

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

Die Interaktion von LRP1 und t-PA
im Rahmen der Schlaganfall Akuttherapie

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

Vorgelegt von

Philip Herbert Klecker
aus Düsseldorf

Mainz, 2023

Tag der Promotion:

27. Juni 2023

Meinen Eltern in ewiger Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	IV
1 Einleitung / Ziel der Dissertation	1
2 Literaturdiskussion	2
2.1 Schlaganfall.....	2
2.1.1 Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls	3
2.1.2 Blut-Hirn-Schranke	5
2.1.3 Pathologie der Blut-Hirn-Schranke.....	7
2.2 Tissue-type Plasminogen Aktivator.....	8
2.2.1 Charakteristika.....	9
2.2.2 Physiologische Funktion	11
2.3 Die LDL-Rezeptor Genfamilie.....	15
2.3.1 Lipoprotein Receptor-related Protein 1	16
2.3.2 Charakteristika.....	16
2.3.3 Physiologische Funktion	18
2.4 Interaktion von t-PA und LRP1	19
3 Material und Methoden	22
3.1 Chemikalien	22
3.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte	24
3.3 Software	26
3.4 Antikörper.....	27
3.5 Zelllinien	27
3.6 Zellbiologische Methoden.....	28
3.6.1 Kultivierung immortalisierter Zelllinien.....	28
3.6.2 Aussäen von Zellen	29
3.6.3 Präparation und Kultivierung primärer mikrovaskulärer Endothelzellen	29
3.6.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	33
3.6.5 Zellyse	33
3.6.6 Messung von Barriereigenschaften im CellZscope	34
3.6.7 Antikörperaufreinigung aus Zellkulturüberständen	35
3.7 Proteinbiochemische Methoden	36
3.7.1 Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Tests	36
3.7.2 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	36
3.7.3 Konzentrationsbestimmung mittels Proteinstandards in Polyacrylamidgelen	37
3.7.4 Western-Blot.....	38
3.7.5 Immunchemischer Proteinnachweis	39

3.8	Radiochemische Methoden	40
3.8.1	Radiomarkierung von rekombinatem t-PA (Actilyse®)	40
3.8.2	Präzipitation radiomarkierter Proteine mit TCA	40
3.9	Experimente	41
3.9.1	MMP9 und Claudin-5 Levels nach rt-PA Inkubation	41
3.9.2	Auswirkungen von rt-PA auf die Barriereigenschaften von Endothelzellen	41
3.9.3	LRP1-abhängige Aufnahme von rt-PA in CHO Zellen.....	42
3.9.4	LRP1-abhängiger Transport von rt-PA über eine Endothelbarriere.....	43
4	Ergebnisse	44
4.1	rt-PA Inkubation führt nicht zu veränderten Levels von Claudin-5 oder MMP9 in Endothelzellen	44
4.2	rt-PA zeigt keine negativen Auswirkungen auf die Barriereigenschaften von Endothelzellen	45
4.3	LRP1-abhängige Aufnahme von rt-PA in CHO Zellen.....	46
4.4	LRP1-abhängiger Transport von rt-PA über eine Endothelbarriere.....	47
5	Diskussion.....	48
5.1	MMP9 und Claudin-5 Levels nach rt-PA Inkubation.....	48
5.2	Auswirkungen von rt-PA auf die Barriereigenschaften von Endothelzellen	50
5.3	LRP1-abhängige Aufnahme von rt-PA in CHO Zellen.....	51
5.4	LRP1-abhängiger Transport von rt-PA über eine Endothelbarriere.....	52
5.5	Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur	54
6	Zusammenfassung.....	54
7	Literatur.....	56
8	Anhang	63
8.1	Danksagung	63
8.2	Lebenslauf.....	64

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bichinoninsäure
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
BFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
°C	Grad Celsius
CHO	Chinesisches Hamerovar
cm	Zentimeter
CT	Computertomografie
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DMSO	Dimethylsulfoxid
EZM	Extrazelluläre Matrix
EGF-Domäne	Epidermal Growth Factor-like Domain
FCS	Fötale Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
G	Beschleunigungsgröße der Zentrifuge
g	Gram
h	Stunde
HRP	Horse Radish Peroxidase
i.a.	Intraarteriell
IgG	Immunglobulin G
i.v.	Intravenös
IL	Interleukin
keV	Kiloelektronvolt
kDa	Kilodalton
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	Low Density Lipoprotein Rezeptor
LRP 1	Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1
Mol wt	Molekulargewicht
µg	Mikrogramm

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
mCi	Millicurie
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP9	Matrixmetalloproteinase 9
MP	Milchpulver
ng	Nanogramm
NIHSS	National Institutes of Health Stroke Scale
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NVE	Neurovaskuläre Einheit
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGF-CC	Platelet Derived Growth Factor-CC
PDGFR α	Platelet Derived Growth Factor Rezeptor α
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
rt-PA	Rekombinanter Tissue-type Plasminogen Aktivator
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBST	Tris Buffered Saline + Tween20
TCA	Trichloressigsäure
TEER	Transendothelialer elektrischer Widerstand
TEMED	N,N,N,N – Tetramethylethylendiamin
TJ	Tight-Junction
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TOAST	Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment
t-PA	Tissue-type Plasminogenaktivator

TQ	Transportquotient
V	Volumen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VLDLR	Very Low Density Lipoprotein Rezeptor
(v/v)	Volumen pro Volumen
vWF	van Willebrands Faktor
(w/v)	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystems

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der BHS.....	6
Abbildung 2: Struktur und Domänen von t-PA.....	9
Abbildung 3: Schematische Abbildung der Wirkung von (r)t-PA.....	11
Abbildung 4: Struktur LRP1.....	16
Abbildung 5: MMP9 und Claudin-5 Levels nach rt-PA Inkubation	44
Abbildung 6: Auswirkungen von rt-PA auf die Barriereigenschaften von Endothelzellen	46
Abbildung 7: LRP1-abhängige Aufnahme von rt-PA in CHO Zellen	47
Abbildung 8: LRP1-abhängiger Transport von rt-PA über eine Endothelbarriere.....	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper	27
Tabelle 2: Verwendete Zelllinien	27
Tabelle 3: Pipettierschema BSA Standards	36
Tabelle 4: Pipettierschema Polyacrylamid Gele	37

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Laut Weltgesundheitsorganisation ist der Schlaganfall die zweithäufigste Todesursache und die häufigste Ursache für permanente Behinderung weltweit. Etwa 87 % der Schlaganfälle werden durch einen Gefäßverschluss hirnversorgender Arterien verursacht. In den meisten Fällen ist für diesen Gefäßverschluss ein Blutgerinnsel verantwortlich. Daraus resultiert eine Minderversorgung des Hirngewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen, insbesondere Glukose. Das Ziel einer Akuttherapie des Schlaganfalls ist die Wiederherstellung eines Blutflusses. Ein Blutgerinnsel kann dabei entweder durch eine sogenannte Thrombektomie operativ entfernt, oder durch Medikamente wie Actilyse® oder ähnlich wirkende Präparate im Rahmen einer Thrombolyse aufgelöst werden. Das Medikament Actilyse® enthält das Enzym *recombinant tissue plasminogen activator* (rt-PA), welches ursprünglich aus dem körpereigenen System der Blutgerinnung, der Gerinnungskaskade, stammt. Es kann den ebenfalls an der Gerinnungskaskade beteiligten Faktor Plasminogen durch limitierte Proteolyse in seine enzymatisch aktive Form Plasmin überführen. Plasmin wiederum ist dazu in der Lage, das für die Ausbildung eines stabilen Blutgerinnsels polymerisierende Fibrin an seinen Quervernetzungsstellen zu spalten und somit das Blutgerinnsel zu destabilisieren. Die medikamentöse Thrombolyse stellt den Goldstandard der Schlaganfalltherapie dar und ist im Gegensatz zur Thrombektomie weniger kompliziert in der Durchführung und somit flächendeckend verfügbar. Ein wichtiger Meilenstein in der Pathologie des Schlaganfalls ist die Schädigung bis hin zum Zusammenbruch der *Blut-Hirn-Schranke* (BHS). Eine wesentliche Nebenwirkung der medikamentösen Thrombolyse ist das erhöhte Risiko einer Hirnblutung als Folge einer Schädigung und schließlich des Zusammenbruchs der *Blut-Hirn-Schranke* (BHS). Die BHS begrenzt reguliert durch ihre besondere Dichtigkeit die parazelluläre Diffusion im Blut gelöster Stoffe und bildet so eine weitestgehend undurchlässige Barriere. Sie ermöglicht daher die Aufrechterhaltung eines streng regulierten und möglichst konstanten Mikromilieus, das für die physiologische Funktion von Neuronen und anderen Zellen innerhalb des Hirnparenchyms benötigt wird. Eine Schädigung der BHS geht daher mit drastischen Komplikationen wie der Ausbildung eines Hirnödems oder einer Hirnblutung einher. Während einer medikamentösen Thrombolyse scheint diese Schädigung der BHS schwerwiegender ausgeprägt zu sein. Die genauen Ursachen dieser vermehrten Schädigung der BHS und des damit verbundenen erhöhten Blutungsrisikos sind nicht abschließend geklärt. Aktuell wird eine Interaktion des zur Thrombolyse genutzten rt-PAs mit dem *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1* (LRP1) diskutiert. LRP1 ist ein Mitglied der *Low Density Lipoprotein Rezeptor* (LDLR) Familie und wird hauptsächlich in der Leber und im Gehirn, allerdings auch in zahlreichen anderen Geweben exprimiert. Insbesondere in den Zellen, die an der Ausbildung der BHS beteiligt sind, konnte LRP1 in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. LRP1 wurde zunächst als ein am Lipoproteinstoffwechsel beteiligter Rezeptor beschrieben, der hauptsächlich am Transport von Liganden vom Extra- in den Intrazellulärraum beteiligt ist. Darüber hinaus konnten im weiteren Verlauf zahlreiche weitere Funktionen wie insbesondere eine Beteiligung an verschiedenen Signalkaskaden beobachtet werden. LRP1 weist dabei mit bisher über 40 bekannten Liganden im Vergleich zu anderen Mitgliedern der LDL-Rezeptor Familie eine Vielzahl an Interaktionspartnern auf. Einer dieser Interaktionspartner ist t-Pa. Besonders an der Interaktion von LRP1 und t-PA sind die teilweise stark unterschiedlichen Effekte sowohl bei physiologischen, als auch pathologischen Prozessen. Aufgrund dieser vielfältigen, zum Teil sogar gegensätzlichen Effekte sind die Interaktionen von t-PA und LRP1 in verschiedenen Zellen und Geweben bis heute nur unvollständig verstanden. Aktuelle Forschungsergebnisse legen nahe, dass die Interaktionen von t-PA und LRP1 maßgeblich an der Pathologie neurologischer Erkrankungen allgemein, sowie dem ischämischen Schlaganfall im Speziellen beteiligt sind. Eine Folge der Interaktion von t-PA und LRP1 ist die vermehrte Freisetzung und

Steigerung der Aktivität von *Matrixmetalloproteinasen* (MMP), wie der MMP 9. Bei MMPs handelt es sich um Endopeptidasen, die dazu in der Lage sind, verschiedene Bestandteile der *Extrazellulären Matrix* (EZM) und *Tight-Junction* (TJ) Proteine zu spalten. Zu diesen TJ-Proteinen zählt auch Claudin-5, welches eine zentrale Rolle für die Integrität der BHS hat. Eine MMP9 vermittelte Degradation von Claudin-5 könnte daher zu Veränderungen der Barriereeigenschaften der BHS führen und so zur Entstehung von Hirnblutungen oder anderen Komplikationen beitragen. Dieser Annahme folgend stellen wir die Hypothese auf, dass die Hemmung der Interaktion von rt-PA und LRP1 während einer thrombolytischen Therapie protektive Effekte hinsichtlich der Schädigung der BHS und der daraus folgenden Komplikationen haben könnte. Eine solche Hemmung der Interaktion von t-PA und LRP1 könnte durch die Gabe eines gegen die rt-PA Bindungsstellen von LRP1 gerichteten monoklonalen Antikörpers realisiert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Interaktion von rt-PA und LRP1 und besonders die Inhibition dieser Interaktion näher zu charakterisieren. Ein besseres Verständnis dieser Vorgänge könnte dazu beitragen, therapiebedingte Komplikationen während der Akuttherapie des Schlaganfalls reduzieren.

2 Literaturdiskussion

2.1 Schlaganfall

Der Schlaganfall ist heutzutage eine der häufigsten Todesursachen weltweit. Darüber hinaus sind die Folgen und Komplikationen eines Schlaganfalls der häufigste Auslöser für langfristige, irreversible Behinderung und Beeinträchtigung. Ein Schlaganfall ist durch das plötzliche, schlagartige Auftreten neurologischer Ausfallerscheinungen, wie zum Beispiel einer Halbseitenlähmung oder Sprachstörungen charakterisiert. Ursächlich ist eine akut auftretende Minderversorgung des Hirngewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen, insbesondere Glukose, die durch eine Störung der Durchblutung verursacht wird. Im Allgemeinen kann man Schlaganfälle anhand der zu dieser Durchblutungsstörung führenden Ursache in ischämische, durch den Verschluss eines Blutgefäßes bedingte, und hämorrhagische Schlaganfälle (Hirnblutungen), verursacht durch das Platzen eines Blutgefäßes, einteilen. Insgesamt ist dabei der ischämische Schlaganfall mit einem Anteil von etwa 87 % deutlich häufiger als ein hämorrhagischer mit lediglich 13 % (1). Der ischämische Schlaganfall kann anhand seiner Ätiologie weiter klassifiziert werden. Ein häufig genutztes Klassifikationssystem ist die *Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment* (TOAST) Klassifikation (2). Sie grenzt die Arteriosklerose größerer Gefäße, kardiale Embolien, den Verschluss kleiner Gefäße, sowie andere und nicht ermittelbare Ursachen voneinander ab. Ausgehend von diesen Ursachen werden erhöhter Blutdruck, Diabetes Mellitus, Herzrhythmusstörungen, erhöhte Cholesterin- und Blutfettwerte, Rauchen, körperliche Inaktivität, ungesunde Ernährung, Nierenerkrankungen, sowie eine genetische Disposition als Risikofaktoren beschrieben. Eine besondere Rolle im Bereich der genetischen Disposition scheinen dabei Mutationen zu spielen, bei denen es im Blut zu einer Erhöhung der Konzentration des *Low Density Lipoproteins* (LDL) kommt. Unabhängig von einzelnen Risikofaktoren steigt mit zunehmendem Alter das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden. Die genaue Kenntnis von Ätiologie und Risikofaktoren ermöglicht mehr und mehr eine gezielte Prävention. Trotz einer Abnahme der Schlaganfallinzidenz kommt es durch die Alterung der Bevölkerung, sowie den Einfluss permanent vorhandener Risikofaktoren zu einer Erhöhung des Lebenszeitriskos einen Schlaganfall zu erleiden von 22,8 % (1990) auf 24,9 % (2016), was einer Erhöhung von 8,9 %

entspricht (1). Die aktuellsten epidemiologischen Studien zum Thema Schlaganfall liefert die American Heart Association in Zusammenarbeit mit den National Institutes of Health. In jährlichen Berichten erfassen diese neben Risikofaktoren des Schlaganfalls und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen auch deren Inzidenz und Prävalenz. Sie berufen sich dabei auf die gesamten, während eines Jahres erhobenen Statistiken innerhalb der USA. Im Geschlechtervergleich haben Frauen gegenüber Männern ein leicht erhöhtes Risiko sowohl einen Schlaganfall zu erleiden, als auch einen schwerwiegenden Verlauf zu haben. Stand 2020 erleiden jährlich etwa 795.000 Menschen einen Schlaganfall. Zu diesem Zeitpunkt berichteten ca. 7 Millionen Amerikaner, bereits mindestens einen Schlaganfall gehabt zu haben, was einer Prävalenz von ca. 2,5 % entspricht (1). Weltweit lag 2016 die Inzidenz eines erstmaligen Schlaganfalls bei 13,7 Millionen, die Prävalenz bei etwa 80 Millionen Menschen. Schätzungsweise 5,5 Millionen Menschen sterben jährlich an den Folgen eines Schlaganfalls (3).

2.1.1 Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls

Unmittelbar nach Einsetzen des Schlaganfalls und der damit verbundenen Unterversorgung des Hirngewebes beginnt die Schädigung des Hirngewebes. Diese Schädigung ist bereits nach einigen Minuten irreversibel. Eine frühzeitige Identifikation von Schlaganfallpatienten ist daher wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie. Ziel der Akuttherapie ist eine Wiederherstellung der Durchblutung der betroffenen Hirnareale, die sogenannte Reperfusion. Je früher die Reperfusion erreicht werden kann, desto geringer ausgeprägt bleibt die irreversible Schädigung des Hirngewebes. Da eine Unterscheidung von ischämischen und hämorrhagischem Schlaganfall anhand der klinischen Symptome nicht möglich ist, ist vor Beginn einer Therapie eine Diagnostik in Form einer *Computertomografie* (CT) des Schädels notwendig. Wichtig ist dabei vor allem der Ausschluss eines hämorrhagischen Schlaganfalls, da dieser eine andere Therapie als der ischämische benötigt. Im Falle des ischämischen, von einem Blutgerinnsel verursachten Schlaganfalls gibt es je nach Lage des Gefäßverschlusses zwei mögliche Therapieansätze um eine Rekanalisation zu erreichen. Goldstandard ist seit ihrer Einführung die medikamentöse Thrombolyse, bei der durch Medikamente wie Actilyse® das verursachende Blutgerinnsel aufgelöst wird. Actilyse® enthält das rekombinant hergestellte Enzym rt-PA aus dem körpereigenen System der Blutgerinnung, der Gerinnungskaskade. rt-PA katalysiert dabei die Umwandlung des enzymatisch inaktiven Vorläuferenzym Plasminogen in seine aktive Form Plasmin. Plasmin wiederum ist dazu in der Lage, die Quervernetzungen von Fibrin, einem weiteren Faktor der Gerinnungskaskade, zu spalten. Ein Blutgerinnsel entsteht zunächst durch die Aggregation von Thrombozyten und eine lockere Bindung. Im weiteren zeitlichen Verlauf wird dieses instabile Blutgerinnsel durch die Anlagerung und Polymerisation von Fibrin bis zur Bildung eines festen Blutgerinnsels stabilisiert. Die Spaltung der Fibrinnetzungen führt daher zunächst zu einer Destabilisierung, und danach auch zur Auflösung eines Blutgerinnsels. In ausgewählten Fällen stellt die sogenannte Thrombektomie eine weitere Therapieoption des akuten ischämischen Schlaganfalls dar. Bei einer Thrombektomie wird das Ischämie verursachende Blutgerinnsel über ein minimalinvasives interventionelles Verfahren mittels eines Katheters aus dem betroffenen Blutgefäß geborgen. Die medikamentöse Thrombolyse wurde erstmals in den 1980er Jahren durch die amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA) zur Behandlung des ischämischen Schlaganfalls zugelassen. Seit dieser Zeit konnten viele Erkenntnisse zur Wirksamkeit dieser Therapie gewonnen werden. In den 1990er Jahren wurde zunächst in mehreren Studien die optimale Dosierung des Medikamentes, sowie das Zeitfenster für den

Beginn der thrombolytischen Therapie nach Einsetzen des Gefäßverschlusses untersucht. Aktuell wird eine Thrombolyse generell, bei Beachtung möglicher Kontraindikationen wie einer Medikamentenunverträglichkeit, für Patienten innerhalb eines Zeitfensters von < 4,5 Stunden (h) nach Symptombeginn empfohlen. Darüber hinaus können in Einzelfällen auch besondere Patientengruppen nach weiterer bildgebender Diagnostik von einer Thrombolyse über 4,5 h nach dem Gefäßverschluss profitieren (4). Grundlage für diese Empfehlungen sind Untersuchungen der *National Institutes of Health Stroke Scale* (NHSS). In einer 1995 durchgeführten Metaanalyse konnten diese bereits ein signifikant besseres Outcome von Schlaganfallpatienten, bei denen in < 3 h nach Gefäßverschluss eine Thrombolyse begonnen wurde gegenüber einer Placebo Gruppe zeigen (5). Ebenfalls in den 1980er Jahren wurde die Methode der Thrombektomie entwickelt. Eine 2007 durchgeführte Studie analysierte die Effektivität einer Thrombolyse im Vergleich zu einer Thrombektomie. Die höchste Rate an erfolgreichen Rekanalisationen konnte dabei mit 83,6 % durch eine Thrombektomie erzielt werden. Mittels kombinierter *intravenösen* (i.v.) und *intraarteriellen* (i.a.) Thrombolyse konnte in 67,5 % der Fälle, mit einer isolierten i.v. Thrombolyse in 63,2 % der Fälle eine Rekanalisation erzielt werden (6). Weitere und aussagekräftigere Studien zum Vergleich der Wirksamkeit einer Thrombektomie im Vergleich zu einer Thrombolyse im akuten ischämischen Schlaganfall waren dagegen erst wesentlich später verfügbar. Wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Therapieoptionen ist die Tatsache, dass die Thrombektomie im Gegensatz zur Thrombolyse nicht für alle Patienten geeignet ist. Trotz kontinuierlich weiterentwickelter Verfahren können insbesondere kleine, weit innerhalb des Hirnparenchyms gelegene Gefäßverschlüsse nicht von einem Katheter erreicht werden. Die Therapieempfehlung der *Deutschen Gesellschaft für Neurologie* (DGN) von 2015 lautet daher: „Eine mechanische Thrombektomie ist zur Behandlung von akuten Schlaganfallpatienten mit klinisch relevantem neurologischem Defizit und großem arteriellem Gefäßverschluss im vorderen Kreislauf bis zu 6 Stunden (Zeitpunkt der Leistenpunktion) nach Auftreten der Symptome empfohlen. Bei fehlenden Kontraindikationen sollen die Patienten im 4,5-Stunden-Zeitfenster auch systemisch mit rt-PA behandelt werden.“ (7). Für dieses besondere Patientenkollektiv konnte eine Verbesserung des klinischen Outcomes im Vergleich zur alleinigen Thrombolyse gezeigt werden (4). Ein weiterer Vorteil einer Thrombolyse gegenüber einer Thrombektomie ist ihre breitere Verfügbarkeit. Eine Thrombektomie kann nur durch spezialisierte Zentren durchgeführt werden, wohingegen die Thrombolyse nahezu flächendeckend verfügbar ist, solange die notwendige CT-Diagnostik verfügbar ist. Insgesamt kann im Schnitt bei 55,1 % der Patienten, die eine rekanalisierende Therapie erhalten haben tatsächlich eine Rekanalisation erreicht werden. Die spontane Rekanalisationsrate dagegen liegt lediglich bei etwa 24,1 %. Eine verzögerte spontane Rekanalisation hat dabei laut Studienlagen keinen positiven Einfluss auf den Gesundheitszustand der Patienten nach Behandlung. Die Mortalität nach Rekanalisation als Schlaganfalltherapie ist mit 14,4 % deutlich geringer im Vergleich zu 41,6 % ohne rekanalisierende Therapie. Darüber hinaus führte eine zeitnahe Rekanalisation bei 58,1 % der Patienten zu einem guten klinischen Outcome. Bei Patienten ohne Rekanalisation ist der Anteil dieser Patienten mit vergleichbarem Outcome mit lediglich 24,8 % deutlich geringer. Der Gesundheitszustand und damit das klinische Outcome der Patienten nach Behandlung wurde dabei mit der modifizierten Rankin-Skala, einem Skore zur Erfassung der schlaganfallbedingten Beeinträchtigung, gemessen (6).

