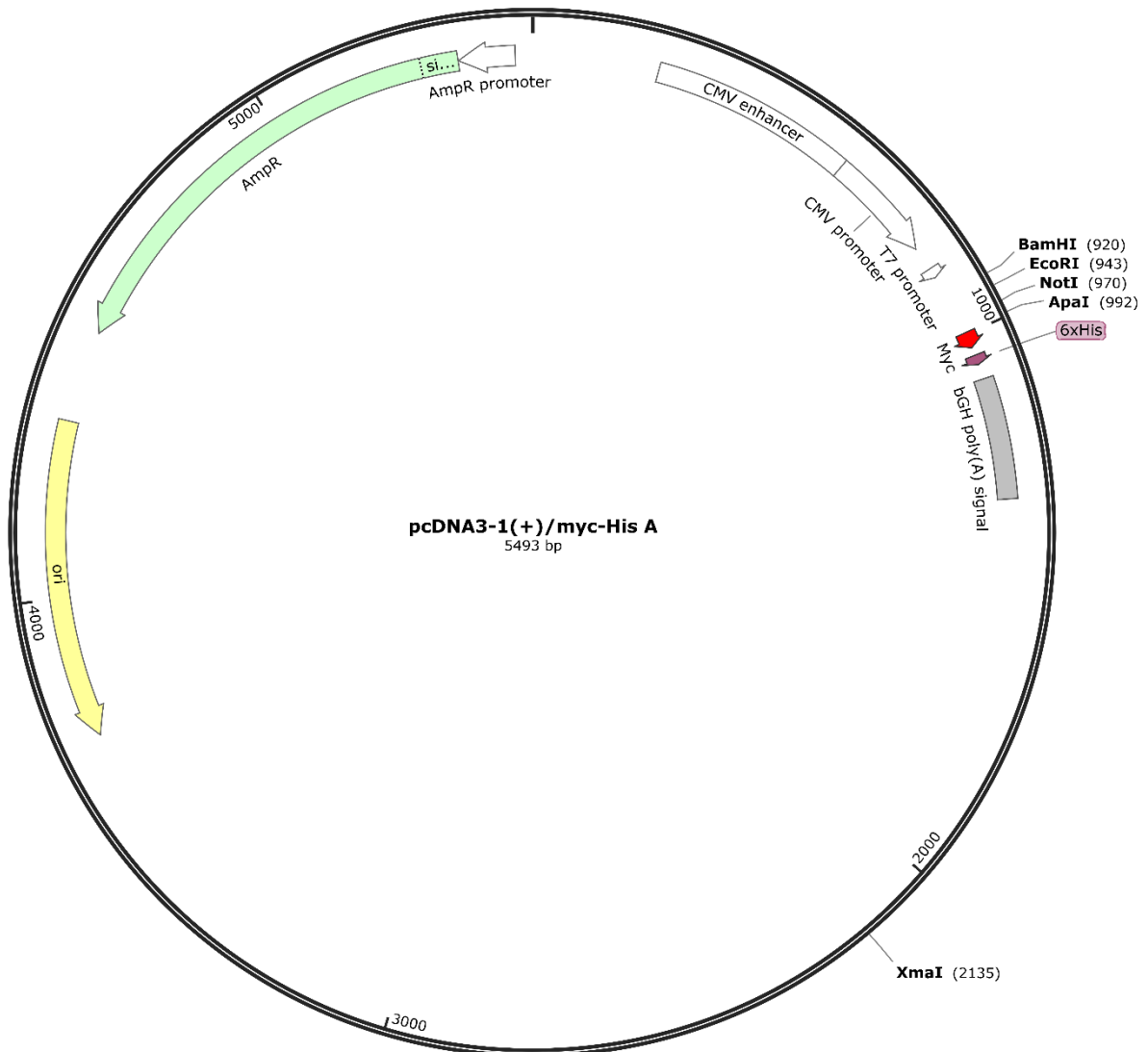


Abbildung A.1: Vektorkarte pcDNA3.1(+)/myc-His A.

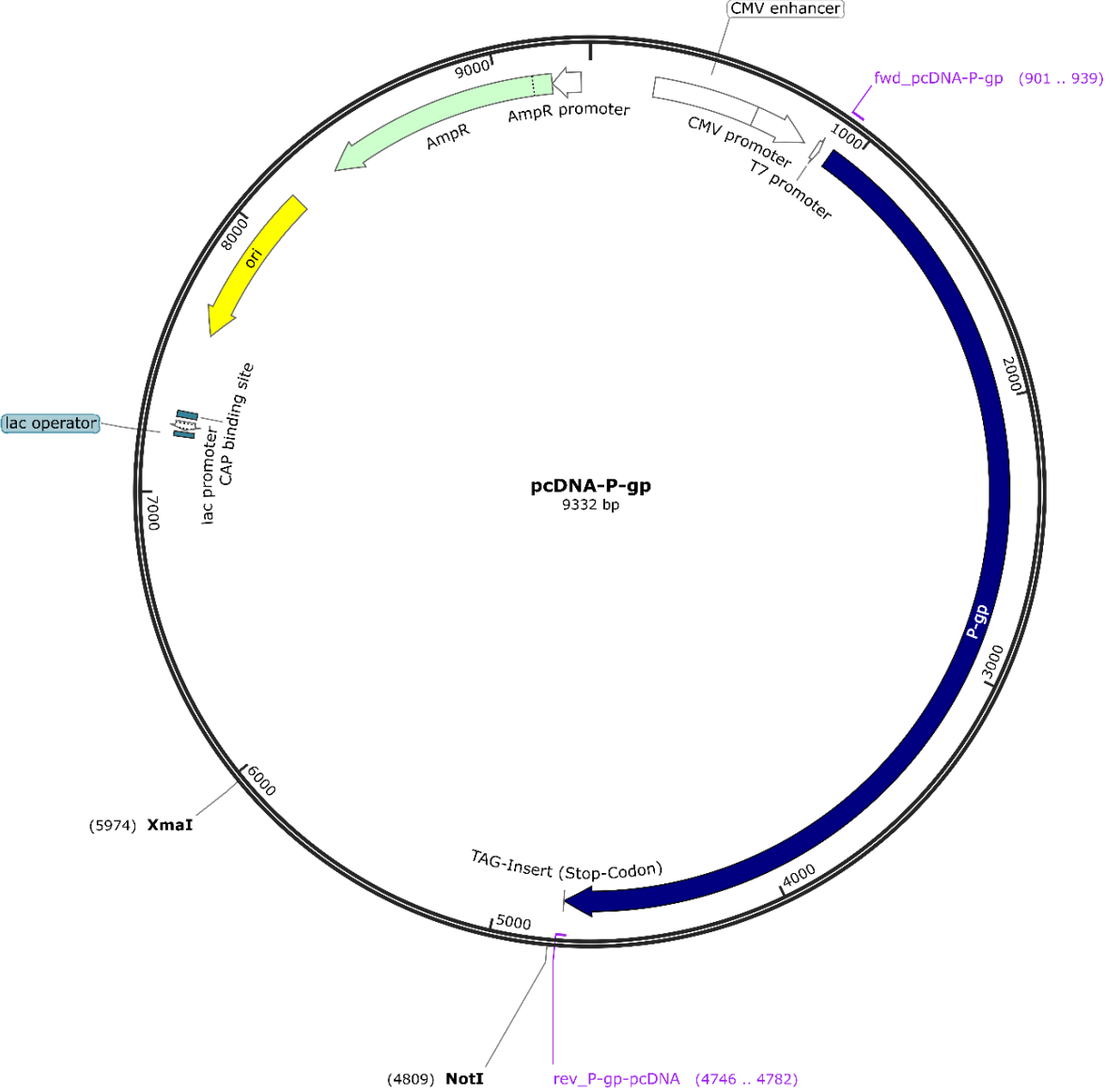


Abbildung A.2: Vektorkarte pcDNA-P-gp.



Abbildung A.3: Vektorkarte pcDNA-P-gp-myc.