2.1.2 Blut-Hirn-Schranke

Die Blutgefäße des Hirns bilden eine spezialisierte Barriere aus, die sogenannte BHS. Im Vergleich zu anderen Zellbarrieren im menschlichen Körper ist sie besonders undurchlässig, sodass im Blut gelöste hydrophile Stoffe sie nicht durch Diffusion überwinden können. Stattdessen ist ein Transport über die BHS nur über spezifische Kanäle oder Transporter möglich. Eine strikt regulierte und undurchlässige BHS ist Voraussetzung für die Schaffung und Aufrechterhaltung eines konstanten Mikromilieus. Nur unter diesen konstanten Bedingungen ist eine physiologische Funktion des Hirns möglich. Der enorme Energieverbrauch des Hirns erfordert dagegen einen regen Transport von Nährstoffen, besonders von Glucose, sowie den Abtransport von Stoffwechselprodukten. Die dazu benötigte Transportkapazität wird durch die Ausstattung der Endothelzellen mit zahlreichen spezifischen Transportern sichergestellt. Die für diese aktiven Transportvorgänge benötigte Energie in Form von *Adenosintriphosphat* (ATP) wird durch eine im Vergleich zu peripheren Endothelzellen reiche Ausstattung mit Mitochondrien gewährleistet. Die besondere Undurchlässigkeit der BHS wird maßgeblich durch zahlreiche verschiedene und stark ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte zwischen den Endothelzellen gewährleistet. Eine entscheidende Rolle nehmen unter den Zell-Zell-Kontakten die *Tight-Junctions* (TJ) ein. Sie bestehen aus großen Proteinkomplexen, die von spezifischen Transmembranproteinen, den Claudinen und Occludinen gebildet werden (8). Claudine und Occludine verschließen dabei durch ihre Bindung den Raum zwischen zwei benachbarten Zellen. Über eine Bindung an die innerhalb des Zytoplasmas gelegenen Zonula Occludens-Proteine ZO 1,2 und 3 werden sie zusätzlich stabilisiert. Die Zonula Occludens-Proteine wiederum sind ihrerseits durch Bindung an Aktinfilamente innerhalb der Zelle fixiert. Das Zusammenspiel dieser verschiedenen Proteine ist essentiell für die Funktion und Stabilität der TJs. Insgesamt wurden beim Menschen 26 verschiedene Claudin-Isoformen nachgewiesen. Die in zerebralen Endothelzellen am häufigsten vertretene Isoform ist Claudin-5. Es konnte gezeigt werden, dass bereits ein alleiniger Verlust von Claudin-5 zu einer funktionellen Beeinträchtigung der BHS führt. Aufgrund dieser besonderen Bedeutung von Claudin-5 für die Undurchlässigkeit der BHS kann die Claudin-5 Konzentration als Marker für die Permeabilität der BHS angesehen werden. Konzentration und Expression von Claudinen sind dabei nicht konstant, sondern unterliegen verschiedenen Einflussfaktoren. So kommt es beispielsweise durch Glukokortikoidwirkung zu einer Aktivitätssteigerung des Promotors für Claudin-5 und damit zu einer verstärkten Expression und erhöhten Konzentration. Die veränderte Expression von Claudin-5 beeinflusst somit direkt die Permeabilität der BHS (9). Neben Endothelzellen sind auch weitere Zelltypen an der Bildung der BHS beteiligt. Diese verschiedenen Zelltypen stehen dabei in engem Kontakt und Austausch und beeinflussen sich gegenseitig. Anfang der 2000er Jahre wurde daher das Konzept der *Neurovaskulären Einheit* (NVE) erarbeitet, welches die Interaktionen zwischen den verschiedenen Zelltypen, die an der Bildung und Aufrechterhaltung der BHS beteiligt sind in den Vordergrund stellt (10). Die Endothelzellen bilden die Grenzfläche zum Blut und steht im direkten Kontakt mit der glatten Muskulatur der Gefäße. Über Veränderungen des Muskeltonus kann so der Blutfluss reguliert werden. Im Rahmen der sogenannten zerebralen Autoregulation kann durch Veränderung des zerebralen Gefäßwiderstandes auf Veränderungen des Perfusionsdruckes reagiert werden um eine nahezu konstante Durchblutung des Hirns zu gewährleisten. Endothelzellen besitzen dabei Eigenschaften von Mechanorezeptoren im Hinblick auf durch den Blutstrom bedingte Scherkräfte und können über verschiedene vasoaktive Substanzen wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) den Muskeltonus der Gefäßmuskulatur und somit auch den Blutfluss beeinflussen (11). Auch Astrozyten, die am weitesten verbreiteten Gliazellen im Hirn interagieren mit Endothelzellen und der BHS insgesamt. Die Ausläufer der Astrozyten besetzen einen großen Teil der Endothelzellen und sind neben einer rein physikalischen Verstärkung der BHS dazu

in der Lage, bioaktive Substanzen zu sezernieren und so Gefäßwiderstand und Blutstrom zu beeinflussen. Zudem können sie Einfluss auf die Expression von TJ Proteinen nehmen (11). Eine weitere wichtige Funktion der Astrozyten ist die Regulation des Ein- und Ausstroms von Wasser ins und aus dem Hirn heraus. Diese Funktion wird durch die Ausstattung mit Aquaporin IV Kanälen realisiert (9). Ein weiterer Zelltyp innerhalb der NVE sind die Perizyten. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Reifung von Blutgefäßen und haben ebenfalls Anteil an der Regulation des Blutflusses, sowie der Migration von Immunzellen. In Studien konnte gezeigt werden, dass Mäusembrionen ohne funktionierende Perizyten keine intakte BHS ausbilden können und darüber hinaus Abweichungen in TJ-Protein Konzentrationen, sowie ein verändertes Verhalten von Endothelzellen zeigen. Auch bei ausgewachsenen Mäusen besteht eine Korrelation zwischen der Bedeckung der Endothelzellen mit Perizyten und einer intakten BHS. Ein Perizytenverlust, ausgelöst durch eine Blockade des *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) Rezeptors beta führt zu einer Akkumulation von venös verabreichten Tracern in Endothelzellen und Hirngewebe. Auch interagieren Perizyten mit anderen Zellen der NVU. Die Haftung von Astrozytenausläufern auf Endothelzellen ist maßgeblich von ihnen abhängig (11). Abgesehen von ihrer Barrierefunktion mit Limitation der parazellulären- und transzellulären Diffusion erfüllt die BHS weitere Funktionen. Durch in der BHS lokalisierter Enzyme wie die Acetylcholinesterase trägt sie zur Verstoffwechslung von Medikamenten bei. Zusätzlich dazu enthält sie spezialisierte Effluxtransporter wie das P-Glykoprotein zum Schutz vor neurotoxischen Substanzen (9).

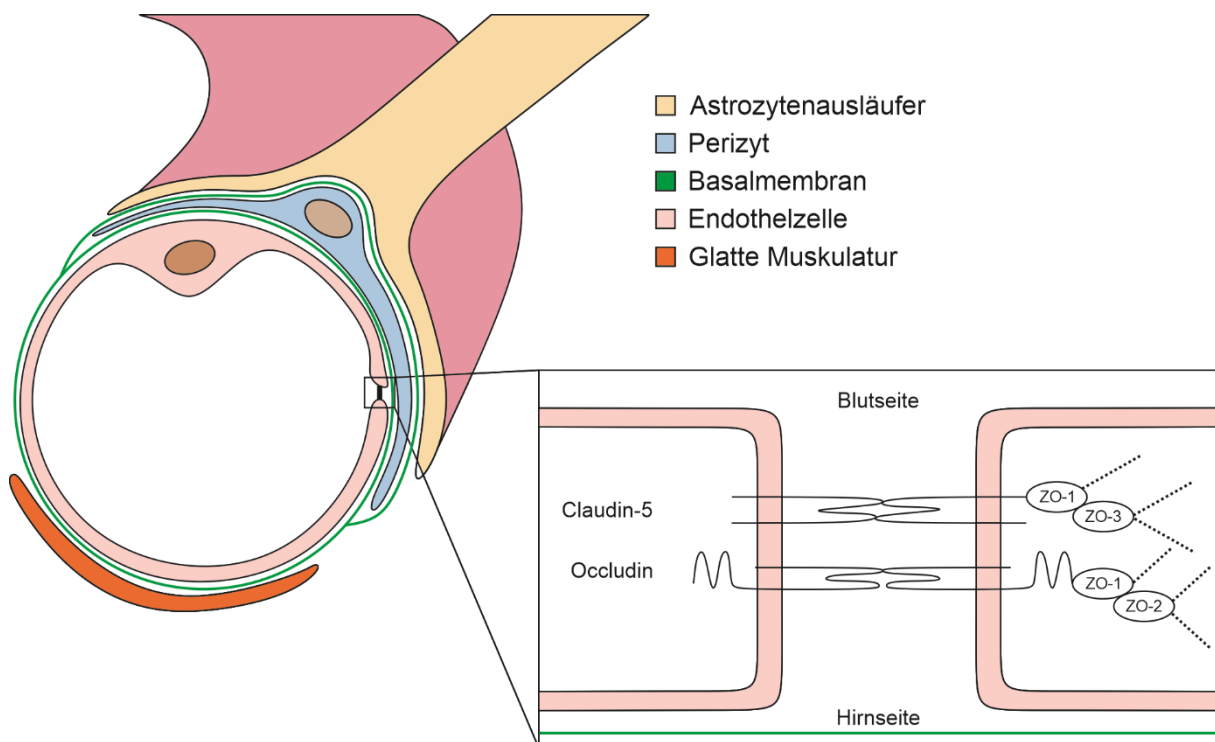


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der BHS
(a) Querschnitt eines zerebralen Blutgefäßes und Darstellung verschiedener am Aufbau der BHS beteiligter Zelltypen. (b) Schematische Darstellung der TJ-Proteine Claudin-5 und Occludin. Beide Proteine können das Protein ZO-1 binden. Dieses kann darauf entweder ZO-2 oder ZO-3 binden. Alle ZO Proteine sind wiederum über eine Bindung an Aktin im Zytoskelett verankert und stabilisieren die TJ. Vereinfachte Abbildung abgewandelt aus (8–10).

2.1.3 Pathologie der Blut-Hirn-Schranke

Bei einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen kommt es zu Veränderungen im Bereich der BHS, daher wird angenommen, dass Pathologien der BHS eine entscheidende Rolle bei zahlreichen neurologischen Erkrankungen spielen. Auch im Rahmen der Pathologie des ischämischen Schlaganfalls und dessen Akuttherapie spielen die BHS und ihr Zusammenbruch eine Schlüsselrolle. Die Schädigung der BHS ist dabei vermutlich für Komplikationen des Schlaganfalls wie die Entstehung eines Hirnödems oder einer Hirnblutung verantwortlich, da eine Schädigung der BHS bereits vor dem Eintritt dieser Komplikationen nachweisbar ist (8, 11, 12). Derzeit wird vermutet, dass der Grad der Schädigung der BHS nicht nur Auswirkungen auf die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Komplikationen hat, sondern auch das Ausmaß der Schädigung des Hirngewebes beeinflusst. Diese Vermutung konnte bereits *in vivo* bestätigt werden. In einem Mausmodell konnte durch Verhinderung des Zusammenbruchs der BHS die Schädigung des Hirngewebes im Vergleich zur Kontrollgruppe mit entsprechender Schädigung der BHS reduziert werden (11). Die Änderung der Permeabilität der BHS und ihr darauf resultierender Zusammenbruch sind komplexe Prozesse, an denen viele Faktoren beteiligt sind. Unter anderem sind Entzündungsmediatoren, die die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und proteinspaltender Enzymen wie *Matrixmetalloproteinasen* (MMPs) vermitteln können, Gegenstand aktueller Forschung (12). An diesen durch Entzündungsmediatoren ausgelösten Prozessen sind verschiedene Zelltypen innerhalb des Hirnparenchyms und der BHS beteiligt. Astrozyten und Perizyten setzen als Reaktion auf eine Entzündung weitere Entzündungsmediatoren frei und verstärken dadurch die Entzündungsreaktion (11). Astrozyten kommt dabei eine wichtige regulatorische Funktion der Inflammation zu (9). Die während einer solchen Entzündungsreaktion freigesetzten MMPs scheinen für die schädlichen Folgen an der BHS eine wichtige Rolle zu spielen. MMPs sind induzierbare Endopeptidasen mit einer Vielzahl verschiedener Substrate. Im Zusammenhang mit der Schädigung der BHS sind dabei vor allem die Proteine interessant, die an der Zusammensetzung von *Extrazellulären Matrix* (EZM) und BHS beteiligt sind. Auch das für die Permeabilität der BHS bedeutsame Protein Claudin-5 ist Substrat einer MMP, der MMP9 (13). In der Akutphase des Schlaganfalls, in der die BHS noch intakt ist, lassen sich erste Pathologien an den Endothelzellen beobachten. Durch die Ischämie kommt es zu einer deutlich gesteigerten parazellulären Diffusion, einer sogenannten Hyperpermeabilität der BHS. Das physiologisch konstant gehaltene Mikromilieu wird dadurch gestört und die Zellen im ischämischen Gebiet in ihrer Funktion beeinträchtigt. Im weiteren Verlauf sind Endothelzellen in der Lage, ausgelöst durch Stimuli wie Reaktive Sauerstoffspezies oder Entzündungsmediatoren, MMPs freizusetzen (11). Dabei konnte im Tiermodell eine vermehrte Expression verschiedener Isoformen von MMPs unter ischämischen Bedingungen belegt werden. In am Menschen durchgeführten Untersuchungen konnte ebenfalls ein Anstieg der Aktivität der MMP9 im Zusammenhang mit einem Schlaganfall beobachtet werden (8). Eine Folge der erhöhten Permeabilität der BHS ist die vermehrte Invasion von Immunzellen wie neutrophilen Granulozyten. Im Hirngewebe kann diese Infiltration durch Entzündungszellen wiederum zu einer gesteigerten Freisetzung von MMP9 führen. Eine Ausschüttung von Entzündungsmediatoren begünstigt darüber hinaus die Infiltration des Hirngewebes durch weiteren Immunzellen (11). Neben der MMP9 kommt es zu einer gesteigerten Freisetzung der Isoformen MMP2 und MMP3. Die MMP3 wird dabei t-PA vermittelt freigesetzt, wohingegen MMP2 vermutlich durch während einer Hypoxie anfallende Faktoren freigesetzt und aktiviert wird (9, 14). Es wird vermutet, dass mit der gesteigerten Freisetzung von MMPs ein vermehrter Abbau von TJ-Proteinen wie Claudin-5 einhergeht. Eine Verringerung der Claudin-5 Konzentration konnte im Zusammenhang mit einem Schlaganfall dabei in einem Zeitraum von 24 h bis 7 Tage nach Einsetzen der Ischämie nachgewiesen werden (9). Neben einem gesteigerten Abbau von TJ-Proteinen konnte auch eine posttranslationale Modifikation dieser

durch Phosphorylierung beobachtet werden. Diese Phosphorylierung ist dabei durch mehrere Faktoren, wie den *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder auch freigesetzten Entzündungsmediatoren bedingt und führt insgesamt zu einer weiteren funktionellen Beeinträchtigung der BHS. Neben Claudin-5 kommt es zu einem Abbau des TJ Proteins Occludin. Im Fall von Occluding konnte in einem Schlaganfallmodell ein durch gesteigerte Ubiquitinierung ausgelöster Abbau gezeigt werden (11). Während die beschriebenen funktionellen Veränderungen der BHS auch in nicht therapierten Schlaganfallpatienten zu beobachten sind, erscheint die Komplikationsrate in therapierten Patienten erhöht. Neben einer allergischen Reaktion auf das Medikament ist die schwerwiegendste Komplikation einer medikamentösen Schlaganfalltherapie mit Actilyse® die Erhöhung des Risikos, ein Hirnödem oder eine Hirnblutung zu entwickeln. Trotz einer Erhöhung des Blutungsrisikos durch die Thrombolyse auf 6,4 % im Vergleich zu 0,6 % in der Placebogruppe zeigte die Therapie allerdings ein verbessertes Outcome (4). Die genauen Mechanismen, die zu dieser Erhöhung des Blutungsrisikos verantwortlich sind, konnten bis heute nicht abschließend geklärt werden. Im Allgemeinen korreliert das Komplikationsrisiko mit den Vorerkrankungen der Patienten (11). Zusätzlich dazu wird allerdings vermutet, dass es zu einer Steigerung des Blutungsrisikos in Anwesenheit von t-PA kommt. Während der medikamentösen Schlaganfalltherapie mit rt-PA konnte so beispielsweise eine gesteigerte Aktivität von MMPs beobachtet werden (11). Das könnte eine Erklärung dafür sein, dass in Anwesenheit von rt-PA ein vermehrter Abbau von Claudin-5 zu beobachten ist (9). Die ischämiebedingte Schädigung der BHS und deren Zusammenbruch sind insgesamt sehr komplexe Prozesse an denen verschiedene Zelltypen, sowie Mediatoren beteiligt sind. Teilweise können diese Prozesse scheinbar durch eine medikamentöse Therapie mit Actilyse® negativ beeinflusst werden.

2.2 Tissue-type Plasminogen Aktivator

Das Enzym *Tissue-type Plasminogen Aktivator* (t-PA) ist ein Glykoprotein, das zur Gruppe der Serinproteasen gezählt wird und zudem der Chymotrypsin-Familie angehört (15). Erstmals wurde t-PA als Enzym beschrieben, das die Umwandlung des Proenzym Plasminogen in seine aktive Form, Plasmin, katalysiert. Zunächst wurde es hauptsächlich im Blut nachgewiesen, später allerdings auch in diversen anderen Geweben, unter anderem dem Gehirn (16). Das durch t-Pa in seine aktive Form überführte Enzym Plasmin wird ebenfalls zu den Serinproteasen gezählt und ist in der Lage, verschiedene weitere Proteine zu spalten. Die wichtigste Funktion von Plasmin liegt im körpereigenen System der Blutgerinnung, der Gerinnungskaskade. Plasmin ist dazu in der Lage, das für die Ausbildung eines stabilen Blutgerinnsels polymerisierende Fibrin an seinen Quervernetzungsstellen zu spalten. Das führt zu einer Destabilisierung und schließlich auch zur Auflösung eines Blutgerinnsels. t-Pa nimmt damit eine wichtige Rolle als Gegenspieler von gerinnungsfördernden Faktoren innerhalb der Gerinnungskaskade ein.

2.2.1 Charakteristika

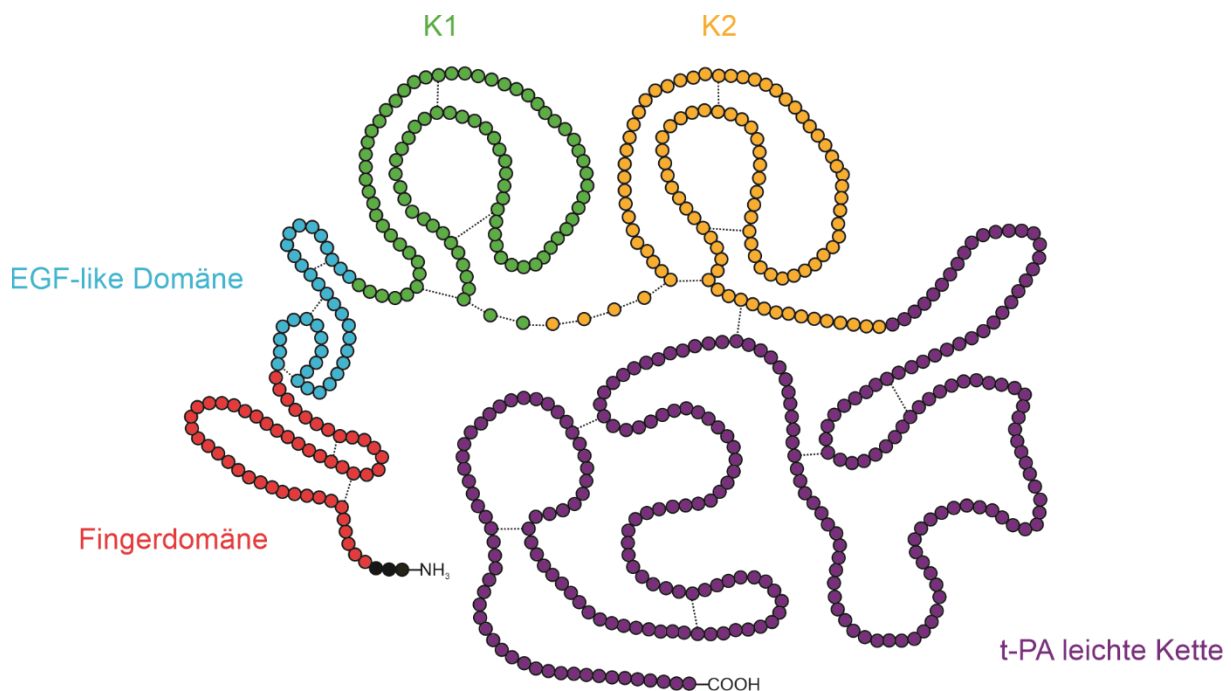


Abbildung 2: Struktur und Domänen von t-PA
t-PA in seiner einkettigen Form, die Spaltungsstelle befindet sich zwischen der leichten Kette und der K2 Kringle Domäne. Die schwere Kette von t-PA besteht aus Finger-, EGF-like- und den Kringle Domänen K1 und K2. Abbildung in vereinfachter Form (16, 17).

t-PA wird hauptsächlich durch Endothelzellen gebildet. Seine Sekretion unterliegt dem Einfluss verschiedener physikalischer und hormoneller Stimuli. Im Kontext der Gerinnungskaskade besteht vor allem ein Zusammenhang zur Konzentration des Enzyms Thrombin, welches ein entscheidender gerinnungsfördernder Faktor ist. Die Sekretion von t-Pa und gerinnungsfördernden Faktoren unterliegt neben dieser gegenseitigen Beeinflussung auch der Regulation durch ähnliche Faktoren, sodass die Blutgerinnung insgesamt durch diese Einflussgrößen weitgehend konstant gehalten werden kann (16). Normalerweise ist die t-PA Produktion auf Endothelien in Blutgefäßen spezifischer Größe und anatomischer Lage limitiert (18). Im Hirngewebe dagegen kann t-Pa zusätzlich zu Endothelzellen auch von nahezu allen weiteren vertretenen Zelltypen gebildet werden. Zu diesen Zelltypen zählen Astrozyten, Neurone, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen (15). Unter physiologischen Bedingungen ist nur eine sehr geringe t-PA Konzentration von etwa $4,0 \pm 1,8$ ng/ml im Blut nachweisbar. Eine kurzfristige Konzentrationserhöhung ist allerdings lokal und systemisch in Folge eines Gefäßverschlusses möglich (16). Das von Endothelzellen gebildete t-PA hat eine Größe von etwa 72 kDa und besteht aus einer einzelnen Polypeptid-Kette. Diese einkettige Form kann durch mehrere körpereigenen Enzyme wie Plasmin und den aktivierten Gerinnungsfaktor 10 (Faktor X_a) durch limitierte Proteolyse in eine doppelkettige Form überführt werden. Die einkettige Form ist unter *in vitro* Bedingungen in Abwesenheit von Fibrin deutlich geringer katalytisch aktiv als die doppelkettige. In Anwesenheit von Fibrin kommt es allerdings zur Steigerung der katalytischen Aktivität der einkettigen Form, sodass zwischen beiden Formen kein signifikanter Unterschied mehr besteht. Das lässt sich dadurch erklären, dass t-PA, ähnlich wie Plasminogen, die Fähigkeit besitzt an Fibrin zu binden. Durch die Bindung an Fibrin kommt es insgesamt zu einer 400-fachen Affinitätserhöhung. Die Möglichkeit durch limitierte Proteolyse von einer ein- in eine doppelkettige Form überführt zu werden, ist typisch für Serinproteasen. Im Vergleich zu anderen Serinproteasen ist t-PA jedoch sowohl in der ein-, als auch der doppelkettigen Form katalytisch aktiv (16). Die Polypeptidkette von t-PA lässt sich

in eine schwere und eine leichte Kette unterteilen. Die schwere Kette weist dabei einige besondere Domänen mit spezifischen Funktionen auf. Die N-terminal gelegene Fingerdomäne von t-PA ist verantwortlich für die Bindung an Fibrin und die Interaktion mit membranständigen Rezeptoren wie z.B. dem *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1* (LRP1). Die von N-terminal gesehene zweite Domäne ist die "*Epidermal Growth Factor-like Domain*" (EGF-Domäne). Sie weist große Ähnlichkeit zum EGF auf und kann den zugehörigen Rezeptor aktivieren. Darauf folgen die zwei Kringle Domänen K1 und K2, deren genaue Funktion bisher nicht bekannt ist. Es wird vermutet, dass K2 für die Bindung an Substrate und Rezeptoren wie den *N-Methyl-D-Aspartat* (NMDA) Rezeptor essentiell ist. Die leichte Kette von t-PA dagegen besteht aus einer einzigen großen Domäne, die das katalytische Zentrum enthält (15). Unter physiologischen Bedingungen ist t-PA in unterschiedlichen Konzentrationen sowohl in Endothelzellen, als auch fast allen weiteren Organen nachweisbar. Im Gehirn kann t-PA hauptsächlich in Neuronen nachgewiesen werden, wobei die Menge je nach Hirnregion variiert. Im Allgemeinen kann t-PA fast allen Neuronen innerhalb des Hirns vorkommen. Die t-PA exprimierenden Neurone sind vor allem im gesamten Neokortex, in verschiedenen Kerngebieten des Thalamus, im limbischen System, dem Mesencephalon, in Teilen des Kleinhirns, dem Hirnstamm und Rückenmark, dem Hippocampus und den endokrinen Drüsen des Hirns lokalisiert. Neben Neuronen wird t-PA in geringerem Ausmaß unter physiologischen Bedingungen auch in Astrozyten und Mikroglia exprimiert (19). Die Expression von t-PA ist dabei je nach Zelltyp und Lokalisation der Zellen im Hirn variabel und unterliegt diversen regulatorischen Faktoren. Unter *in vitro* Bedingungen konnte beispielsweise eine gesteigerte Expression unter entzündlichen Bedingungen in Anwesenheit von Entzündungsmediatoren nachgewiesen werden. Zu diesen Mediatoren zählen Thrombin, Histamin und Sauerstoffradikale (18). Neben einer variablen Expression spielt aber vor allem die Freisetzung von t-PA aus Vesikeln eine wichtige Rolle für kurzfristige Änderungen der lokalen Konzentration. Es konnte gezeigt werden, dass der *Plättchenaktivierende Faktor* (PAF), sowie Bradykinin über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration eine Freisetzung von t-PA auslösen können. Neben t-PA wurde auch eine Freisetzung des *van Willebrands Faktor* (vWF), einem gerinnungsfördernden Faktor der Gerinnungskaskade beobachtet. Auch nach Injektion anderer Faktoren der Gerinnungskaskade konnte *in vivo* eine bis zu 100-fache Erhöhung der lokalen t-PA Konzentration gemessen werden. Diese Beobachtungen legen nahe, dass t-PA intrazellulär gespeichert wird. Diese t-PA Speicher sind hauptsächlich in Endothelzellen, sowie den Endigungen sympathischer Fasern zu finden. Neben der beschriebenen kalziumabhängigen Exozytose von Vesikeln konnte auch eine bradykinin- und phenylephrinabhängige Freisetzung von t-PA aus vaskulären sympathischen Endigungen beobachtet werden (20). Ebenso konnte eine t-PA Freisetzung durch Vesikelexozytose nach Depolarisation kortikaler Neurone nachgewiesen werden (21). Im Blut zirkuliert neben t-PA auch der t-PA spezifische Inhibitor *Plasminogen Activator Inhibitor* (PAI-1). Er bildet mit frei zirkulierendem t-PA Komplexe und beeinträchtigt dadurch seine katalytische Aktivität. Es besteht ein dynamisches Gleichgewicht der Konzentrationen von t-PA und PAI-1, da viele Stimuli, die eine t-PA Sekretion bewirken zugleich Einfluss auf die PAI-1 Konzentration haben (16, 22). Insgesamt wird die Aktivität von t-PA also sowohl durch eine dynamische Expression und Freisetzung, als auch variable Konzentrationen des PAI-1 reguliert (20). Neben dem PAI-1 wirken auch die sogenannten Neuroserpine als t-PA Inhibitoren. Sie liegen lediglich im ZNS vor und haben dort regulatorische Funktionen (19). Das therapeutisch genutzte rt-PA hat mit 63-65 kDa im Vergleich zum endogenen t-PA ein geringeres *Molekulargewicht* (Mol wt). Dieses geringere Gewicht ist auf eine andere Glykosylierung während der Synthese zurückzuführen. rt-PA liegt zu etwa 80 % in der einkettigen Form vor und hat eine *Halbwertszeit* (HWZ) von 3,6 - 4,6 min im Blutplasma. Die gesamte HWZ liegt bei 39-53 min. Der Effekt von t-PA geht allerdings über diese HWZ hinaus. Verantwortlich dafür sind die Interaktion mit Fibrin und vor allem die Wirkung des in seine aktive Form überführten Plasmins. Die Aufnahme aus dem Blutstrom, sowie die anschließende Verstoffwechslung von t-PA findet

hauptsächlich in der Leber statt. Dementsprechend konnte *in vivo* eine verlängerte HWZ bei Umgehung der Leber gezeigt werden (16, 23). Die HWZ eines zirkulierenden t-Pa/PAI-1-Komplexes ist mit etwa 5 min länger als die des freien t-PA. Es besteht ebenfalls ein Unterschied der Aufnahme von t-PA und t-PA/PAI-1-Komplexen in die Leber. Schätzungsweise 89 % des aktiven, frei vorliegenden t-PA werden beim Durchfluss durch die Leber aus dem Plasma entfernt, wohingegen nur etwa 48% der t-PA/PAI-1-Komplexe von Hepatozyten aufgenommen werden. In klinischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit einer höheren Plasmaaktivität des PAI-1 die t-PA Aufnahme aus dem Blut in die Leber verlangsamt war. Im Anschluss an die Injektion eines t-PA Bolus kommt es zu einer Verminderung der Konzentration von freiem PAI-1 im Blut. Diese Beobachtung zeigt, dass der PAI-1 vermutlich freies t-PA binden kann und im Anschluss daran als Komplex mit t-PA aus dem zirkulierenden Blut entfernt wird. An der t-PA Aufnahme aus dem Blut in die Leber scheinen der Mannoserezeptor, sowie der LRP1-Rezeptor beteiligt zu sein. Der Mannoserezeptor nimmt dabei hauptsächlich das freie t-PA, LRP1 hingegen freies und an PAI-1 gebundenes t-PA auf (24–28). Nach der Aufnahme in Hepatozyten kommt es zum lysosomalen Abbau von t-PA (23). Im Hirngewebe bestehen darüber hinaus weitere Mechanismen zur Regulation der t-PA Konzentration. Astrozyten können ebenfalls LRP1-abhängig t-PA aus dem synaptischen Spalt oder dem Extrazellularraum aufzunehmen (15, 21).

2.2.2 Physiologische Funktion

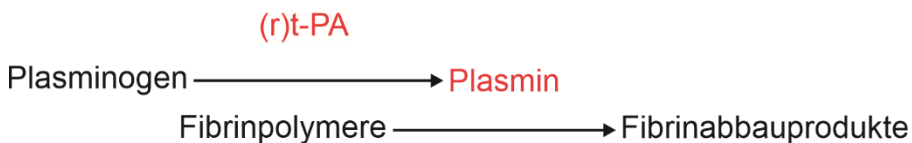


Abbildung 3: Schematische Abbildung der Wirkung von (r)t-PA
Enzymatische aktive Formen in Rot geschrieben.

t-PA wurde als körpereigenes Enzym entdeckt, das die Fähigkeit besitzt, Blutgerinnsel aufzulösen. Durch diese Wirkung trägt t-PA entscheidend zur Offenhaltung der Blutgefäße bei. Der Stellenwert von t-PA für diese Prozesse konnte dabei im Tiermodell gezeigt werden. Bei t-PA Knockout Mäusen verlief die Auflösung von Thromben im Vergleich zu t-PA wildtypischen Tieren deutlich verlangsamt (20). Zusätzlich zu einer verlangsamt Auflösung bereits entstandener Thromben konnte man bei t-PA defizienten Tieren ohne Anzeichen einer Entzündung oder anderer thrombosebegünstigender Faktoren auch eine höhere Rate der spontanen Thrombenbildung gegenüber wildtypischen Tieren beobachten (29). Neben dieser zuerst beschriebenen Funktion von t-PA konnten nach intensiver Forschung vielfältige weitere Funktionen beschrieben werden. Man kann dabei Effekte unterscheiden, die durch die enzymatische t-PA Wirkung, eine Interaktion von t-PA mit Rezeptoren, oder die Aktivierung von Plasmin und dessen enzymatische Aktivität vermittelt werden (19). Eine direkten Interaktion von t-PA und Rezeptoren wurden in den letzten Jahren vor allem im ZNS beschrieben. Eine Beteiligung von t-PA konnte dabei an diversen Prozessen, die sich von der embryonalen Entwicklung, über Lernprozesse und Einflüsse auf das Verhalten bis hin zu neuronalen Regenerationsprozessen erstrecken. In der embryonalen Entwicklung ist t-PA in hohen Konzentrationen im Hirn exprimiert. Es ist maßgeblich an der Migration von Neuronen beteiligt. In t-PA Knockout-Mäusen konnte dementsprechend eine verlangsamt neuronale

Migration nachgewiesen werden (15). Eindrucksvoll zeigte sich das am Beispiel migrierender Neurone während der Kleinhirnentwicklung. In der Kleinhirnentwicklung migrieren die Neurone (Körnerzellen) innerhalb des Kleinhirns ausgehend von der Molekularschicht (Stratum moleculare) in die Körnerzellschicht (Stratum granulosum). *in vivo* zeigte sich bei t-PA Knockout-Mäusen eine bei insgesamt gleicher Neuronenzahl verlangsamte neuronale Migration im Vergleich zur t-PA wildtypischen Mäusen (30). Auch bei weiteren wichtigen Entwicklungsschritten wie der Angiogenese und der zellulären Differenzierung konnte eine Abhängigkeit von t-PA nachgewiesen werden. Im Rahmen der Angiogenese konnte eine Stimulation der t-PA Freisetzung durch den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und den *Basic Fibroblast Growth Factor* (BFGF) stimuliert, die maßgeblich an der Angiogenese beteiligt sind. Eine t-PA Beteiligung konnte dabei nicht nur in gesunden Geweben, sondern auch bei Tumorzellen gezeigt werden. Auch konnte ein direkter Zusammenhang zwischen t-PA Expression und Angiogenese bei Tumorzellen gezeigt werden. t-PA defiziente Tumorzellen zeigten dabei *in vitro* verlangsamtes Wachstum. Die zelluläre Differenzierung wird unter anderem durch von der Retinsäure (Vitamin A) abgeleitete Stoffe, sog. Retinoide, reguliert. In einer Vielzahl verschiedener Zellen konnten Retinoide auch die t-PA Expression steigern. Dieser Zusammenhang legt eine Beteiligung von t-PA an diesen Differenzierungsprozessen nahe (20). Abgesehen von Entwicklungsprozessen konnten auch neuroprotektive Effekte von t-PA wie die Freisetzung von Überlebenssignalen und antiapoptotischer Faktoren nachgewiesen werden (15). Auch abseits von regenerativen und Entwicklungsprozessen konnten wichtige Funktionen von t-PA identifiziert werden. t-PA beeinflusst so auch Lernprozesse und das Verhalten. Entscheidend an solchen Vorgängen ist die *Langzeit Potenzierung* (LTP) beteiligt. Im Rahmen der LTP kommt es zu einer vermehrten synaptischen Übertragung als Reaktion auf eine Vermehrte Bildung von Aktionspotenzialen. Die Aktionspotentiale können dabei durch vermehrte Stimulation eines Neurons durch chemische oder elektrische Reize ausgelöst werden. Die LTP liefert damit die Grundlage für die Anpassung und den Umbau neuronaler Funktionen und Netzwerke. Diese durch die LTP ermöglichte Anpassung neuronaler Netzwerke wird auch synaptische Plastizität genannt. Die LTP spielt eine Schlüsselrolle bei Lernprozessen (15). t-PA Knockout-Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine verminderte LTP, t-PA überexprimierende Mäuse dagegen eine vermehrte LTP. Das Ausmaß der Verstärkung der LTP korreliert dabei mit dem Ausmaß der t-PA Überexpression. Entsprechende Mäuse zeigten in Tests zur Lernfähigkeit signifikant bessere Ergebnisse als die t-PA wildtypischen Kontrollgruppe (31). Über die vermehrte LTP konnte bei t-PA überexprimierenden Tieren hinaus konnte sogar eine insgesamt gesteigerte synaptische Aktivität beobachtet werden. In t-PA defizienten Mäuse ließen sich die Beeinträchtigung der LTP durch die Gabe von t-PA verringert. t-PA scheint daher durch direkte Interaktion mit einem Rezeptor Einfluss auf die LTP zu nehmen. Ein Möglicher Interaktionspartner von LRP1 könnte dabei der LRP1 Rezeptor sein. Durch die Blockade von LRP1 ließen sich die positiven Effekte einer Gabe von t-PA auf die LTP aufheben (32). Synaptische Plastizität und LTP sind auch beim Erlernen neuer Bewegungsabläufe beteiligt. t-PA ist auch für diese Form des Lernens von Bedeutung, sodass t-PA Knockout-Mäuse ein im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verlangsamtes Bewegungslernen zeigten. Interessanterweise ließ sich eine solche Beeinträchtigung auch bei wildtypischen Tieren durch eine Injektion mit dem t-PA Inhibitor PAI-1 induzieren. Diese Beobachtung legt nahe, dass die t-PA Effekte auf Lernprozesse vom Vorliegen von freien, katalytisch aktivem t-PA abhängen (25). Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass Mäuse, denen PAI-1 injiziert wurde, genauso langsam wie t-PA Knockout-Mäuse lernten. Bei einer genaueren Untersuchung des Hirns während dem Erlernen neuer Aufgaben konnten vor allem regionale Veränderungen der t-PA Expression beobachtet werden. So konnte bei Mäusen etwa 30-60 min nach Beginn des Trainings eine Steigerung der Expression der t-PA mRNA im Bereich des Kleinhirns festgestellt werden (33). Eine für Lernprozessen und Gedächtnisfunktionen entscheidende Hirnregion ist der Hippocampus. Es konnten Hinweise darauf gefunden

werden, dass auch hippocampale Leistungen t-PA-abhängig sind. Analog zum Bewegungslernen zeigten sich hippocampus-abhängige Lernprozesse in t-PA Knockout-Mäusen beeinträchtigt. Die Lernfähigkeit zeigte sich dabei insgesamt erhalten, im Vergleich zu wildtypischen Tieren jedoch verlangsamt. Auch im Fall dieser speziellen Lernprozesse eignete sich eine Injektion von t-PA dazu, eine durch t-PA Mangel hervorgerufene Verlangsamung auszugleichen. Die Wiederherstellung der Lernfähigkeit ist ebenfalls von katalytisch aktivem, frei vorliegendem t-PA abhängig, da eine Gleichzeitige Injektion von t-PA und PAI-1 zu keiner Verbesserung der Lernleistung führte. Analog zur LTP finden sich Hinweise auf eine Beteiligung von LRP1 an diesen t-PA vermittelten Effekten. Nicht vollständig geklärt ist das Ausmaß indirekter t-PA Effekte von durch t-PA aktivierten Enzymen. Eine alleinige Injektion von Plasmin hatte so ebenfalls einen positiven Effekt auf die Lernfähigkeit. Im Gegensatz zu den beschriebenen Lernprozessen erscheint die Konsolidierung des Gedächtnisses, sowie das Umsetzen bereits erlernter Bewegungsabläufe t-PA unabhängig abzulaufen (34). Die genauen Mechanismen, über die t-PA LTP und synaptische Aktivität beeinflusst ist nicht abschließend aufgeklärt. Eine Möglichkeit dieser Beeinflussung ist die Fähigkeit von t-PA, den Vorläufer des *Brain-derived Neurotrophic Factors* (BDNF) in seine aktive Form umzuwandeln. Aktuell wird eine Beeinflussung der LTP durch den BDNF diskutiert (25). Während die bisher behandelten Lernprozesse hauptsächlich in Hippocampus und Kleinhirn ablaufen, finden sich weitere lernähnliche Prozesse auch in der Amygdala. Sie ist wesentlich an der psychologischen und physiologischen Stressreaktion und der Verarbeitung von Angst beteiligt. Direkt anschließend an eine im Tier ausgelöste Stressreaktion ließen sich bis zu vierfach erhöhte Konzentrationen, sowie eine gesteigerte enzymatische Aktivität von t-PA nachweisen. Im Anschluss an die Exposition gegenüber Stress finden in der Amygdala neuronale Umbauprozesse statt. In t-PA Knockout-Mäusen konnte dieser Umbau im Vergleich mit Wildtyp-Tieren nicht festgestellt werden (22). Dementsprechend zeigen t-PA Knockout-Mäuse gegenüber wildtypischen Tieren veränderte Verhaltensweisen und veränderte Reaktionen auf Stress und Angst. In Korrelation zu Unterschieden im Verhalten konnten auch unterschiedliche Konzentrationen von Hormonen, die im Rahmen einer Stressreaktion oder Angst freigesetzt werden zwischen t-PA Knockout und Wildtyp Tieren gemessen werden (25). Die t-PA Wirkung in der Amygdala scheint wie auch in anderen Hirnarealen von katalytisch aktivem t-PA abzuhängen. Versuchstieren mit normaler t-PA Expression und gesteigerter PAI-1 Aktivität zeigten ähnliche Verhaltensauffälligkeiten wie t-PA Knockout-Tiere (15). Auf zellulärer Ebene spielt für die angeführten Lernvorgänge und die damit verbundene LTP der NMDA Rezeptor eine wichtige Rolle. Er ist im gesamten ZNS exprimiert, in besonders hohen Konzentrationen in Hippocampus und Großhirn. Bei Bindung von Glutamat an den NMDA Rezeptor kommt es unter anderem zu einem Kalziumeinstrom in die Zelle. Eine regulatorische Wirkung von t-PA auf den NMDA Rezeptor konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden. In Anwesenheit von t-PA nimmt dieser Kalziumeinstrom in die Zelle zu (21, 35). Die Interaktion von t-PA und dem NDMA Rezeptor findet vermutlich an der NR1-Untereinheit des Rezeptors statt (32). Der genau Mechanismus ist nicht vollständig geklärt, es wird allerdings vermutet, dass t-PA die NR1-Untereinheit des NMDA Rezeptors spalten und so den Kalziumeinstrom regulieren kann (25). Im Zusammenhang mit einem verstärkten Kalziumeinstrom kann es allerdings auch zu einer Zellschädigung kommen. Dieser Vorgang wird auch Exzitotoxizität genannt. Eine exzitotoxische Wirkung von t-PA ist Gegenstand aktueller Forschung. Inhibition der enzymatischen Aktivität von t-PA kann die NMDA modulierenden Effekte unterbinden. Die regulatorische Wirkung von t-PA auf den NMDA Rezeptor scheint also ebenfalls von enzymatisch aktivem t-PA auszugehen. Neben einer direkten Beeinflussung des NMDA Rezeptors könnten die beobachteten Effekte auch LRP1-vermittelt sein. LRP1-abhängige Modulationen des NMDA Rezeptors konnten bereits für andere Liganden von LRP1 gezeigt werden. Bei diesen Liganden handelt es sich um alpha-2-Makroglobulin, Lactoferrin und Apo-ε-4 (32). t-PA ist auch an einer Vielzahl entzündlicher Prozesse und deren Regulation beteiligt. Eine t-PA abhängige Aktivierung von Makrophagen