8.2 Immunoblots der Immunpräzitationen von P-gp und LRP1 aus bEnd.3-Zelllysaten mit CHAPS- und NP40-Lysepuffer

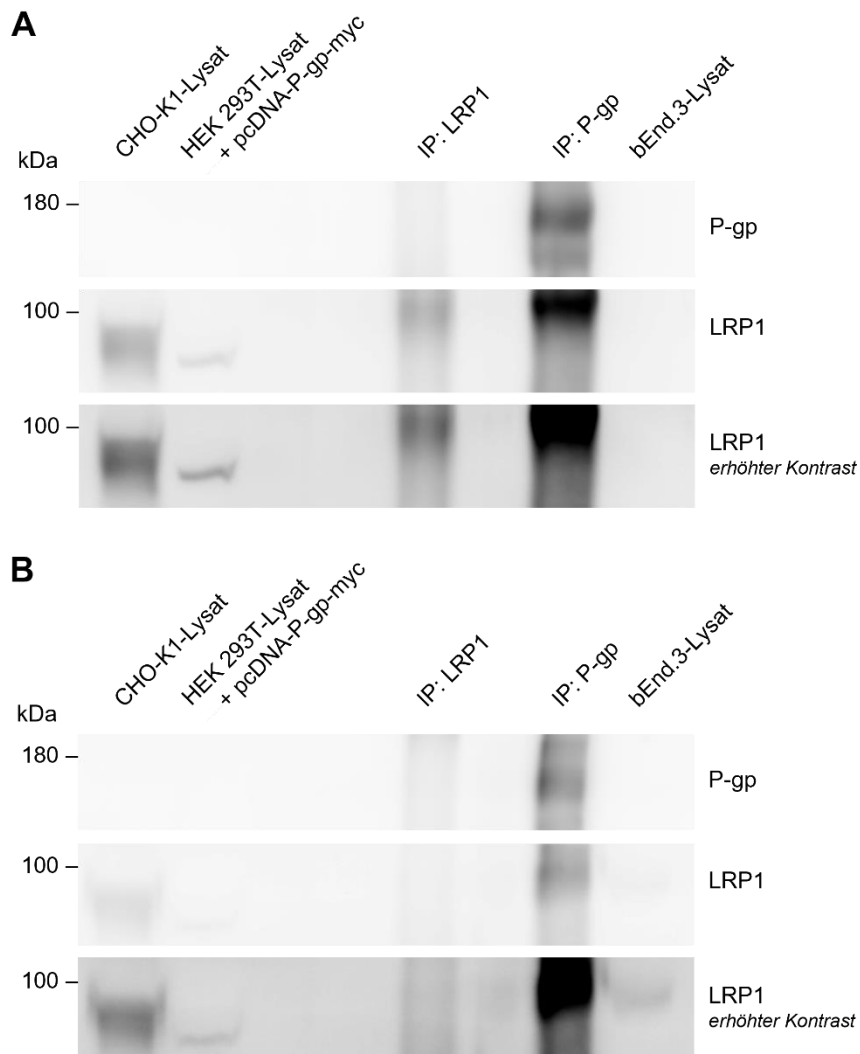


Abbildung A.4: Immunpräzitationen von P-gp und LRP1 in bEnd.3-Zellen. A + B Immunoblots von Immunpräzitationen von P-gp (IP: P-gp) und LRP1 (IP: LRP1) aus bEnd.3-Zelllysate, hergestellt unter Verwendung von **A** CHAPS- und **B** NP40-Lysepuffer. Zur Immunpräzitation wurde Zelllysate mit einer Proteinmenge von 1 mg eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde Zelllysate von transient mit pcDNA-P-gp-myc transfizierten HEK 293T-Zellen verwendet. Als weitere Kontrollen dienten native Zelllysate der Zelllinien CHO-K1 und bEnd.3. Die aufgetragene Proteinmenge der Kontrollen entspricht jeweils 40 µg. **A** und **B** zeigen jeweils einen Immunoblot aus einem Experiment.