konnte gezeigt werden. Aktivierte Makrophagen können ihrerseits wiederum t-PA freisetzen und damit zur Rekrutierung neuer Makrophagen beitragen. Dieser Effekt kann durch Gabe eines spezifischen t-PA Antikörpers inhibiert werden (36). Im Rahmen einer t-PA vermittelten Aktivierung von Mikroglia kommt es auch zu einer gesteigerten Freisetzung und Aktivität von MMPs. Auch dieser Effekt ist zwischen t-PA Knockout- und Wildtyp-Mäusen unterschiedlich stark ausgeprägt. Er zeigte sich im Vergleich zu wildtypischen Tieren bei t-PA Knockout-Mäusen vermindert. Auch die Beeinflussung von entzündlichen Prozessen durch t-PA scheint von einer Interaktion von t-PA und LRP1 abhängig zu sein. Abgesehen von lokalen und kurzfristigen Änderungen der t-PA Konzentration kann auch eine veränderte Expression von t-PA in entzündetem Gewebe nachgewiesen werden. Die Entzündungsmediatoren *Tumornekrosefaktor α* (TNF- α), sowie verschiedene *Interleukine* (IL) können dabei die t-PA Expression verändern (20). Makrophagen sind neben ihrer Wirkung in entzündlich verändertem Gewebe auch an regenerativen Prozessen wie der Regeneration nach Nervenschädigungen beteiligt. Als Reaktion auf axonale Schädigungen kommt es zur Invasion von im Blut zirkulierenden Monozyten, die sich im Gewebe zu Makrophagen differenzieren. Sie bauen die nach einer Nervenschädigung anfallenden Myelintrümmer, sowie die umgebene EZM ab und induzieren eine Schwannzellproliferation. Auch sind sie dazu in der Lage, durch neurotrophe Faktoren das Wachstum von Nerven anzuregen. t-PA ist für die Migration von Makrophagen im Gewebe essentiell und kann darüber hinaus die Freisetzung von Mediatoren aus Makrophagen regulieren. Nach Nervenschädigungen in sensiblen Nerven ist eine Erhöhung der lokalen Konzentration von t-PA zu beobachten. Neben dem endogenen t-PA ist auch exogenes t-PA dazu in der Lage, die Migration von Makrophagen in geschädigte Nerven zu stimulieren. Durch eine Behandlung mit t-PA kann bei gleichbleibender Leukozytenzahl eine gesteigerte Makrophageninfiltration in geschädigte Nerven erreicht werden. Die Infiltration von geschädigtem Nervengewebe durch Makrophagen ist ein entscheidender Schritt in der anschließenden Regeneration. t-PA Knockout-Mäuse zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine schlechtere Regenerationsfähigkeit geschädigter Nerven und damit eine schwerere langfristige Schädigung nach einer Verletzung. Ein wichtiger durch t-PA vermehrt freigesetzter Mediator ist die MMP9. Bei fehlender t-PA Expression konnte eine verminderte Expression der MMP9 festgestellt werden. Die MMP9 ist im Kontext regenerativer Prozesse ähnlich wie t-PA an der Makrophagenmigration beteiligt. Eine Hemmung der MMP9 in t-PA Wildtyp-Makrophagen führte dabei zu ähnlichen Beeinträchtigungen der Makrophagenfunktion wie bei Knockout-Mäusen. Eine MMP9-abhängige Regulation der Makrophagenfunktion durch t-PA erscheint demnach wahrscheinlich. Zudem ist die MMP9 wesentlich an der Umstrukturierung der EZM nach Gewebsschädigung beteiligt. (37). Auch wird die Rolle von Plasmin, das durch die vermehrte t-PA Freisetzung und Expression ebenfalls im entzündlichen Gewebe gehäuft anfällt, diskutiert (18). Einen Sonderfall stellen Entzündungsreaktionen, die innerhalb des ZNS lokalisiert sind dar. Neben lokalen Veränderungen der t-PA Aktivität im Gewebe, kommt es bei entzündlichen Erkrankungen des Gehirns zusätzlich zu einer vermehrten t-PA Aktivität im Liquor (19). Die Immunabwehr des Gehirns ist im Allgemeinen in erster Linie auf Mikroglia angewiesen. Die Mikroglia besteht aus den hirneigenen Gewebsmakrophagen. Auch ihre Aktivierung und sogar die Reaktion auf Entzündungsmediatoren sind t-PA Abhängig. Sowohl die Mikroglia selbst, als auch Neurone sind dazu in der Lage, durch veränderte t-PA Sekretion und Expression die Mikrogliaaktivierung zu regulieren. Diese Regulation kann bei t-PA Knockout-Mäusen nicht beobachtet werden, jedoch durch Zugabe von exogenem t-PA wiederhergestellt werden. Die Mikroglia kann unter physiologischen Bedingungen Entzündungsmediatoren freisetzen. In Anwesenheit von t-PA kommt es zu einer vermehrten Freisetzung. Die Effekte auf die Mikroglia werden dabei vermutlich über eine Bindung der Fingerdomäne von t-PA an das auf der Zelloberfläche exprimierte Protein Annexin II vermittelt. Im Falle einer Gewebeschädigung im Hirn ist die t-PA Freisetzung und damit das Ausmaß an Mikrogliaaktivierung abhängig vom Ausmaß der Verletzung. Neben der Aktivierung durch Entzündungsmediatoren kann auch eine Mikrogliaaktivierung durch die Injektion von

Glutamatrezeptor Agonisten im Tiermodell beobachtet werden. Auch dieser Effekt ist in t-PA Knockout-Mäuse abgeschwächt (36). Neben den zahlreichen und diversen direkten Effekten von t-PA sind mögliche indirekte Folgeeffekte noch Gegenstand der Forschung. Während t-PA spezifisch für sein Substrat Plasminogen ist, konnten für das aktive Plasmin mehrere, weniger spezifische Substrate identifiziert werden. Zu diesen Substraten zählt eine Vielzahl verschiedener Proteine wie Matrix- und Adhäsionsproteine, die durch Plasmin proteolytisch gespalten werden können. Plasmin kann seinerseits auch die proinflammatorischen Proenzyme Prokollagenase, Progelatinase und Prourokinase in ihre aktiven Formen umwandeln (18).

2.3 Die LDL-Rezeptor Genfamilie

Die *Low Density Lipoprotein Rezeptor* (LDLR) Genfamilie besteht aus strukturell eng verwandten, in der Zellmembran lokalisierten Oberflächenrezeptoren. Namensgebend ist der zuerst entdeckte Vertreter, der LDL Rezeptor. Die ursprünglich entdeckte Funktion der LDL Rezeptoren ist die zelluläre Aufnahme von Lipoproteinen über Endozytose. Typischerweise binden die entsprechenden Lipoproteine zunächst den an der Zelloberfläche lokalisierten Rezeptor und werden dann endozytotisch in die Zelle aufgenommen. Nach der Endozytose der Lipoproteine kommt es zur Aufnahme des Rezeptor-Liganden-Komplexes in ein Lysosom und schließlich durch Änderung des pH-Wertes zur Dissoziation von Rezeptor und Ligand. Während der Ligand weiter abgebaut werden, kann der Rezeptor recycelt und zurück an die Zelloberfläche transportiert werden. Neben ihrer Funktion als endozytotische Rezeptoren sind Mitglieder der LDL Rezeptorfamilie auch an vielfältigen regulatorischen Prozessen, sowie der zellulären Signalübermittlung beteiligt (38, 39). Insgesamt sind 7 Vertreter bekannt: Der LDL-Rezeptor, *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) Rezeptor, *Apolipoprotein E2* (ApoE2) Rezeptor, *Epidermal Growth Factor* (EGF) Rezeptor, LRP 1, LRP 1b und Megalin. Diese Vertreter lassen sich in zwei Untergruppen mit niedrigem (LDLR, VLDLR, ApoE2R, EGFR) oder hohem Molekulargewicht (Megalin, LRP1, LRP1b) einteilen (40). Alle Mitglieder der LDLR Genfamilie enthalten an ihrer C-terminalen, zytoplasmatisch gelegenen Seite eine Sequenz, die für die Endozytose von Liganden verantwortlich ist. Sie besteht aus einer oder mehreren Wiederholungen des sogenannten NPxY Motivs, welches aus der Aminosäurefolge von Asparagin, Prolin, x und Tyrosin besteht, wobei x für eine beliebige Aminosäure steht (40). Der Mittelteil der LDLR wird gebildet durch eine dem EGF ähnliche Domänen. Sie bestehen je aus zwei 40-50 Aminosäuren langen, cysteinreichen Wiederholungen vom EGF-Typ, gefolgt von je 40-50 Aminosäuren langen cysteinarmen, sog. YWTD Wiederholungen (β -Propeller Domäne). Dieser Teil des Rezeptors ermöglicht die Dissoziation eines gebundenen Liganden ans Endosom bei saurem pH (41). An der aminoterminalen Seite enthalten die LDLR cysteinreiche Wiederholungssequenzen, die eine Ausstattung mit 3 Disulfidbrücken gekennzeichnet sind. Diese cysteinreichen Sequenzen sind verantwortlich für die spezifische Bindung von Liganden (40). Die Ligandenbindung wird dabei hauptsächlich über die Wechselwirkung von in den ligandenbindenden Domänen liegenden negativen Ladungen und positiven Ladungen der Liganden gewährleistet. Ein weiteres Charakteristikum der LDLR ist neben der Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken auch ein eingeschlossenes Kalziumion. Disulfidbrücken und Kalziumion sind entscheidend für die Stabilität des Rezeptors. Durch Spaltung der Disulfidbrücken oder Entfernung des Kalziums durch Metallchelatoren können die Rezeptoren destabilisiert werden (41).

2.3.1 Lipoprotein Receptor-related Protein 1

LRP1 und Megalin sind die größten Vertreter der LDLR Genfamilie. Im Vergleich zum LDLR besitzt LRP1 eine größere Anzahl ligandenbindender Wiederholungssequenzen und ist daher in der Lage, über 40 strukturell verschiedene Liganden zu binden (42). Neben seiner Funktion als endozytotischer Rezeptor ist auch LRP1 an der zellulären Signalübermittlung beteiligt. Dabei hat es gewebsspezifisch unterschiedliche Funktionen. Besonders innerhalb des ZNS hat es wichtige regulatorische Funktionen (43).

2.3.2 Charakteristika

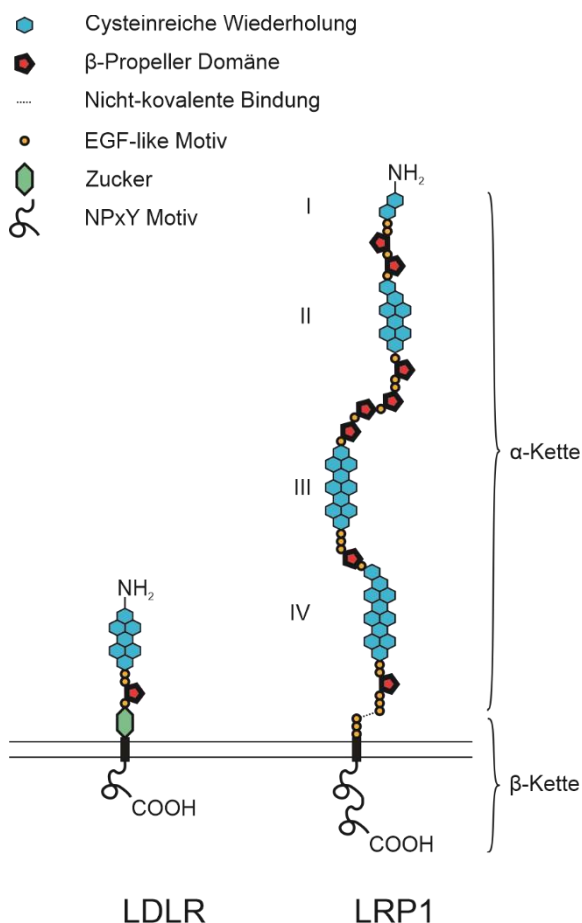


Abbildung 4: Struktur LRP1

Schematische Abbildung der Struktur des LDLR als erst beschriebenen Vertreter der LDLR-Familie im Vergleich zu LRP1. α- und β-Kette von LRP1 sind über eine nicht-kovalente Bindung miteinander verbunden. Die β-Kette enthält die Transmembrandomäne, wohingegen die α-Kette komplett extrazellulär lokalisiert ist. Abbildung in abgewandelter Form aus (41, 44, 45).

LRP1 besteht aus 2 nicht-kovalent gebundenen Proteinketten: Der 85 kDa großen Transmembran- oder β-Kette und der 515 kDa großen extrazellulär gelegenen α-Kette. Wie bei anderen Mitgliedern der LDLR Genfamilie ist die NPxY Domäne am C-terminalen Ende für die Endozytose entscheidend (42). Die α-Kette von LRP1 enthält insgesamt 4 ligandenbindende Domänen aus je 2, 8, 10, und 11 cysteinreichen Wiederholungen vom komplement-typ, sowie mehreren Wiederholungen vom EGF-typ (46). Die einzelnen Domänen von LRP1 weisen eine unterschiedliche Dichte negativer Ladungen und hydrophober Anteile

vor. Auf diese Weise kann LRP1 diverse Liganden an unterschiedlichen Stellen spezifisch binden (47). LRP1 wird als 600 kDa großes Vorläuferprotein am rauen *endoplasmatischen Retikulum* (ER) synthetisiert, von dem Enzym Furin prozessiert und anschließend über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert (42). An der LRP1 Synthese ist zudem ein spezialisiertes Chaperon, das *Receptor Associated Protein* (RAP) benötigt. RAP hat ein Molekulargewicht von 39 kDa und besitzt mindestens zwei, möglicherweise sogar drei spezifische Bindungsstellen für LRP1. Es kann dabei sowohl an verschiedenen Stellen einer, als auch an zwei benachbarte Proteinketten binden (45, 46, 48). Während der LRP1 Synthese ist es dazu in der Lage, LRP1 an den ligandenbindenden Domänen zu blockieren und verhindert somit eine Bindung an intrazelluläre Strukturen vor dem Transport an die Zelloberfläche. Der Komplex aus LRP1 und RAP wird vom ER an den Golgi-Apparat weitergeleitet, wo er dissoziiert. Anschließend wird LRP1 an die Zelloberfläche transportiert und RAP wird im ER recycelt. Die Schlüsselrolle von RAP in der LRP1 Synthese konnte bei RAP Knockout-Mäusen beobachtet werden. In diesen Tieren war die LRP1 Expression deutlich reduziert. Durch das Fehlen von RAP kommt es zu einer vermehrten intrazellulären Bindung des unreifen LRP1, sodass nur wenige funktionsfähige Rezeptoren an die Zelloberfläche transportiert werden können. Die Expression von RAP variierte dabei zwischen unterschiedlichen Geweben. Dementsprechend waren die Beobachteten Effekte des RAP Knockouts gewebsspezifisch unterschiedlich stark ausgeprägt (49). Entscheidend für die Ligandenbindung sind wie bei den anderen Vertretern der LDLR Genfamilie die cysteinreichen Wiederholungen von Komplement-typ, die bei LRP1 in den 4 ligandenbindenden Domänen auftreten. Üblicherweise wurde die Ligandenbindung an LRP1 an Rezeptorfragmenten mit vereinzelt Domänen untersucht. Einige Liganden, deren Bindung an ein intaktes LRP1 gezeigt werden konnte, konnten keine einzelnen Domänen binden, was darauf hinweist, dass es neben der Bindung an die Domänen auch allosterische Effekte in der Interaktion von LRP1 und seinen Liganden gibt (50). Die meisten bekannten Liganden von LRP1 binden an die Domänen II und IV, die in großen Teilen identisch aufgebaut sind und vergleichbare Eigenschaften besitzen (45, 48). Es konnte bisher keine Ligandenbindung an die Domäne I nachgewiesen werden. Domäne III bindet nur wenige Liganden (48). LRP1 ist in vielen Geweben des Körpers unterschiedlich stark exprimiert. Die höchsten Konzentrationen können in Leber, Lunge, Gehirn, Darm und Muskeln nachgewiesen werden (51). Im peripheren Gewebe ist es hauptsächlich in Hepatozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Neuronen, sowie glatter Muskulatur der Blutgefäße exprimiert (45). Die genaue Verteilung und vor allem die Dynamik der LRP1 Expression im ZNS ist nicht abschließend geklärt. Viele Erkenntnisse konnten lediglich *in vitro*, nicht aber *in vivo* gewonnen werden (43). Allerdings konnte LRP1 in nahezu allen Neuronen des ZNS nachgewiesen werden (52). Auch konnte es in den Zellen, die an der Ausbildung der BHS beteiligt sind nachgewiesen werden (50). Besonders hohe Konzentrationen konnten dabei in Kapillaren und Perizyten festgestellt werden (53). Neben Neuronen und den Zellen der BHS ist LRP1 auch in der Mikroglia detektierbar (43). Die LRP1 Konzentration ist nicht nur zwischen verschiedenen Geweben und im Falle des Gehirns verschiedenen Hirnarealen unterschiedlich, sondern variiert auch zwischen der embryonalen Entwicklung und dem ausgewachsenen Gehirn. Besonders in frühen Entwicklungsstadien ist LRP1 in hohen Konzentrationen messbar. In späteren Phasen der Entwicklung kommt es dann zum Abfall der LRP1 Konzentration im Hirn (43). Des Weiteren unterliegt die LRP1 Expression weiteren Faktoren wie Hormone oder Wachstumsfaktoren (45).

2.3.3 Physiologische Funktion

Wie andere Vertreter der LDLR Genfamilie fungiert LRP1 als Endozytoserezeptor für Lipoproteine und ist damit am Lipidstoffwechsel beteiligt. Neben Lipoproteinen können auch andere Liganden LRP1-vermittelt durch Endozytose aufgenommen werden. Erstmals wurde LRP1 in der Leber nachgewiesen. Dort agiert es als Clearance-Rezeptor für Lipoproteine und verschiedene Plasmaproteine wie beispielsweise alpha2-Makroglobulin und den Gerinnungsfaktor VIII (45). In diesem Zusammenhang konnte auch festgestellt werden, dass LRP1 ein hepatischer Rezeptor für Chylomikronen Remnants ist. Nach der hepatischen Aufnahme von Chylomikronen wird diesen ApoE zugesetzt. ApoE vermittelt kann LRP1 dann die Chylomikronen Remnants binden und endozytotisch aufnehmen, wobei die genaue Rolle von LRP1 bei diesem mehrschrittigen Prozess nach wie vor nicht vollständig geklärt ist (54). Auch an der Aufnahme fettlöslicher Vitamine sind Lipoproteinrezeptoren beteiligt. Unter anderem wird Vitamin E in Chylomikronen gebunden und anschließend in der Leber durch Lipoproteinrezeptoren aufgenommen (55). Abgesehen von seiner Funktion als endozytotischer Rezeptor ist LRP1 an zahlreichen regulatorischen Prozessen beteiligt. LRP1 reguliert die Enzymaktivität verschiedener an der Blutgerinnung oder der Organisation der EZM beteiligter Enzyme. Auch ist LRP1 an der embryonalen Entwicklung und Angiogenese, sowie der zellulären Signalübermittlung beteiligt (42). Die EZM besteht aus Kollagenen, Proteoglykanen und Glykoproteinen und gewährleistet die Aufrechterhaltung der Zell- und Gewebsarchitektur. Im Rahmen vieler pathologischer Prozesse wie (neuro-) degenerativen Erkrankungen, oder auch einer Ischämie können Veränderungen in der EZM beobachtet werden (47). LRP1 ist ein wichtiger Rezeptor für die Zellmigration und -adhäsion. Es interagiert dabei mit den migrierenden Zellen und beeinflusst die umliegende EZM. Besonders im Hinblick auf Umbauprozesse der EZM spielt LRP1 somit eine Schlüsselrolle. Auch unabhängig von der Zellmigration kann LRP1 die Zusammensetzung der EZM beeinflussen (47, 52). So kann LRP1 ihre Zusammensetzung durch die Bindung und Endozytose von Proteinen der EZM verändern. Auch Effekte von LRP1 auf die Konzentrationen von Proteasen wie MMPs und ihren Inhibitoren konnten nachgewiesen werden. Proteasen liefern durch ihre Fähigkeit, Bestandteile der EZM zu spalten die Voraussetzung für Umbauprozesse der EZM. Besonders wichtig ist der Umbau der EZM in der embryonalen Entwicklung (38, 47, 50, 56). In Untersuchungen zur Funktion von LRP1 zeigte sich, dass konventionelle Knockout-Mäuse nicht überlebensfähig sind und bereits *in utero* versterben. Dieser Zusammenhang unterstreicht eindrücklich die besondere Rolle von LRP1 während der Embryonalentwicklung (38). Auch nach abgeschlossener Embryonalentwicklung ist LRP1 an der Angiogenese, sowie der Regulation des Gefäßstatus beteiligt. LRP1 reguliert dabei direkt die Permeabilität der BHS (47, 57). Diese Funktion ist dabei nicht nur auf Gefäße innerhalb des ZNS beschränkt. LRP1 ist ebenfalls wichtig für die Bildung und Instandhaltung von Blutgefäßen mittlerer und kleiner Größe. Mäuse mit einer LRP1-Defizienz im Bereich der Gefäße zeigen innerhalb der glatten Muskulatur der Blutgefäße eine abnorme Verdickung der Muskelschicht (52). Blutgefäße müssen unter physiologischen Bedingungen einer physikalischen Beanspruchung durch den Blutfluss standhalten. Die Integrität der Gefäßwände hat dabei eine besondere Bedeutung. Eine beschädigte Gefäßwand kann zu Pathologien wie der Bildung von Aneurysmata führen. Der Zustand der Gefäßwände wird von Faktoren wie Kollagen, Elastin, aber auch der Konzentration von Proteasen und deren Inhibitoren reguliert. Für die Integrität der Blutgefäße ist der *Platelet Derived Growth Faktor* (PDGF) ein wichtiger Mediator. LRP1 nimmt über die Interaktion mit dem PDGF Einfluss auf die Integrität von Blutgefäßen (50, 58). Neben der Regulation des PDGF hat LRP1 auch einen direkten Einfluss auf die glatte Muskulatur der Blutgefäße. Eine vermehrte Expression von LRP1 in diesen glatten Muskelzellen hat dabei einen vasoprotektiven Effekt. Der genaue Mechanismus ist allerdings nicht vollständig geklärt (58). Diese Zusammenhänge wurden zunächst an peripheren Blutgefäßen beobachtet,

Nikolakopoulou et al. könnten zuletzt allerdings feststellen, dass endotheliales LRP1 auch direkt die Permeabilität der BHS beeinflusst (57). Zusätzlich zu seiner regulatorischen Wirkung auf das Blutgefäßsystem interagiert LRP1 mit dem gerinnungsfördernden Gerinnungsfaktor VIII und kann durch dessen Aufnahme die Blutgerinnung modulieren (56). Die Regulatorische Funktion an Blutgefäßen ist nicht nur auf periphere Gefäße beschränkt, sondern findet sich auch im ZNS. Neben der Beteiligung an den Signalwegen des PDGFs im Bereich der glatten Muskulatur der Gefäße ist LRP1 besonders für zelluläre Signalwege im ZNS wichtig. Für dieser Prozesse ist eine Interaktion mit t-PA entscheidend. So ist die t-PA vermittelte Modulation des NMDA Rezeptors LRP1-abhängig. Dieser Zusammenhang spiegelt sich auch in der LTP wieder, die durch Modulation des NMDA Rezeptors beeinflusst werden könnte. Die LTP ist Voraussetzung für die synaptische Plastizität im Rahmen von Lernvorgängen. Versuchstiere mit einer LRP1-Defizienz im Bereich des ZNS zeigen interessanterweise einen veränderten Phänotyp, der vor allem mit einer Beeinträchtigung des Lernens einhergeht (43, 47, 59). Ebenfalls diskutiert wird eine LRP1-abhängige Exzitotoxizität am NMDA Rezeptor. Diese Toxizität kann möglicherweise über eine Aufnahme von t-PA aus dem Extrazellularraum verringert werden. Diese Aufnahme scheint ebenfalls LRP1-abhängig zu sein. t-PA vermittelte entzündliche Prozesse, die daraus folgende Mikrogliaaktivierung und schließlich die Freisetzung von MMPs sind ebenfalls LRP1-abhängig (43, 47, 60).

2.4 Interaktion von t-PA und LRP1

Sowohl t-PA, als auch LRP1 besitzen vielseitige physiologische Funktionen. Einige der bisher beschriebenen Prozesse wie die LTP ist sogar eine Interaktion beider Partner entscheidend. Neben ihren physiologischen Funktionen sind t-PA und LRP1 auch an einer Reihe pathologischer Prozesse, allen voran Pathologien des ZNS, beteiligt. Auch die im Rahmen eines ischämischen Schlaganfalls beobachteten Prozesse sind zum Teil von der Interaktion von t-PA und LRP1 abhängig (17). Aufgrund der Häufigkeit von ischämischen Schlaganfällen sind gerade die Interaktionen von t-PA und LRP1 im ZNS Gegenstand aktueller Forschung. Zentrales Element in der Pathologie des ischämischen Schlaganfalls ist die Schädigung und der daraus resultierende Zusammenbruch der BHS. Im Allgemeinen ist das Ausmaß der Schädigung der BHS wesentlich von bereits vorhandenen Grunderkrankungen abhängig. In einem Tiermodell, bei dem die untersuchten Tiere zuvor an einem erhöhten Blutdruck litten, konnte beispielsweise eine schwerwiegendere Schädigung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit normalem Blutdruck gezeigt werden (61). Welchen Anteil die Wechselwirkungen von t-PA und LRP1 über solche individuellen Faktoren hinaus haben wird kontrovers diskutiert. Eine Beteiligung erscheint allerdings sehr wahrscheinlich, da unmittelbar nach Einsetzen der Ischämie erhöhte Konzentrationen sowohl von t-PA, als auch von LRP1 zu beobachten sind (47, 62). Es kommt dabei insbesondere zu einer Erhöhung der lokalen t-PA Konzentration, die auf einzelne Gefäßabschnitte begrenzt ist. In diesen Gefäßabschnitten kann zeitgleich eine Erhöhung der Permeabilität der BHS nachgewiesen werden (62). Diese Permeabilitätserhöhung konnte dabei nur in Anwesenheit von proteolytisch aktivem t-PA nachgewiesen werden und war Plasmin-unabhängig (63). Eine t-PA-abhängige Schädigung der BHS wurde meist unter sauerstoff- und glukosearmen Bedingungen untersucht. Ob eine Schädigung der BHS auch unter physiologischen Bedingungen von t-PA verursacht werden kann, ist nicht hinreichend untersucht (61, 64). Insgesamt konnte in diversen Modellen bereits eine t-PA-abhängige Schädigung der BHS beobachtet werden. So führte auch eine intrathekale Injektion von t-PA in den Liquor zu einer dosis- und aktivitätsabhängigen Permeabilitätsänderung der BHS (62). Eine ähnliche dosis- und aktivitätsabhängige

Schädigung konnte auch bei intraventrikulärer t-PA Injektion gezeigt werden. Es finden sich zusätzlich Belege dafür, dass diese durch t-PA vermittelten Effekte auch LRP1-abhängig sind. Im zuvor geschilderten Modell konnten die negativen Effekte von t-PA durch gleichzeitige Injektion mit dem LRP1-Inhibitor RAP das Ausmaß der Schädigung signifikant reduzieren (65). Die Schädlichen Effekte von t-PA lassen sich allerdings teilweise nicht auf andere Modelle übertragen. In einem weiteren *in vivo* Modell mit einem mechanischen Verschluss einer großen hirnersorgenden Arterie zur Simulation eines ischämischen Schlaganfalls und anschließender Injektion von t-PA 30 min nach Beginn des Verschlusses konnte keine signifikant größere Schädigung der BHS als in der t-PA unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet werden (61). Aufgrund intensiver Forschung konnten bereits einige verschiedene Mechanismen identifiziert werden, über die eine Interaktion von t-PA und LRP1 schädlichen Einfluss haben könnte. Ein denkbarer Mechanismus, der für eine frühzeitige Schädigung der BHS nach Ischämie verantwortlich sein könnte, ist der Signalweg des *Platelet Derived Growth Factor* -CC (PDGF-CC). Der PDGF-CC ist maßgeblich an der Angiogenese während der Entwicklung beteiligt und eine PDGF-CC Defizienz ist mit Gefäßfehlbildungen assoziiert (66). Er ist Substrat von t-PA und kann durch limitierte Proteolyse in seine aktive Form überführt werden. Dadurch ist der PDGF-CC dazu in der Lage, über eine Interaktion mit dem *Platelet Derived Growth Factor Rezeptor alpha* (PDGFR α) eine Signalkaskade in Gang zu setzen, an deren Ende eine Erhöhung der Permeabilität der BHS steht. Da auch eine alleinige Injektion von aktivem PDGF-CC zu einer Schädigung der BHS führt, vermittelt t-PA diese Schädigung der BHS nur indirekt. Bei dem PDGFR α handelt es sich um eine Rezeptortyrosinkinase. Seine Beteiligung an der Permeabilitätsänderung der BHS erscheint essentiell, da eine Injektion von Tyrosinkinaseinhibitoren mit einer Verringerung der BHS Schädigung einhergeht. Nicht nur t-PA alleine ist für die Aktivierung von PDGF-CC von Bedeutung. t-PA verfügt im Vergleich zu anderen Serinproteasen nur über eine relativ geringe katalytische Aktivität. Es kommt allerdings in Anwesenheit von Cofaktoren wie Fibrin zu einer deutlichen Steigerung. Auch LRP1 erfüllt die Eigenschaften eines Cofaktors für t-PA, da es zu einer Steigerung der t-PA bedingten PDGF-CC Aktivierung beiträgt. Das als Kofaktor benötigte LRP1 kann auch von Mikrogliazellen die innerhalb des Hirnparenchyms, jenseits der BHS liegen, bereitgestellt werden. Wird t-PA einer Lösung mit nativem, nicht aktivem PDGF zugesetzt, kommt es nur zu einer mäßigen PDGF-CC Aktivierung, wohingegen diese in Anwesenheit von LRP1 exprimierender Mikroglia signifikant gesteigert ist. Die PDGF-CC Aktivierung lässt sich unter diesen Umständen durch die gleichzeitige Inkubation mit entweder t-PA oder LRP1 hemmenden Stoffen reduzieren. Diese Interaktionen konnten in Mikroglia enthaltendem Hirnparenchym gezeigt werden (63, 67). Neben direkten Effekten von t-PA auf die Permeabilität der BHS durch Interaktion mit den Endothelzellen konnten zahlreiche weitere im Hirnparenchym gezeigt werden. Voraussetzung für diese Pathologien innerhalb des Hirngewebes wäre ein Transport von t-PA über die BHS. Ein solcher Transport von t-PA über eine intakte BHS konnte bereits unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen werden. Dieser Transport zeigte sich *in vitro* dabei sättigbar und bei niedrigen Temperaturen signifikant vermindert, was auf einen rezeptorvermittelten Transport hindeutet. Ein geringer Anteil von etwa 4 % wurde dabei nicht nur über die Endothelbarriere transportiert, sondern zeigt danach noch proteolytische Aktivität. Als Rezeptor für den Transport von t-PA konnte LRP1 identifiziert werden. Durch Inkubation mit dem LRP1 Inhibitor RAP konnte in Experimenten der t-PA Transport deutlich beeinträchtigt werden. Die maximale Transportkapazität von t-PA unter physiologischen Bedingungen betrug dabei 50 $\mu\text{g/ml}$. Unter ischämischen Bedingungen, also bei verminderter Sauerstoff- und Glukosekonzentration konnte dagegen ein gesteigerter, zur Konzentration linearer und nicht sättigbarer Transport von t-PA über die BHS beobachtet werden. Da unter ischämischen Bedingung ebenfalls kein den Transport hemmender Einfluss von RAP messbar war, erscheint ein LRP1 unabhängiger Transport unter diesen Bedingungen wahrscheinlich (61). Tatsächlich kann auch bei Patienten nach einer Ischämie eine solche Hyperpermeabilität der BHS beobachtet werden (11). Dieser Hyperpermeabilität geht dabei

mit einem insgesamt gesteigerten parazellulären Diffusion als Indikator einer Schädigung der BHS einher (8). Eine weitere innerhalb des Hirnparenchyms gelegene Zellart sind Mikrogliazellen. Es konnte auch abseits des PDGFR α Signalweg -Signalweges eine Beteiligung der Mikroglia an der Schädigung der BHS gezeigt werden. Diese Schädigung war dabei t-PA und LRP1 abhängig. Während eine intrazerebrale t-PA Injektion bei Tieren mit wildtypischer Mikroglia zu einer Schädigung der BHS führte, konnte dieser Effekt nicht bei Tieren mit LRP1-defizienter Mikroglia beobachtet werden (65). Insgesamt sind die im Zusammenhang mit einer Ischämie entstehenden Läsionen des Gehirns bei Tieren mit LRP1 defizienter Mikroglia weniger ausgeprägt. Mikroglia durch ihre wichtige Rolle in der hirneigenen Immunabwehr dazu in der Lage, nach ihrer Aktivierung Entzündungsmediatoren freizusetzen. Diese Entzündungsmediatoren können wiederum die Permeabilität der BHS steigern. Besonders während der Frühphase einer Ischämie ist eine Aktivierung der Mikroglia in ischämischen Arealen zu beobachten (63). Diese Mikrogliaaktivierung ist t-PA und LRP1 abhängig und in t-PA Knockout-Mäusen deutlich vermindert (68). Unter den von aktivierter Mikroglia freigesetzten Mediatoren befinden sich auch MMPs wie die MMP9 (65). Die MMP9 ist dazu in der Lage, TJ Proteine wie Claudin-5 zu spalten und kann somit zu einer Schädigung der Endothelzellbarriere führen. Auch kommt es in Anwesenheit der MMP9 zu einer Schädigung der Basallamina, die ebenfalls mit einer Veränderung der Permeabilität der BHS vergesellschaftet ist (62). Die Schädigung der Basallamina geht vermutlich darauf zurück, dass zwei ihrer Hauptbestandteile, Kollagen IV und Laminin Substrate der MMP9 sind (13). Ein weiteres Substrat ist das Protein ZO-1, welches als TJ Protein im direkten Zusammenhang mit der Permeabilität einer Endothelzellbarriere zusammenhängt. Nach einer Ischämie konnte eine deutliche Degradation von ZO-1 festgestellt werden. Bei MMP9 Knockout-Mäusen dagegen konnte im Zusammenhang mit einer Ischämie kein vermehrter Abbau von ZO-1 beobachtet werden (13). Ebenso fällt die MMP9 bedingte Claudin-5 Degradierung in diesen Tieren geringer aus als bei Wildtyp-Tieren (65). MMP9 Knockout-Tiere zeigten unter physiologischen Bedingungen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ähnlich Barriereigenschaften der BHS ohne sich in der Gefäßarchitektur signifikant zu unterscheiden. Die Schädigung der BHS nach Ischämie fiel dagegen deutlich weniger stark aus als in der wildtypischen Kontrollgruppe (13). Neben der LRP1- und t-PA-abhängigen Mikrogliaaktivierung mit resultierender Freisetzung von MMP9 kommt es auch durch die ausgelöste Hypoxie nach Einsetzen einer Ischämie zu einer gesteigerten MMP Freisetzung. Auch die hypoxievermittelte MMP Freisetzung scheint von Mikroglia auszugehen und LRP1-abhängig zu sein, da sie bei LRP1-defizienter Mikroglia deutlich weniger stark ausfällt als bei wildtypischen Kontrollzellen (65). Die Beteiligung von t-PA erscheint ebenfalls sehr wahrscheinlich, da ähnliche Beeinträchtigungen der MMP9 Freisetzung auch bei t-PA Knockout-Tieren festzustellen sind (62). Nicht nur nach einer Ischämie sondern auch im Rahmen weiterer Pathologien innerhalb des ZNS wie einem Trauma oder einer Hirnblutung sind Veränderungen MMP9 Freisetzung und sogar Expression messbar (13). Es besteht dabei ein Zusammenhang zwischen der veränderten MMP9 Expression und einer plamin-unabhängigen t-PA Wirkung (69). Auch für die t-PA-abhängige Regulation der MMP9 Expression ist LRP1 essentiell. In LRP1 defizienten Zellen konnte keine t-PA-abhängige Änderung der MMP9 Expression oder Freisetzung bei anderen Pathologien als einer Ischämie nachgewiesen werden (70). Zusätzlich zu zahlreichen *in vivo* Untersuchungen konnte eine t-PA-abhängige Erhöhung der MMP9 Konzentration auch in humanen Endothelzellen nachgewiesen werden (71). Auch kommt es im Rahmen einer Ischämie nach etwa 8 h mit einem Maximum nach 24 h zu einer erhöhten MMP9 Konzentration beim Menschen (13). Bei Patienten, die eine thrombolytische Therapie des ischämischen Schlaganfalls erhalten haben war insgesamt eine erhöhte Konzentration und Aktivität der MMP9 im Blut messbar (71). Neben der möglichen durch t-PA verursachten direkten und durch die Interaktion mit LRP1 hervorgerufenen Effekte auf die Permeabilität der BHS konnte auch eine t-PA vermittelte Exzytotoxizität an zerebralen Neuronen festgestellt werden (72). Durch den vermehrten t-PA Transport unter ischämischen Bedingungen wird diese Wirkung

vermutlich noch verstärkt. Darüber hinaus spielt t-PA auch eine Rolle in der Regulation der zerebralen Perfusion. Auch in diesem Zusammenhang konnten t-PA bedingte Schädigungen beobachtet werden (68). Die Wirkung von t-PA und besonders seine Interaktion mit LRP1 bietet einen möglichen Ansatzpunkt für die Verbesserung der Schlaganfalltherapie. Bisher konnten einige *in vitro* und *in vivo* Versuche vielversprechende Ergebnisse erzielen. So konnte durch eine Injektion von Neuroserpinen die t-PA vermittelte Steigerung der MMP9 Konzentration im Verlauf einer Ischämie verglichen mit der Kontrollgruppe gesenkt werden. Dabei konnte keine Beeinflussung der Aktivität der MMPs durch Neuroserpine festgestellt werden (62). Auch eine Blockade von LRP1 durch RAP oder einen spezifischen Antikörper ist mit einem besseren Outcome nach einer zerebralen Ischämie verbunden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wiesen Tiere, bei denen LRP1 blockiert wurde eine geringere Schädigung der BHS vor (14, 62, 73, 74). Neben der Verringerung der Schädigung der BHS bei LRP1 Blockade war auch die Ausdehnung des begleitenden Hirnödems in der Versuchsgruppe geringer (47). Insgesamt konnte durch Injektion von RAP auch das Ausmaß an Gefäßschäden und sogar die Häufigkeit von Hirnblutungen als Folge einer Ischämie gesenkt werden. Dementsprechend konnte bei mit RAP behandelten Versuchstieren auch ein besseres neurologisches Outcome beobachtet werden (73).

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

α -MEM	Lonza, Verviers, Belgien
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	BioRad, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Brilliantblau	Roth, Karlsruhe
BSA (Bovine Serum Albumin)	Pierce, Bonn
Desoxyribonuklease I	Sigma, Deisenhofen
DMEM	Lonza, Verviers, Belgien
DMSO	Sigma, Deisenhofen
Endothelial cell growth supplement	Sigma, Deisenhofen
Entwicklerlösung RD-90	Fujifilm, Belgien
Essigsäure (100 %)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (70 % vergällt)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (100 %)	Roth, Karlsruhe
Fibronektin	Sigma, Deisenhofen
FITC-DEAE-Dextran (3.000-4.000 mol wt)	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco Paisley, Schottland

Glutamax	Gibco Paisley, Schottland
Heparin	Sigma, Deisenhofen
HEPES	Serva, Heidelberg
Hydrokortison	Sigma, Deisenhofen
Inulin-Carboxyl, C ¹⁴ -markiert	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
¹²⁵ I-NaI Radionuklid, 1 mCi Aktivität	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
Kollagen Typ IV	Sigma, Deisenhofen
Kollagenase CLS2	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New York, USA
Kollagenase/Dispase	Roche, Basel, Schweiz
Magermilchpulver	Ralphs, Kalifornien
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
PBS	Gibco Paisley, Schottland
Penicillin/Streptomycin	Lonza, Verviers, Belgien
Percoll	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Reagent	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Puromycin	Alexis Biochemicals, San Diego, Kalifornien USA
Protease Inhibitor complete	Roche, Mannheim
Protein A MAPS II Bindepuffer	BioRad, München
Protein A MAPS II Elutionspuffer	BioRad, München
Rotiload	Roth, Karlsruhe
Rinderalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
rt-PA (Actilyse®)	Boehringer Ingelheim
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	BioRad, München
TCA	Merck, Darmstadt
TEMED	Roth, Karlsruhe

Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCL	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	Gibco Paisley Schottland
Tween®20	Sigma, Deisenhofen
Ultima Gold	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA

3.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Einmalhandschuhe StarGuard Sensitiv	Starlab, Hamburg
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebekulturschalen (6 cm und 10 cm Ø)	Greiner Bio-one, Kremsmünster
Glaspipetten (5 ml, 10 ml und 20 ml)	VWR, Darmstadt
CryoTubes	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Mikrotest Platten 96-well (transparent und schwarz)	Sarstedt, Braunschweig
Multiwell Platten (6-well und 24-well)	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Nalgene™ Oak Ridge Zentrifugenröhrchen	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NAP™-5 Säulen	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
Nirocellulose-Membran Protran	Schleicher & Schuell, Dassel
Parafilm®	American National Can™, Greenwich, USA
Pierce™ Jodierungsröhrchen	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pipettenspitzen (10 µl bis 1000 µl)	Starlab, Ahrensburg
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sartolab® Vakuumfilter (Steril, 0,45 µm Porengröße)	Sartorius, Göttingen
ThinCert™ Zellkultur Einsätze	Greiner Bio-one, Kremsmünster
UV-Küvette-Mikro	Brand, Wertheim
Zellschaber (Greiner cell scraper)	Sigma, Deisenhofen
Zentrifugenröhrchen	

Geräte

Anthos Reader 2010 ELISA		anthos Mikrosysteme, Friesoythe
Arpège 70 Stickstofftank		Cryopal, Bussy-Saint- Georges, Frankreich
CO ₂ -Brutschrank CO-150		New Brunswick, Edison, USA
CO ₂ -Brutschrank HERAcell 240		Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Eppendorf BioPhotometer		Eppendorf SE, Hamburg
Flachbettschüttler Rocky 3D		Fröbel Labortechnik, Lindau
Gefrier- und Kühlschränke	- 80 °C	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
	- 20 °C	Liebherr, Ochsenhausen
	+ 4 °C	Liebherr, Ochsenhausen
Schüttelwasserbad GFL 1092		GFL, Burgwedel
Heizblock HTM130		HLC, Ritterstieg
Heizblock Thermomixer 5436		Eppendorf, Hamburg
LAS 3000		FujiFilm, Minato, Japan
Lichtmikroskop Olympus CKX 41		Olympus, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25		Zeiss, Oberkochen
Magnetrührer MR 3000D		Heidolph, Schwabach
MrFrosty™ Gefrierbehälter		Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Mini-PROTEAN® Tetra Cell		BioRad, München
Mini Trans Blot®		BioRad, München
Microzentrifuge		Roth, Karlsruhe
Neubauer-improved Zählkammer		Marienfeld, Lauda Königshofen
Pasteurpipetten		Roth, Karlsruhe
pH-Meter		inoLab, Weilheim
Pipeten (1 µl – 1.000 µl)		Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet		VWR, Darmstadt
PowerPac™ Basic Power Supply		BioRad, München
Rüttler		IKA, Staufen
Schweißgerät vacufix electronic		Petra, Burgau
Sicherheitswerkbank HERAsafe®		Heraeus, Hanau

Sicherheitswerkbank Safemate 1.2 vision	SM Labortechnik, Rohrbach, Österreich
System VX-75 Autoklav	System GmbH, Linden
Trocken- und Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen
Varioskan LUX Multimodus-Mikrotiterplatten-Lesegerät	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Vortex-Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich
Waage BL 150s	Satorius, Göttingen
Zentrifuge Biofuge	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Hettich Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Universal 32	Hettich, Tuttlingen

3.3 Software

ADAP Software (Anthos)	anthos Mikrosysteme, Friesoythe
CorelDRAW 2020	Corel, Ottawa, Kanada
GraphPad Prism	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien USA
ImageJ	(75)
Image Reader LAS-3000	Fujifilm, Minato, Japan
Microsoft Office Paket	Microsoft, Seattle, Washington, USA
Skant™ RE für Mikrotiterplatten-Lesegeräte	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

3.4 Antikörper

Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper	Verwendung
Maus anti- α -Tubulin 1:10.000 in TBST + 5 % MP + 0,02 % NaN_3 (62204, Invitrogen)	HRP-konjugiert Esel anti-Maus 1:10.000 in TBST + 5 % MP (715-035-151, Jackson Immunoresearch)	Immunologischer Nachweis von α -Tubulin in Zelllysaten im Western-Blot (Ladekontrolle)
Kaninchen anti- β -Aktin 1:1.000 in TBST + 5 % MP + 0,02 % NaN_3 (A2066, Sigma Aldrich)	HRP-konjugiert Ziege anti-Kaninchen 1:10.000 in TBST + 5 % MP (A5278, Sigma-Aldrich)	Immunologischer Nachweis von β -Aktin in Zelllysaten im Western-Blot (Ladekontrolle)
Kaninchen anti-Claudin-5 1:1.000 in TBST+ 5 % MP + 0,02 % NaN_3 (34-1600, Invitrogen)	HRP-konjugiert Ziege anti-Kaninchen 1:10.000 in TBST + 5 % MP (A5278, Sigma-Aldrich)	Immunologischer Nachweis von Claudin-5 in Zelllysaten im Western-Blot
Maus anti-LRP1 (11E2) 1:1.000 in TBST + 0,02 % NaN_3 (Steffen E. Storck, (42))	HRP-konjugiert Esel anti-Maus 1:10.000 in TBST + 5 % MP (715-035-151, Jackson Immunoresearch)	Immunologischer Nachweis von LRP1 in Zelllysaten im Western-Blot
Kaninchen anti-MMP-9 1:1.000 in TBST+ 5 % MP + 0,02 % NaN_3 (#3852S, Cell Signaling)	HRP-konjugiert Ziege anti-Kaninchen 1:10.000 in TBST + 5 % MP (A5278, Sigma-Aldrich)	Immunologischer Nachweis von MMP-9 in Zelllysaten und Zellkultur Überständen im Western-Blot
Kaninchen anti-t-Pa 1:2.000 in TBST+ 5 % MP + 0,02 % NaN_3 (10147-1-AP, Proteintech)	HRP-konjugiert Ziege anti-Kaninchen 1:10.000 in TBST + 5 % MP (A5278, Sigma-Aldrich)	Immunologischer Nachweis von t-Pa in Zelllysaten und Zellkultur Überständen im Western-Blot
	HRP-konjugiert Esel anti-Maus 1:10.000 in TBST + 5 % MP (715-035-151, Jackson Immunoresearch)	Immunologischer Nachweis von Maus anti-LRP1 (primärer Antikörper) in Zellkultur Überständen

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

3.5 Zelllinien

Zelllinie	Typ	Ursprung	Referenz
CHO-K1	Immortalisiert	Chinese Hamster Ovary	(76)
CHO-13-5-1	Immortalisiert	Chinese Hamster Ovary	(77)
bEnd.3	Immortalisiert	Endothelzellen	(78)
Mikrovaskuläre Endothelzellen	Primär	Maus	

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien

3.6 Zellbiologische Methoden

3.6.1 Kultivierung immortalisierter Zelllinien

Für die rt-PA Uptake Versuche wurden immortalisierte epitheliale Zellen, entnommen aus dem *chinesischen Hamsteroovar* (CHO), verwendet. Es wurden dabei zwei von CHO Zellen abgeleitete Zelllinien untersucht. CHO-K1 Zellen, die LRP1 in normalen Konzentrationen exprimieren und CHO 13-5-1 Zellen, die kaum LRP1 exprimieren. Die CHO 13-5-1 Zelllinie ist dabei eine chemisch modifizierte Zelllinie und kein LRP1 Knockout (76, 77). Für die Untersuchung der TJ Protein Levels nach rt-PA Inkubation, sowie für die rt-PA Transportversuche wurde die zerebrale Endothelzelllinie bEnd.3, entnommen aus der BALB/c Mauslinie, verwendet (78). Die rt-PA Transportversuche wurde zudem mit primären mikrovaskulären Endothelzellen der Maus durchgeführt. CHO und bEnd.3 Zellen wurden in sterilen 10 cm oder 6 cm Zellkulturschalen, sowie für die Versuche in 6-well Platten kultiviert. bEnd.3 und primäre mikrovaskuläre Endothelzellen wurden für die Transportversuche in ThinCert™ Zellkultureinsätzen kultiviert und deren Wachstum im CellZscope überwacht. Alle Zellen wurden bei 37 °C in einem Inkubator mit 5 % CO₂ gelagert. Es wurde α-MEM Komplettmedium für CHO-Zellen und DMEM Komplettmedium für bEnd.3 und primäre mikrovaskuläre Endothelzellen verwendet. Alle 2 Tage wurde das Medium gewechselt. Vor dem Mediumswechsel wurden die Zellen vorsichtig zweimal mit je 2 ml warmem PBS gewaschen um avitale Zellen zu entfernen. Im Anschluss daran wurde vorsichtig frisches und aufgewärmtes Medium für die entsprechende Zelllinie hinzugegeben. Bei einer Konfluenz von etwa 80 % - 90 % wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 oder 1:5 passagiert. Dazu wurden die Zellen zunächst wie oben beschrieben mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 37 °C warmem Trypsin/EDTA und Inkubation bei 37 °C für 3 min vom Boden der Zellkulturschale gelöst. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurden diese in frischem Medium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Zusammen mit frischem Medium wurde diese Zellsuspension in eine neue Zellkulturschale gegeben.

α-MEM Komplettmedium (CHO-Zellen)

α-MEM

10 % (v/v) Fötale Kälberserum (FCS)

Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)

DMEM Komplettmedium (bEnd.3 Zellen)

DMEM

10 % (v/v) FCS

Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)

PBS (pH 7,4)

NaCl (137 mmol/l)

KCl (2,7 mmol/l)

Na₂HPO₄ Anhydrat (10 mmol/l)

KH₂PO₄ (1,8 mmol/l)

(HCl für PBS pH 2)

Trypsin/EDTA in PBS (pH 7,4)

0,05 % (w/v) Trypsin

0,02 % (w/v) EDTA

3.6.2 Aussäen von Zellen

Um eine möglichst konstante Dichte der Zellen in den Zellkulturschalen für die Durchführung der Versuche zu gewährleisten, wurde für jeden Versuch die identische Anzahl an Zellen ausgesät. Dazu wurden die jeweiligen Zellen zunächst in einer 10 cm Schale kultiviert und bei einer Konfluenz von etwa 80 % zum Aussäen verwendet. Es wurden dabei die Zellen zunächst wie oben beschrieben durch Hinzugabe von Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale gelöst und in frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in einen 15 ml Falcon überführt und die suspendierten Zellen durch Zentrifugation bei RT mit 140 G für 4 min pelletiert. Nach Absaugen des zellfreien Überstandes wurden die pelletierten Zellen in genau 10 ml frischem Medium resuspendiert. 20 µl dieser Zellsuspension wurden danach mit 20 µl 10 %igem Trypanblau gemischt, um die Zellen anzufärben und damit unter dem Mikroskop sichtbar zu machen. Nach gründlichem Vermischen wurden 10 µl der gefärbten Zellsuspension auf eine Neubauer-improved Zählkammer gegeben und insgesamt vier Quadranten ausgezählt. Die Zellanzahl pro ml Suspension wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{z * 10000 * d}{q}$$

„z“ entspricht dabei der Zahl der insgesamt gezählten Zellen

„d“ stellt den Verdünnungsfaktor dar, im beschriebenen Fall ist d = 2

„q“ entspricht der Anzahl ausgezählter Quadrate, in diesem Fall ist q = 4

Pro Well wurden bei 6-wells 10⁶ CHO Zellen ausgesät. Pro ThinCert™ Zellkultur Einsatz wurden 15.000 bEnd.3 Zellen ausgesät.

3.6.3 Präparation und Kultivierung primärer mikrovaskulärer Endothelzellen

Die Präparation und Kultivierung primärer mikrovaskulärer zerebraler Endothelzellen ist um ein Vielfaches aufwendiger als die von immortalisierten Zelllinie. Experimente mit primären Zellen bilden allerdings auch genauer die Verhältnisse ihres Ursprungsgewebes ab und eignen sich daher insbesondere für Studien an spezifischen Endothelbarrieren wie der BHS (79). Primäre Endothelzellen wurden neben bEnd.3 Zellen bei den rt-PA Transportversuchen

verwendet. Die Zellen wurden dazu aus insgesamt 14 Mäusen im Alter von 8-9 Wochen gewonnen. Davon waren 5 weiblich und 9 männlich. Bei 5 Mäusen handelte es sich um wildtypische Mäuse, die restlichen 9 waren heterozygote Träger der APP23 Mutation. APP23 Mäuse werden üblicherweise in der Forschung am Morbus Alzheimer verwendet, da sie eine mutierte Variante des humanen APP Gens überexprimieren. Diese Tiere zeigen üblicherweise das Bild einer Alzheimererkrankung im Alter von etwa 6 Monaten. Sowohl Wildtyp, als auch heterozygote APP23 Mäuse sollten LRP1 in gleichem Maße exprimieren. Die zur Isolation der Zellen verwendeten Hirne wurden unabhängig vom Genotyp gepoolt und erst nach vollständiger Präparation in Versuchs- und Kontrollgruppe aufgeteilt. Die gesunden Mäuse wurden vor Präparation der Gehirne mittels peritonealer Injektion einer Ketamin/Xylazin Lösung zunächst tief narkotisiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Um eine ausreichend tiefe Narkotisierung zu gewährleisten wurde den Tieren eine Dosis von 10 µl/g Körpergewicht appliziert. Die Überprüfung einer ausreichenden Narkosetiefe erfolgte durch Testung der Reflexpunkte.

Ketamin/Xylazin Lösung

Ketamin 10 mg/ml

Xylazin 1 mg/ml

Gelöst in 0,9 %iger NaCl Lösung

Nach der Tötung erfolgt eine Desinfektion des Kopfes durch mehrmaliges Abwaschen mit 70 %igem Ethanol. Darauf erfolgte die stumpfe Präparation des Schädelknochens über einen etwa 2 cm messenden Hautschnitt im Nacken. Ausgehend vom großen Hinterhauptsloch wurde der Schädelknochen durch zwei seitliche Schnitte eröffnet und das Schädeldach entfernt. Das nun freigelegte Hirn wurde komplett, inklusive des Kleinhirns entnommen. Bis zur Präparation der Hirne wurden diese in eiskaltem DMEM gelagert.

DMEM Lösung

DMEM

Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)

Glutamax (2 mmol/l)

Alle weiteren Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Arbeitsbank der Zellkultur. Von den entnommenen Hirnen wurden die Bulbi olfactorii, sowie die Kleinhirne entfernt. Durch Rollen auf sterilem Chromatographiepapier wurden die Meningen, sowie Teile der weißen Substanz entfernt. Die verbleibenden Stücke bestehen nun hauptsächlich aus Cortex. In 5 ml kaltem DMEM wurden die Hirne in einer 6 cm Schale durch ein Skalpell in kleine Stücke geschnitten und anschließend in einen 50 ml Falcon übertragen. Dieser Suspension wurden darauf Collagenase II und DNase I hinzugegeben. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurde die Suspension homogenisiert. Darauf folgte die Inkubation in einem Bakterienschaker bei 37 °C und 200 rpm für eine Stunde. Am Ende der einstündigen Inkubation sollte das extrazelluläre Material durch die Enzyme abgebaut worden sein.

Lösung für 10 Tiere

13,5 ml DMEM

1 ml Collagenase II (10 mg/ml)

200 µl DNase I (1 mg/ml)

Nach der Inkubation im Bakterienschaker wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von kaltem DMEM gestoppt. Durch eine Zentrifugation bei 4 °C und 1000 G für 8 min wurden die festen Bestandteile pelletiert und der Überstand abgesaugt. Das verbleibende Pellet wurde anschließend in sterilfiltriertem DMEM mit 20 % BSA gelöst und erneut bei 4 °C und 1.000 G für 20 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation ist das im Pellet enthaltene Myelin inklusive der Neurone und Gliazellen im BSA gelöst und kann als Überstand abgesaugt werden. Es verbleibt ein kleineres rotes Pellet am Boden des Falcons, welches die Kapillaren enthält. Dieses Pellet wurde anschließend in einer Lösung aus DMEM, Collagenase/Dispase, sowie DNase I resuspendiert und bei 37 °C bei 200 rpm für eine Stunde im Bakterienschaker inkubiert. Während dieses Schrittes werden die Endothelzellen aus den Kapillaren gelöst und liegen anschließend frei in der Suspension vor.

Lösung für 10 Tiere

9 ml DMEM

1 ml Collagenase/Dispase (10 mg/ml)

100 µl DNase I (1 mg/ml)

Um die Endothelzelle von den anderen in der Suspension befindlichen Zellen und Rückständen aus den enzymatischen Reaktionen zu trennen, wird eine Zentrifugation in Nalgene™ Oak Ridge Zentrifugenröhrchen mit einem Percoll Gradienten genutzt. Dieser muss während der einstündigen Inkubation durch Zentrifugation für 1 h bei 20.000 G und 4 °C vorbereitet werden.

Percoll Gradient (33 %)

19 ml PBS

1 ml PBS (10x)

1 ml FCS

10 ml Percoll

Nach der Inkubation wurden die enzymatischen Reaktionen durch Zugabe von kaltem DMEM gestoppt und alle festen Bestandteile durch Zentrifugation bei 4 °C mit 1.000 G für 10 min separiert. Das entstandene Pellet wurde in 2 ml DMEM resuspendiert und vorsichtig auf den vorbereiteten Percoll Gradienten gegeben. Es folgt eine erneute Zentrifugation bei 4 °C mit 1.000 G für 10 min. Die Fragmente der Kapillaren sind im Gradienten als weiße Flocken zu erkennen. Um sie von den restlichen Bestandteilen zu trennen, wurden mit einer Spritze etwa 10 ml der Phase des Gradienten entnommen, die die Kapillaren enthält. Durch eine letzte Zentrifugation wurden die Fragmente der Kapillaren bei 4 °C mit 700 G für 6 min von den Resten des Gradienten getrennt. Die Resuspendierung erfolgt nun in Kulturmedium und die Zellen können ausgesät werden. Vor dem Aussäen der Zellen wurden diese gezählt. Es wurde ein DMEM Kulturmedium verwendet und die ThinCert™ Zellkultur Einsatz wurden mit einer

Kollagen IV/Fibronectin Coating-Lösung vorbehandelt um die Haftung der ausgesäten Zellen an den Wells zu verbessern.

DMEM Kulturmedium

DMEM

Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)

Glutamax (2 mmol/l)

10 % (v/v) FCS

Heparin (1 µg/ml)

Endothelial cell growth supplement (3 mg/ml)

Kollagen IV/Fibronectin Coating-Lösung

500 µl sterilisiertes Wasser

400 µl Kollagen IV (1 mg/ml)

100 µl Fibronectin (1 mg/ml)

In den ersten drei Tagen wurden die gewonnenen primären Zellen zur Selektion der primären mikrovaskulären Endothelzellen zusätzlich mit Puromycin in einer Konzentration von 4 µg/ml behandelt. Da Endothelzellen den Effluxtransporter P-Glykoprotein exprimieren, sind sie dazu in der Lage das Nukleosid Antibiotikum Puromycin wieder aus der Zelle heraus zu transportieren und bleiben trotz Antibiotikatherapie vital. Alle anderen Zelltypen werden durch die Behandlung in ihrem Wachstum gehemmt. Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass es sich bei der Zellpopulation ausschließlich um zerebrale Endothelzellen handelt (80). Das Zellwachstum im Sinne der Ausbildung eines Monolayers wurde mittels des CellZscopes überwacht. Zusätzlich dazu wurde die Formation einer Endothelzellbarriere durch Messung des elektrischen Widerstandes überwacht. Vor der Durchführung von Experimenten mit den Zellen wurde die weitere Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und einer dichten Barriere durch Zugabe von hydrokortisonhaltigem, serumfreiem Medium für 18 h inkubiert.

Stimulationsmedium

DMEM + HAM's F-12 (1:1)

Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)

Glutamax (1 mmol/l)

Hydrokortison (550 nmol/l)

3.6.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen einer niedrigen Passage für spätere Experimente zu konservieren, wurden diese eingefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut. Zellen aus einer 10 cm Schale wurden bei einer Konfluenz von etwa 70 – 80 % zum Einfrieren vorbereitet. Dazu wurden sie zweimal gründlich mit je 2 ml warmem PBS gewaschen um avitale Zellen von der Schale zu entfernen. Durch Zugabe von 2 ml 37 °C warmem Trypsin/EDTA und Inkubation bei 37 °C für etwa 3 min wurde die Zellen vom Boden der Zellkulturschale gelöst. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurden diese in frischem Medium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei RT und 140 G für 4 min um die suspendierten Zellen zu Pelletieren. Der Zellfreie Überstand wurde anschließend abgesaugt und die pelletierten Zellen in 2 ml 4 °C kaltem Komplettmedium mit 10 % (v/v) *Dimethylsulfoxid* (DMSO) als Gefrierschutzmittel resuspendiert. Die Zellsuspension wurde umgehend in ein Kryoröhrchen überführt und anschließend in den zuvor bei -80 °C gelagerten MrFrosty™ Gefrierbehälter überführt und bei -80 °C gelagert. Nach zwei Tagen wurden die Kryoröhrchen aus dem MrFrosty™ Gefrierbehälter aus dem -80 °C Gefrierschrank in flüssigen Stickstoff umgelagert. Zum Auftauen von in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurde die im Kryoröhrchen eingefrorene Zellsuspension umgehend nach der Entnahme aus dem Stickstofftank im Wasserbad unter ständigem Schwenken aufgetaut. Danach wurde der gesamte Inhalt des Kryoröhrchens mit 37 °C warmem Komplettmedium auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt und in einen frischen 15 ml Falcon überführt. Es erfolgte anschließend eine Zentrifugation bei RT und 140 G für 4 min. Der DMSO haltige Überstand wurde anschließend abgesaugt und die pelletierten Zellen in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in eine 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Der erste Mediumswechsel wurde dann einen Tag nach dem Auftauen durchgeführt. In diesem Schritt wurden alle avitalen und noch suspendierten Zellen ebenfalls entfernt.

3.6.5 Zellyse

Bei der Zellyse werden die Zellmembranen der zu lysierenden Zellen durch Zugabe eines Lysepuffers zerstört. Durch anschließende Zentrifugation können die Fragmente der zerstörten Zellmembranen vom Zytosol getrennt werden. Vor der Zellyse wurden die Zellen gründlich dreimal mit je 2 ml PBS (pH 7), sowie zweimal mit je 2 ml PBS (pH 2) gewaschen. Durch das Waschen mit PBS (pH 2) können sämtliche an der Oberfläche der Zellen gebundene Proteine entfernt werden. Im nächsten Schritt erfolgte die mechanische Ablösung der Zellen von der Zellkulturschale. Die von der Zellkulturschale gelösten Zellen wurden darauf in 1 ml PBS (pH 7) suspendiert, in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C bei 140 G für 4 min pelletiert. Nach Entfernen der Überstände kann das verbleibende Zellpellet entweder zur späteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren, oder direkt lysiert werden. Für die Zellyse wurden die Zellen je nach Pelletgröße in 20 µl – 50 µl RIPA Lysepuffer mit Proteaseinhibitor suspendiert und über 20 min auf Eis lysiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen für 20 min bei 4 °C und 14.000 G zentrifugiert um sämtliche festen Bestandteile vom Lysat zu trennen. Die Überstände wurden in einem Eppendorf Reaktionsgefäßen gesammelt und bis zur Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.

RIPA Lysepuffer

50 mmol/l Tris (pH 8)

1 % (v/v) NP40

0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholat

0,1 % (w/v) SDS

10 mmol/l Natriumfluorid

1 mmol/l β -Glycerophosphat

2 % (v/v) Proteaseinhibitor (50x)

3.6.6 Messung von Barriereeigenschaften im CellZscope

Es gibt zahlreiche experimentelle Modelle, die eine Untersuchung von Zellbarrieren unter *in vitro* Bedingungen erlauben. Ein etabliertes Modell ist die Kultivierung von Endothelzellen in einem Zellkulturmodell mit zwei Kompartimenten. Dabei werden die Endothelzellen auf den Boden eines permeablen Zellkultureinsatzes, wie z.B. eines ThinCert™ Zellkultureinsatzes ausgesät und anschließend in eine Zellkulturschale eingesetzt. So entstehen ein luminales und ein abluminales Kompartiment. In einem solchen Modell für die BHS repräsentiert die luminal gelegene Seite die Blut- und die abluminal gelegene die Hirnseite der BHS (81, 82). Eine Möglichkeit zur Charakterisierung von Barriereeigenschaften ist die Messung von *Transendothelialelektrischem Widerstande* (TEER) und der Kapazität. Der TEER Wert repräsentiert die „Dichtigkeit“ der ausgebildeten Barriere. Je größer der Wert ist, desto dichter ist die Barriere. Die Kapazität dagegen spiegelt das Wachstumsmuster der Zellen auf dem Zellkultureinsatz wider. Die Kapazität ist anfangs hoch und nimmt mit der Ausbildung einer durchgehenden Zellschicht auf dem Zellkultureinsatz ab. Das CellZscope ist ein Gerät, das die Messung dieser beiden Parameter ermöglicht. Die entsprechenden Zellen werden in geeignete Zellkultureinsätze ausgesät und können anschließend in passende, mediumgefüllte Einsätze des CellZscopes überführt werden. Durch die Kultivierung der Zellen im Gerät können die Messungen der relevanten Parameter kontinuierlich und ohne weitere Manipulation vorgenommen werden (83). Eine Möglichkeit, die Bildung einer dichteren Zellbarriere zu stimulieren, ist die Inkubation mit serumfreiem Medium und Hydrocortison. Daraus resultieren insgesamt höhere TEER Werte (84, 85). Eine Messung von TEER und Kapazität wurde über den gesamten Zeitraum der Kultivierung in einem Intervall von 6 h gemessen. Anhand dieser Messwerte für jeden einzelnen Zellkultureinsatz konnte neben einer Überwachung des zellulären Wachstums auch eine gleichmäßige Zuweisung der Zellen zu Versuchs- und Kontrollgruppe vorgenommen werden. An jedem zweiten Tag wurde das Medium gewechselt. Die Versuche wurden gestartet, sobald die untersuchten Zellen eine Monolayer ausgebildet hatten und kein weiterer Anstieg des TEER Wertes mehr zu beobachten war.

3.6.7 Antikörperaufreinigung aus Zellkulturüberständen

Der für die Versuche genutzte monoklonale Antikörper gegen die ligandenbindenden Domänen II und IV von LRP1 wurde im Rahmen einer Publikation entwickelt (86). Freundlicherweise wurden für die antikörperproduzierenden Hybridomazellen von Steffen E. Storck zur Produktion des Antikörpers zur Verfügung gestellt. Um den von Hybridomazellen produzierten und ins Medium abgegebenen Antikörper nutzen zu können, erfolgte die Aufreinigung des Antikörpers, sowie die Bestimmung der genauen Konzentration. Ein etabliertes Verfahren zur Aufreinigung monoklonaler Antikörper vom Typ *Immunglobulin G* (IgG) ist die Affinitäts-Chromatographie mit Protein A Säulen. Protein A stammt ursprünglich aus der Zellwand des gram positiven Bakterium *Staphylococcus Aureus*. Es besitzt die Fähigkeit Immunglobuline, insbesondere IgG, zu binden und dient dem Bakterium als Abwehrmechanismus gegen die vom Immunsystem produzierten Antikörper. Protein A ist dabei in der Lage, den FC-Teil eines Antikörpers pH-abhängig zu binden. Zur Antikörperaufreinigung wurden die antikörperhaltigen Zellkulturüberstände bei neutralem pH-Wert auf eine Protein A Säule gegeben. Dort werden lediglich die Antikörper gebunden, wohingegen die restlichen Bestandteile der Lösung die Säule wieder verlassen. Durch Spülen der Säule mit einem Puffer sauren pH-Wertes kommt es zu einer Konformationsänderung der Proteine und somit zur Lösung der Bindung zwischen Protein A und dem Antikörper (87). Durch Lagerung in einem Puffer mit neutralerem pH-Wert kann im Anschluss daran die Funktionsfähigkeit der Antikörper wiederhergestellt werden. Vor Beginn der Antikörperaufreinigung wurden die Zellkulturüberstände zunächst mit einem Papierfilter filtriert um grobe Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurden den Überständen entsprechend der Herstellerangaben 31,4 g ungelöster MAPS II Bindepuffer (BioRad, München) hinzugegeben um eine bestmögliche Bindung des Antikörpers an das in den Säulen enthaltene Protein A zu gewährleisten. Nach vollständiger Auflösung des Puffers wurde die Lösung mit einem Filter der Porengröße 0,45 µm sterilfiltriert. Die Aufreinigung der Antikörper wurde mit dem Proteinaufreinigungssystem ÄKTA™start (GE Healthcare, Chicago) durchgeführt. Dazu wurden Mini-Affi-Prep Protein A Säulen (BioRad, München) für die Affinitätschromatographie verwendet. Vor Start der Chromatographie wurden diese den Herstellerangaben entsprechend für die Proteinaufreinigung vorbereitet und mit dem verwendeten Puffer equilibriert. Die Chromatographie erfolgte mit insgesamt 50 ml der vorbereiteten Zellkulturüberstände bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Nach vollständigem Durchfluss der Probe wurde das System mit weiteren 10 Säulenvolumina MAPSII Bindepuffer (BioRad, München) gespült um ungebundenen Bestandteile aus den Säulen zu waschen. Zur Lösung der Antikörper-Protein A Bindung und anschließenden Elution des Antikörpers wurden die Säulen mit 10 Säulenvolumina MAPS II Elutionspuffer (BioRad, München) gespült. Das Eluat wurde in je 1 ml großen Fraktionen gesammelt und direkt nach Elution mit 10 % (v/v) Tris HCl pH 8,8 versetzt um den sauren pH-Wert des Elutionspuffers zu neutralisieren. Zur Bestimmung der Antikörperkonzentration innerhalb der einzelnen aufgereinigten Fraktionen wurde Proben zusammen mit Proteinstandards (BSA) auf ein Polyacrylamid Gel aufgetragen und es wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Entsprechend dieser Messung wurden die Antikörper gepoolt und mit PBS auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt.

3.7 Proteinbiochemische Methoden

3.7.1 Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Tests

Eine Standardmethode zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Lösung ist der *Bichinoninsäure* (BCA) Test, der erstmals von Smith et al. 1985 beschrieben wurde (88). Er basiert auf der Umwandlung von Cu^{2+} in Cu^+ Ionen in einem ersten, proteinabhängigen Schritt. In einem zweiten Schritt werden die umgewandelten Cu Ionen durch die BCA komplexiert. Der gebildete Komplex nimmt dabei eine violette Farbe an und weist ein Absorptionsmaximum bei 562 nm vor. Das Ausmaß der Färbung der Lösung ist dabei Zeitabhängig, daher kann die Proteinkonzentration einer unbekannt Probe nur durch den Vergleich mit zur gleichen Zeit vorbereiteten Proteinstandards einer bekannten Konzentration errechnet werden. Der BCA Test zeichnet sich dadurch aus, dass er relativ unempfindlich gegen Störfaktoren wie ein saures oder alkalisches Milieu ist (89). Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden je 2,5 μl der Probe mit 22,5 μl *doppelt destilliertem Wasser* (ddH_2O) vermischt. Anschließend wurden 500 μl der im Verhältnis 50:1 gemischten Reaktionslösungen zu Probenlösungen und Proteinstandards hinzugegeben. Alle Proben wurden für 30 min bei 60 °C im Heizblock inkubiert. Je 200 μl der einzelnen Proben wurden dann im Doppelansatz in eine transparente 96-well Mikrotiterplatte pipettiert und im Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Zum Ansetzen der Proteinstandards wurde BSA (1 mg/ml) verwendet (Tab. 3).

Standard	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Volumen ddH_2O (μl)	Volumen BSA (μl)
Leerwert	0	25	0
S1	1	22,5	2,5
S2	2	20	5
S3	3	17,5	7,5
S4	4	15	10
S5	5	12,5	12,5

Tabelle 3: Pipettierschema BSA Standards

3.7.2 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die *SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese* (SDS PAGE) ist ein Verfahren, um Proteine zu denaturieren und ihrer Größe nach zu trennen. Im ersten Schritt werden die in den Proben enthaltenen Proteine durch Zugabe des Detergens *Natriumdodezylsulfat* (SDS), sowie das Erhitzen auf 95 °C für 5 min denaturiert. Zusätzlich zum SDS wird den Proben β -Mercaptoethanol hinzugegeben. Dieses spaltet die intramolekularen Disulfidbrücken der Proteine. SDS bindet dabei an die Aminosäuren eines Proteins. und besitzt eine negativ Ladung. Pro zwei Aminosäuren bindet dabei je ein Molekül SDS. Durch die Bindung von SDS an die denaturierten Proteine nehmen diese eine gleichmäßige längenabhängige negative Ladung an, sodass deren Eigenladung vernachlässigbar ist. Im nächsten Schritt werden die denaturierten und durch SDS negativ geladenen Proteine auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung bewegen sich die nun negativ geladenen Proteine entlang des elektrischen Feldes durch das Gel. Die Geschwindigkeit, mit der die Proteine dabei das Gel durchqueren ist abhängig von der Ladung und somit der Länge der Proteinkette. Ein weiterer Faktor, der die Geschwindigkeit mit der die Proteine sich durch das Gel bewegen bestimmt, ist der Vernetzungsgrad des Gels. Je stärker das Gel vernetzt ist, desto langsamer bewegen sich insbesondere lange Proteinketten hindurch. Die SDS PAGE

erlaubt somit die Trennung eines Proteingemisches nach Größe der einzelnen Proteine (90). Die SDS PAGE wurde in dieser Arbeit zur Analyse von Zelllysaten, Zellkulturüberständen oder Antikörperproben genutzt. Um die in den Problemlösungen enthaltenen Proteine quantitativ untersuchen zu können, wurde zunächst die Gesamtproteinkonzentration der einzelnen Lysate durch einen BCA Test bestimmt. Für die Untersuchung der Lysate wurden Proben mit einem Volumen von je 20 µl auf das Gel aufgetragen, wobei eine Proteinmenge von 20 µg pro Probe angestrebt wurde. Die Lysate wurden dazu entsprechend ihrer Proteinkonzentration mit ddH₂O verdünnt. Nach Verdünnung der Proben wurde ihnen 25 % (v/v) 4x SDS Probenpuffer zugesetzt. Nach gründlichem Vermischen wurden die mit SDS versetzten Proben für 5 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Im Anschluss daran wurden sie auf das Gel aufgetragen. Für die Experimente wurden Gele mit einem Vernetzungsgrad von 10 % verwendet. Für die Gelelektrophorese wurde eine konstante Spannung verwendet. Die Spannung betrug dabei zunächst 100 Volt (V) für die ersten 45 min der Elektrophorese. Im Anschluss daran wurde eine Spannung von 150 V verwendet bis die Proben das Ende des Gels erreichten.

SDS PAGE Puffer

25 mmol/l Tris
192 mmol/l Glycin
0,1 % (w/v) SDS

4x SDS Probenpuffer

62,5 mmol/l Tris-HCl (pH 6,8)
10 % (v/v) Glycerin
2 % (w/v) SDS
0,02 % (w/v) Bromphenolblau

Sammelgelpuffer (pH 6,8)

0,6 mol/l Tris-HCl
0,4 % (w/v) SDS

Trenngelpuffer (pH 8,8)

1,5 mol/l Tris
0,4 % (w/v) SDS

	Sammelgel 4 % Vernetzungsgrad (µl)	Trenngel 10 % Vernetzungsgrad (µl)
ddH ₂ O	1.563	5.000
40 % Acrylamid (29:1)	312	2.500
Sammelgelpuffer	625	/
Trenngelpuffer	/	2.500
10 % APS	25	100
TEMED	2,5	10

Tabelle 4: Pipettierschema Polyacrylamid Gele

3.7.3 Konzentrationsbestimmung mittels Proteinstandards in Polyacrylamidgelen

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen, die für einen BCA Test ungeeignet sind, wurde eine Konzentrationsbestimmung mittels Proteinstandard (BSA) in Polyacrylamidgelen verwendet. Ungeeignet für einen BCA Test sind beispielsweise unterschiedlich gefärbte Lösungen, deren Farbstoffe mit der Messung der Absorption interferieren könnten. Die antikörperhaltigen Zellkulturüberstände aus der

Antikörperaufreinigung enthielten unterschiedliche Mengen an Phenolrückständen aus dem ursprünglichen Medium, daher musste dieses Verfahren zur Konzentrationsbestimmung gewählt werden. Um diese Antikörperkonzentrationen in den einzelnen Fraktionen zu messen, wurden geringe Mengen der Proben und Proteinstandards durch eine SDS-PAGE der Größe nach getrennt und mittels Coomassiefärbung angefärbt. Anschließend konnte durch densitometrische Messung der Bandenintensitäten von Proben, sowie den Proteinstandards bekannter Konzentration durch lineare Regression die Konzentration der Proben berechnet werden. Die Proteinfärbung mit Coomassie-Brillantblau ist eine häufig genutzte Methode und kann bereits kleine Proteinmengen von etwa 0,1 – 0,5 µg nachweisen. Der Farbstoff bindet dabei insbesondere an die basischen Seitenketten der Aminosäuren (91). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration unbekannter Proben wurden je 15 µl der Proben, sowie Proteinstandards mit Proteinmengen von 2,5 – 15 µg verwendet. Analog zur vorher beschriebenen Gelelektrophorese wurden Proben und Proteinstandards insgesamt 25 % (v/v) 4 x SDS Probenpuffer hinzugefügt. Nach Vorbereitung und Denaturierung aller Proben und Proteinstandards wurde die Gelelektrophorese wie beschrieben durchgeführt. Zur Färbung der enthaltenen Proteine wurde das Polyacrylamidgel für eine Stunde auf einem Schüttler mit der Coomassie Färbelösung inkubiert. Im Anschluss daran wurde das gefärbte Polyacrylamidgel für eine Stunde mit der Entfärbelösung I und zuletzt über Nacht mit der Entfärbelösung II inkubiert. Nach der Inkubation mit der Entfärbelösung II ist nahezu der gesamte nicht-proteingebundene Farbstoff aus dem Gel herausgewaschen. Zur Bestimmung der Konzentrationen der Proben wurden die Gele anschließend fotografiert und die Dichte der Banden mit der ImageJ Software gemessen. Anhand der gemessenen Dichte der Banden konnte mit der GraphPad Prism Software eine Eichgerade erstellt werden und im Anschluss daran die Proteinmenge je Probe durch Berechnung der linearen Regression bestimmt werden. Durch Division der Proteinmenge je Probe durch deren Volumen konnte die Konzentration in µg/ml berechnet werden.

Coomassie Färbelösung

50 % (v/v) Ethanol

0,7 % (v/v) Essigsäure

0,0175 % (w/v) Brilliant Blue gelöst in ddH₂O

Entfärbelösung I

20 % (v/v) Ethanol

7 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung II

10 % (v/v) Essigsäure

3.7.4 Western-Blot

Der Western-Blot ist eine Standardmethode der Proteinbiochemie und wurde in den 1980er Jahren entwickelt. Mit ihm lassen sich mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennte Proteinen durch Anlage einer elektrischen Spannung vom Polyacrylamid Gel auf eine Nitrozellulose Membran übertragen. Die auf die Membran übertragenen Proteine sind dann für spezifische Antikörper zugänglich, die einen spezifischen Proteinnachweis ermöglichen (92, 93). Der Western-Blot wurde als Nassblot in mit 4 °C kaltem Blotting Puffer in einer BioRad Nassblotkammer durchgeführt. Bei einer konstanten Spannung von 85 V erfolgt der Proteintransfer über einen Zeitraum von 90 min. Während der gesamten Dauer ist die Nassblotkammer durch Eis gekühlt um eine zu starke Erhitzung durch die Hohe Spannung zu verhindern. Nach Ende des Blots wird die Membran mit *Tris Buffered Saline + Tween20* (TBST) gewaschen. Zum Anfärben der auf die Membran übertragenen Proteine wurden die

Membranen nach dem Western-Blot mit dem Farbstoff Ponceau S angefärbt und mit einem Skalpell individuell zugeschnitten. Der Farbstoff Ponceau S bindet dabei unspezifisch Protein. Die Membran wurde dafür für 5 min mit der Ponceau Färbelösung inkubiert und anschließend gründlich mit TBST gewaschen. Nach dem Zurechtschneiden der Membranen erfolgte die Inkubation mit TBST + 5 % Magermilchpulver für eine Stunde. Dies dient dazu, unspezifische Bindungsstellen mit dem enthaltenen Milchprotein zu Blockieren.

Blotting Puffer (pH 8,8)

25 mmol/l Tris
192 mmol/l Glycin
0,1 % SDS
20 % (v/v) Methanol

Ponceau S Färbelösung

0,1 % Ponceau S
5 % (v/v) Essigsäure

TBST

1x TBS
0,1 % (v/v) Tween20

Blockierungspuffer

TBST
5 % Magermilchpulver

3.7.5 Immunchemischer Proteinnachweis

Der immunchemische Proteinnachweis ermöglicht eine Identifikation von zuvor durch SDS PAGE der Größe nach aufgetrennten Proteinen. Die jeweils gesuchten Proteine werden dabei über einen spezifischen Primärantikörper zunächst gebunden und dann mit Hilfe eines zweiten, sogenannten Sekundärantikörper, dargestellt. Der Sekundärantikörper ist dabei gegen den speziesspezifischen FC-Teil des Primärantikörpers gerichtet und mit dem Enzym *Horse Radish Peroxidase* (HRP) gekoppelt. Bei Zugabe der Entwicklerlösung zu der mit Primär- und Sekundärantikörper inkubierten Membran kommt es beim bei Bindung von Primär- und Sekundärantikörper zu einer chemischen Reaktion zwischen der HRP und der Entwicklerlösung. Im Rahmen dieser Reaktion von HRP des Sekundärantikörpers und der Entwicklungslösung kann in einer Dunkelkammer eine Fluoreszenz detektiert werden. Die Inkubation der bereits blockierten Membran mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Morgen wurde die Membran zunächst dreimal für je 10 min mit TBST gewaschen um Rückstände des Primärantikörpers zu entfernen. Im Anschluss wurde die Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei *Raumtemperatur* (RT) für eine Stunde durchgeführt. Auch nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TBST gewaschen, bevor die Auswertung im Entwickler begonnen wurde. Die Membran wurde dafür je nach Größe mit 400 µl – 900 µl der Entwicklerlösung benetzt und dann belichtet, bis ein ausreichendes Signal detektiert werden konnte.

3.8 Radiochemische Methoden

3.8.1 Radiomarkierung von rekombinantem t-PA (Actilyse®)

Für die Transportversuche wurde rt-PA mit radioaktivem ^{125}Jod markiert. Eine Möglichkeit, Proteine mit radioaktivem Jod zu markieren ist die indirekte Jodierung. Dabei wird ein radioaktives Jodisotop wie ^{125}Jod durch eine Reaktion mit einem Reagenz in sein negativ geladenes Ion überführt und anschließend der zu markierenden Proteinlösung hinzugegeben, sodass an dessen Aminosäuren das Jodisotop binden kann. Ein häufig verwendetes Reagenz ist das erstmalig durch Markwell beschriebene IODOGEN Reagenz (94). Das negativ geladene Jodion ist äußerst reaktiv und bindet in Anwesenheit von Proteinen an die Aminosäuren Tyrosin und Histidin. Durch eine Säulenchromatographie können anschließend die ungebundenen Jodionen von den proteingebundenen getrennt werden. Während die freie Iodionen praktisch ungehindert die Chromatographiesäule passieren können, ist die Passage von größeren Strukturen wie Proteinen verzögert. Bei dem für die Markierung von rt-PA verwendeten ^{125}Jod handelt es sich um Na^{125}I mit einer spezifischen Aktivität von 1 mCi (Perkin Elmer, Waltham). Zur Überführung des Na^{125}I in das negativ geladene Jodion wurden IODOGEN Jodierungsröhrchen (ThermoFisher, Waltham) verwendet. Im ersten Schritt wurden 290 μl PBS zusammen mit 10 μl Na^{125}I (1 mCi) auf den Boden des Jodierungsröhrchens pipettiert und für 6 min bei RT unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Zusammen mit 200 μl einer rt-PA Lösung (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurde die Lösung mit dem ionisierten Iod für 6 min in einem Eppendorfgefäß inkubiert. Nach diesem Schritt sollte das rt-PA bereits zu einem großen Teil jodiert sein. Im folgenden Schritt wurden markiertes Protein und ungebundene Jodionen durch Säulenchromatographie getrennt. Für die Säulenchromatographie wurden NAP-5 Säule (GE Healthcare, Waltham) verwendet und vor Benutzung mit 10 ml PBS equilibriert. Dazu wurde die gesamte Lösung auf die Säule aufgetragen. Der erste Durchfluss sollte das ungebundene ^{125}Jod enthalten und wurde daher verworfen. Danach wurde die Säule dreimal mit je 980 μl PBS gespült und die durchgelaufenen Fraktionen gesammelt. Mittels BCA Test erfolgte darauf die Messung der Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben. Im Anschluss wurde jeder Fraktion BSA (100 mg/ml) bis zu einer finalen Konzentration von 1 mg/ml hinzugegeben um unspezifische Bindungen zu sättigen. Nach Messung der Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen wurde mit insgesamt 10 μl der markierten rt-PA Lösung eine TCA Präzipitation durchgeführt, um restliches, nicht-proteingebundenes Jod vom radioaktiv markierten Protein zu trennen. Auf diese Weise konnte die spezifische Aktivität des markierten rt-PA im Verhältnis zu seiner Konzentration bestimmt werden.

3.8.2 Präzipitation radiomarkierter Proteine mit TCA

Eine Möglichkeit Proteine zu fällen ist die *Trichloressigsäure* (TCA) Präzipitation. Die TCA Präzipitation ermöglicht eine Trennung von jodiertem Enzym und freien Jodionen, die durch TCA nicht beeinflusst werden und wurde daher bei den Versuchen mit radiomarkiertem rt-PA verwendet (95). Zur Fällung gelöster Proteine wurde ein Anteil von 10 % (v/v) von TCA in der Lösung verwendet. TCA wurde dafür als eine 50 %ige Lösung angesetzt und entsprechend des Volumens der jeweiligen Lösung bis zu einem Gesamtanteil von 10 % TCA der Proteinlösung hinzugegeben. Nach Zugabe der TCA Lösung werden die Proben gut vermischt

und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation mit maximaler Drehzahl. Die nun proteinfreien Überstände wurden abgesaugt.

3.9 Experimente

3.9.1 MMP9 und Claudin-5 Levels nach rt-PA Inkubation

Für diesen Versuch wurden bEnd.3 Zellen verwendet und in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät. Bei etwa 90 % – 100 % Konfluenz wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und dann für eine Stunde mit FCS-freiem DMEM Komplettmedium inkubiert, um die Ausbildung von TJ Proteinen und den Aufbau einer dichten Endothelbarriere zu stimulieren. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit FCS-freiem DMEM Komplettmedium in der Kontrollgruppe und FCS-freiem DMEM Komplettmedium mit rt-PA der Konzentration 270 nmol/l in der Versuchsgruppe. Die rt-PA Konzentration war dabei angelehnt an die maximale therapeutisch genutzten rt-PA Konzentrationen (61). Nach einer Stunde Inkubation wurden die Zellen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und das Medium auf DMEM Komplettmedium gewechselt. Änderungen der TJ Protein Konzentrationen konnten in Publikationen über einen Zeitraum von 24 h nach t-PA Exposition beobachtet werden. 24 h nach Ende der rt-PA Inkubation wurden daher die Claudin-5 und MMP9 Konzentrationen gemessen. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben mechanisch von den Zellkulturschalen abgelöst und lysiert. Mittels BCA Test wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Proben berechnet. Je Probe wurden anschließend je 15 µg Protein in einem Volumen von 15 µl durch SDS PAGE und Western-Blot analysiert. Nach immunologischem Nachweis von Claudin-5 und MMP9 erfolgte die densitometrische Messung der jeweiligen Banden im Western Blot mittels der ImageJ Software. Eine Normierung der gemessenen Werte wurde durch Division durch die jeweiligen Werte der Ladekontrolle β-Aktin vorgenommen. Zur Auswertung der Effekte einer rt-PA Exposition wurden alle normierten Werte durch den Durchschnittswert der Negativkontrollen dividiert. Die statistische Signifikanz wurden abschließend mit Hilfe eines ungepaarten t-Testes mit der GraphPad Prism Software berechnet. Die Graphen zur Darstellung der Ergebnisse wurden ebenfalls mit der GraphPad Prism Software erstellt und mit CorelDRAW 2020 arrangiert.

3.9.2 Auswirkungen von rt-PA auf die Barriereigenschaften von Endothelzellen

bEnd.3 Zellen wurden wie oben beschrieben in ThinCert™ Zellkultureinsätze ausgesät. Ein Mediumswechsel erfolgte alle zwei Tage bis bei ausgebildetem Monolayer keine weitere Zunahme der TEER Werte mehr zu beobachten war. Um die Ausbildung von TJ Proteinen zu stimulieren, wurden die Zellen für 18 h mit FCS-freiem DMEM Medium und 550 nmol/l Hydrokortison inkubiert. Im Anschluss an die Stimulation der TJ Proteininformation wurden die einzelnen Zellen entsprechend der gemessenen Werte gleichmäßig in Versuchs- und Kontrollgruppe aufgeteilt. Es erfolgte die Inkubation mit rt-PA haltigem und rt-PA freiem, FCS-freiem DMEM Medium und Hydrokortison (550 nmol/l) für 24 h. Währenddessen wurden in einem Intervall von einer Stunde die Barriereigenschaften anhand von TEER und Kapazität gemessen. Als zusätzlicher funktioneller Marker für die Dichte der ausgebildeten

Endothelbarriere wurde die parazelluläre Diffusion von fluoreszentem FITC-Dextran (mol wt 3.000-4.000) gemessen. Dazu wurden je 50 µg/ml FITC-Dextran zu Beginn der Inkubation in das luminal Kompartiment gegeben. Da es für Dextran keine spezifischen Transporter oder Kanäle gibt, muss es parazellulär eine Zellbarriere überwinden und kann somit als Marker für die Dichte einer Zellbarriere genutzt werden. Zur Messung der parazellulären Diffusion von FITC-Dextran wurden nach 24 h Inkubation mit rt-PA-haltigem oder -freiem Medium je 200 µl Medium aus den luminalen, sowie abluminalen Kompartimenten entnommen. Es folgte die Messung der Fluoreszenz der Proben im Mikrotiterplatten-Lesegerät. Die Fluoreszenz wurde mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 493 \text{ nm}$ angeregt und die Emission bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{EM}} = 518 \text{ nm}$ gemessen. Durch Division der Werte des abluminalen – durch die des luminalen Kompartiments wurde die parazelluläre Diffusion in % errechnet. Zur Auswertung der gemessenen Daten wurden alle TEER Werte, sowie die prozentuale parazelluläre Diffusion durch den Mittelwert der (rt-PA freien) Kontrollgruppe geteilt. Mit der GraphPad Prism Software wurden die entsprechenden Graphen erstellt, sowie das Signifikanzniveau mittels ungepaartem t-Test berechnet. Die Graphen wurden in CorelDRAW für die finalen Abbildungen zusammengestellt.

3.9.3 LRP1-abhängige Aufnahme von rt-PA in CHO Zellen

CHO K1 und CHO 13-5-1 Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und bei etwa 90 % - 100 % Konfluenz zur Vorbereitung für den Versuch für eine Stunde mit FCS-freiem α -MEM inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal gründlich mit 37 °C warmem PBS gewaschen. Die Zellen wurden für insgesamt eine Stunde mit rt-PA der Konzentration 270 nmol/l in FCS-freiem α -MEM inkubiert. Eine Hälfte der CHO K1 Zellen wurde zusätzlich dazu mit dem monoklonalen LRP1 Antikörper 11E2 in einer Konzentration von 100 µg/ml inkubiert. Nach einer Stunde wurde die rt-PA Aufnahme durch die Zellen durch Lagerung der Zellkulturschalen auf Eis bis zur Verarbeitung gestoppt. Die Zellen wurden vor einer weiteren Verarbeitung sorgfältig insgesamt dreimal mit eiskaltem PBS und anschließend zweimal mit eiskaltem PBS pH 2 gewaschen, um an der Zelloberfläche gebundenes rt-PA zu lösen. Die Zellen wurden darauf wie bereits beschrieben mechanisch von der Zellkulturschale gelöst und in kaltem PBS in ein Eppendorf Mikroreaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation bei 4 °C für 4 min bei 4.250 rcf wurden die Zellen pelletiert. Nach Absaugen der Überstände konnten diese bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren werden. Zur Untersuchung der rt-PA Aufnahme wurden die Zellen wie bereits beschrieben lysiert. Über ein BCA Test wurden darauf die Proteinkonzentrationen der einzelnen Lysate bestimmt. Eine Proteinmenge von je 15 µl wurde bei einem Volumen von 25 µl mittels SDS PAGE und anschließendem Western-Blot mit immunologischem Proteinnachweis analysiert. Die densitometrische Messung der einzelnen Banden erfolgte durch die ImageJ Software. Die gemessenen Werte für das internalisierte rt-PA wurden durch Division durch die Werte der Ladekontrollen β -Aktin oder α -Tubulin normalisiert. Um die Messungen verschiedener Blots aus mehreren Experimenten vergleichen zu können, erfolgte eine weitere Normierung auf die die Positivkontrolle, in diesem Fall die Lysate aus den nicht mit dem Antikörper behandelten CHO K1 Zellen. Dazu wurden die Einzelwerte aller Messungen durch den Mittelwert der Messungen der Positivkontrolle geteilt. Zum Erstellen der entsprechenden Graphen, sowie der Berechnung des Signifikanzniveaus mittels ungepaartem t-Test wurde die GraphPad Prism Software verwendet. Die Graphen wurden mit der CorelDRAW Software für die Abbildungen zusammengestellt.

3.9.4 LRP1-abhängiger Transport von rt-PA über eine Endothelbarriere

Für die rt-PA Transportversuche wurden bEnd.3 und primäre mikrovaskuläre Endothelzellen Zellen in ThinCert™ Zellkultureinsätze ausgesät. Mit Hilfe des CellZscopes konnten das Zellwachstum, sowie die Ausbildung eines Monolayers überwacht werden. Nach etwa einer Woche Inkubation entwickelten die Zellen eine dichte Zellbarriere und die Versuche wurden gestartet. Vor dem Versuch wurden die Zellen für 18 h mit FCS-freiem DMEM mit 550 nmol/l Hydrokortison inkubiert um die Ausbildung von TJ Proteinen und damit einen Anstieg der TEER Werte zu stimuliert. Anhand der Messung wurden die Zellen in zwei Gruppen aufgeteilt. Der rt-PA Transport über die Endothelbarriere wurde für den Zeitraum einer Stunde analysiert. Der Transport von radioaktiv markiertem [¹²⁵I]-t-PA erfolgte dabei von der luminalen Seite des ThinCert™ Zellkultur Einsatzes, der in diesem Modell der BHS die Seite des Blutgefäßes repräsentiert, auf die abluminale Seite, die die Hirnseite darstellt. Eine Gruppe wurde neben rt-PA auch mit dem LRP1-spezifischen monoklonalen Antikörper 11E2 inkubiert um die Rolle von LRP1 am rt-PA Transport über eine Zellbarriere zu untersuchen. Zusätzlich zu den gemessenen TEER Werten wurde als weiterer Marker für die Dichtheit der Endothelzellbarriere die parazelluläre Diffusion von [¹⁴C] markiertem Inulin gemessen. Der β-Strahler [¹⁴C]-Inulin wurde dafür in einer Konzentration von 1 µCi/ml ebenfalls dem luminalen Kompartiment hinzugegeben. Inulin eignet sich als Marker für die parazelluläre Diffusion, da es keine spezifischen Rezeptoren oder Kanäle für Inulin gibt und sämtliches zur abluminalen Seite gelangtes [¹⁴C]-Inulin dementsprechend parazelluläre diffundiert sein muss. Zur Messung der parazellulären Diffusion wurden nach Beenden des Transportes 15 µl des Mediums aus dem luminalen und 90 µl aus dem abluminalen Kompartiment entnommen. Die entnommenen Proben wurden mit je 1 ml Ultima Gold liquid scintillation cocktails vermischt und im Tri-Carb 2800 TR Liquid Scintillation Analyser gemessen. Es wurde dabei der Mittelwert von insgesamt 3 Messungen über je 12 min in einem Bereich von 85 bis 160 keV verwendet. Durch Division der entsprechenden Werte der abluminalen - durch die der luminalen Seite wurde die parazelluläre Diffusion in % berechnet. Zur Messung des Transportes von [¹²⁵I] - rt-PA über die Endothelbarriere wurden 80 µl des luminalen Mediums und 480 µl des abluminalen untersucht. Um eine Verfälschung der Messung durch nicht proteingebundenes frei vorliegendes ¹²⁵I zu verhindern, wurde vor der Messung über eine Proteinpräzipitation mittels TCA das proteingebundene ¹²⁵I isoliert. Vor der Proteinpräzipitation werden beiden Proben 20 µl BSA (100 mg/ml) zugesetzt. Die luminalen Proben wurden mit ddH₂O auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt. Durch die Zugabe von BSA lässt sich das Präzipitat trotz nur geringer Mengen rt-PA gut erkennen und der Überstand kann ohne versehentliche Aspiration der präzipitierten Proteine entfernt werden. Um für die Präzipitation eine Gesamtkonzentration von 10 % TCA in der gesamten Probe zu erreichen, werden den Proben je 125 µl 50 %iges TCA zugesetzt. Nach Zugabe der TCA wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 14.000 rcf bei 4 °C für 20 min präzipitiert. Die proteinfreien Überstände wurden verworfen. Abschließend wird das im Präzipitat enthaltene radiomarkierte [¹²⁵I]-t-PA im Wizard2 Gamma Counter je Probe dreimal für je 3 min gemessen. Die Berechnung des rt-PA Transportes über die Endothelzellbarriere erfolgte dabei analog zur Berechnung der parazellulären Diffusion von [¹⁴C]-Inulin. Um die berechneten rt-PA Transportwerte zwischen den verschiedenen untersuchten Zellen vergleichen zu können, muss beachtet werden, dass die Dichte der Zellbarrieren die Werte maßgeblich beeinflussen. Um den Transport von rt-PA auf die Dichtheit der Zellbarriere anzupassen, wurde daher der *Transportquotient* (TQ) berechnet. Dazu wurden die Werte des rt-PA Transportes durch die parazelluläre Diffusion dividiert und folgende Formel genutzt:

$$TQ(t - Pa) = \frac{t - PA \text{ abluminal}/[^{125}I] - t - PA \text{ luminal}}{[^{14}C] - \text{Inulin abluminal}/[^{14}C] - \text{Inulin abluminal}}$$

4 Ergebnisse

4.1 rt-PA Inkubation führt nicht zu veränderten Levels von Claudin-5 oder MMP9 in Endothelzellen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass t-PA dazu in der Lage ist, LRP1-abhängig regional die Konzentration der MMP9 zu steigern. Der Ursprung der freigesetzten MMP9 wird aktuell kontrovers diskutiert. Neben der Erhöhung der MMP9 Konzentrationen konnte ebenfalls eine Verminderung der Konzentration von Claudin-5 in Anwesenheit von t-PA beobachtet werden. Um zu untersuchen, ob Die Inkubation von Endothelzellen mit hohen therapeutischen Konzentrationen von rt-PA zu Veränderungen der Konzentrationen von MMP9 oder Claudin-5 führt, wurden bEnd.3 Zellen für eine Stunde mit 270 nmol/l rt-PA inkubiert und mit unbehandelten Zellen verglichen. Es wurden dazu die Zelllysate mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (Abb. 5 A). In den durchgeführten Experimenten findet sich kein Anhalt darauf, dass rt-PA dazu in der Lage ist, die MMP9 oder Claudin-5 Konzentrationen in Zelllysaten nach einstündiger Inkubation zu beeinflussen. 24 h nach rt-PA Inkubation zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den MMP9 Levels ($p = 0,5$) ins Zelllysaten von mit rt-PA behandelten und unbehandelten Kontrollzellen Zellen (Abb. 5 B). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Claudin-5 Levels ($p = 0,9$) behandelter und unbehandelter Zellen (Abb. 5 C).

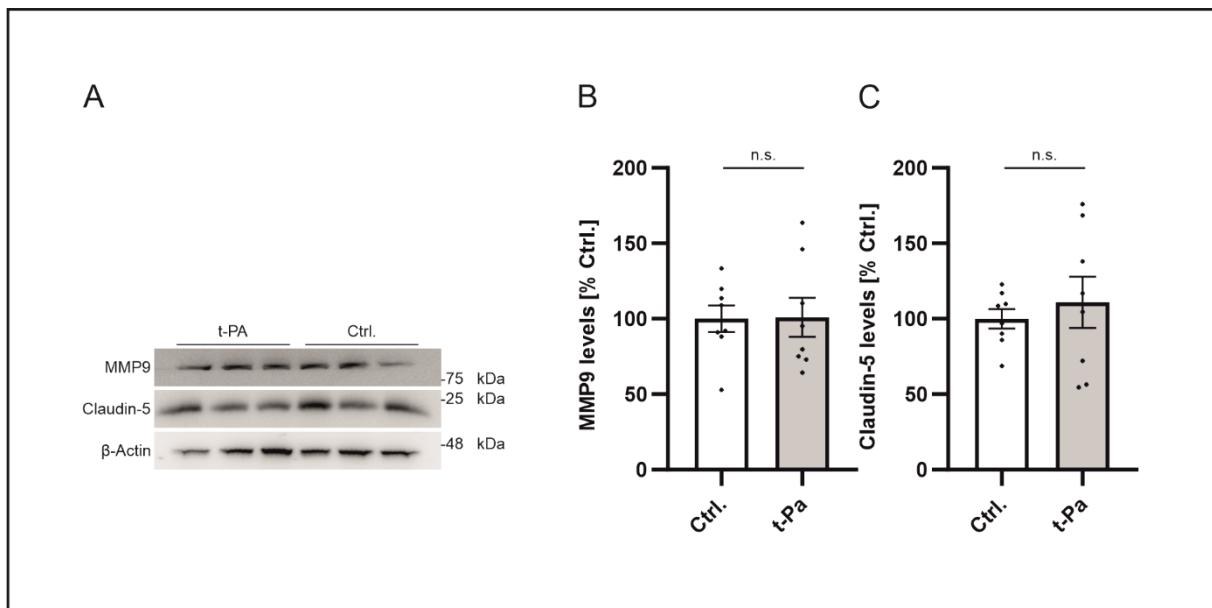


Abbildung 5: MMP9 und Claudin-5 Levels nach rt-PA Inkubation

(A) Repräsentative Immunoblots von MMP9 und Claudin-5 Levels in Zelllysaten von bEnd.3 Zellen 24 h nach Inkubation mit 270 nmol/l rt-PA für eine Stunde verglichen mit unbehandelten Zellen. (B) MMP9 und (C) Claudin-5 Levels wurden durch densitometrische Messung der entsprechenden Banden im Western Blot bestimmt. Alle gemessenen Werte für MMP9 oder Claudin-5 wurden durch die Werte der Ladekontrolle (β -Aktin) dividiert. Die auf die Ladekontrolle normierten Werte wurden durch den Mittelwert der Negativkontrolle in Form der unbehandelten bEnd.3 Zellen dividiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler je Gruppe, sowie die individuellen Werte als einzelne Punkte von $n = 8$ bEnd.3 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten. Für die statistische Analyse wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (* $p < 0,05$).

4.2 rt-PA zeigt keine negativen Auswirkungen auf die Barriereigenschaften von Endothelzellen

Neben der Konzentration von Claudin-5 wurde der Effekt von rt-PA auf TEER Werte, welche die Integrität einer Zellbarriere widerspiegeln untersucht. Dabei haben wir bEnd.3 Endothelzellen in unserem *in vitro* Modell der BHS bei bereits ausgebildeter Endothelbarriere luminalseitig für eine Stunde mit 270 nmol/l rt-PA inkubiert und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen (Abb. 6 A). Die Aufteilung der untersuchten Gruppen in Versuchs- und Kontrollgruppe erfolgte dabei anhand der gemessenen TEER Werte, sodass vor Inkubation mit rt-PA kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand (Abb 6 C). Es erfolgte darauf eine kontinuierliche Messung des TEER Wertes über 24 Stunden (Abb 6 B). Über diesen Zeitraum zeigten sich die Verläufe der TEER Werte und damit auch der Barriereigenschaften nahezu identisch zwischen den mit rt-PA inkubierten und den unbehandelten Zellen der Kontrollgruppe (Abb. 6 D). Neben dem TEER wurde die parazelluläre Diffusion von FITC markiertem Dextran, einem Kohlenhydrat ohne spezifischen Kanal oder Rezeptor, untersucht. Die parazelluläre Diffusion erreichte über 24 h einen Mittelwert von ca. 0,3 %. Diese geringe parazelluläre Diffusion ist Indikator für eine intakte und dichte Zellbarriere. Es konnte nach 24 h kein signifikanter Unterschied ($p = 0,6$) in der parazellulären Diffusion von FITC-Dextran zwischen der rt-PA behandelten und der unbehandelten Kontrollgruppe gemessen werden (Abb. 6 E).

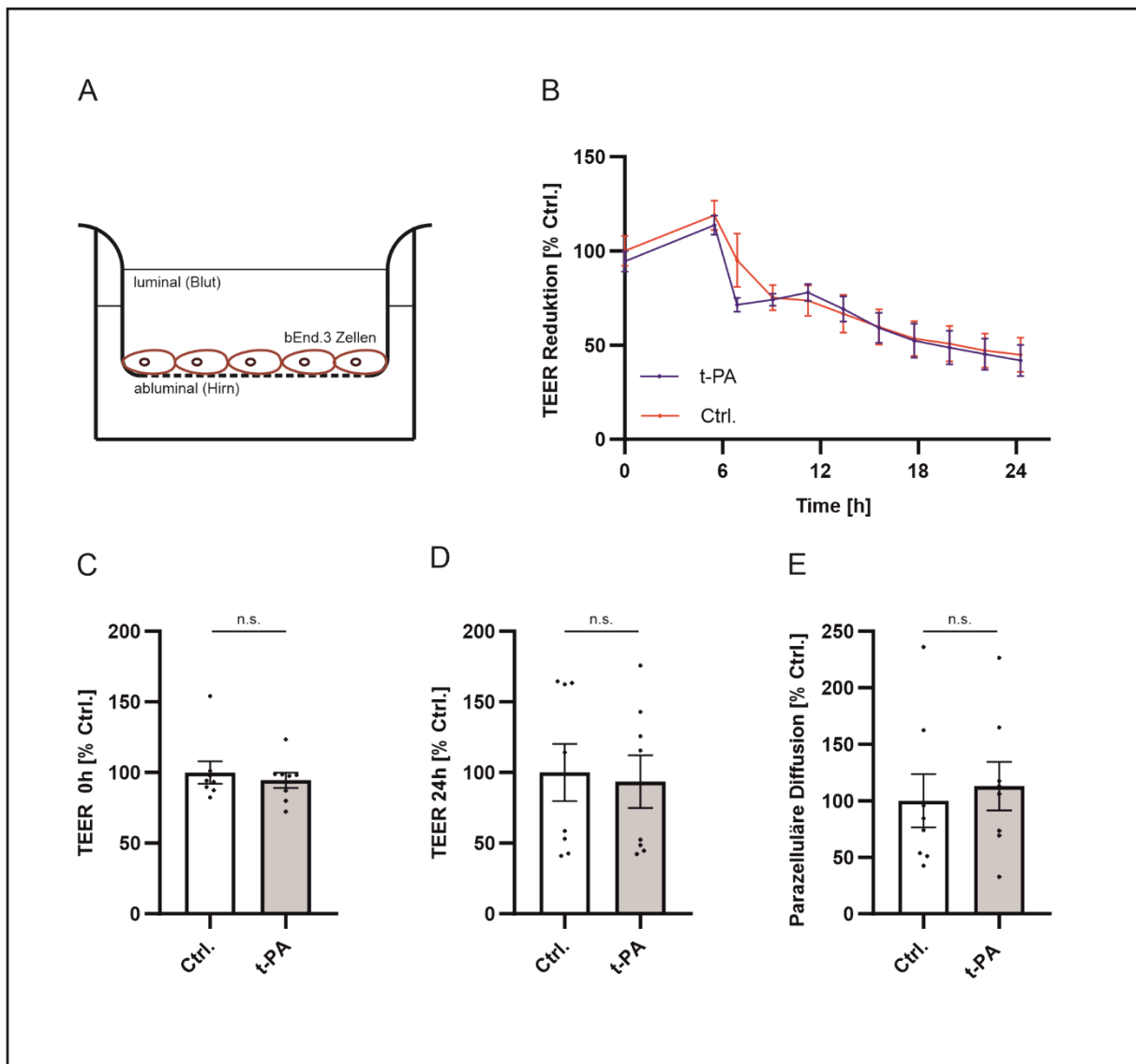


Abbildung 6: Auswirkungen von rt-PA auf die Barriereigenschaften von Endothelzellen

(A) bEnd.3 Zellen wurden in TransWell Zellkultureinsätzen kultiviert. Im Modell für die BHS repräsentiert die luminal Seite die Blut- und die abluminale Seite die Hirnseite. Nach Zugabe von 270 nmol/l rt-PA zum luminalen Kompartiment für eine Stunde erfolgte ein Mediumswechsel. Dem neuen Medium wurde auf der luminalen Seite 50 µg/ml FITC-Dextran als Marker für die parazelluläre Diffusion zugegeben. (B) Mit dem CellZscope wurden über 24 h nach rt-PA Inkubation die TEER Werte gemessen. Zu Beginn der Messung betrug der durchschnittliche TEER Wert für alle untersuchten TransWell Zellkultureinsätze 32 Ω x cm². Alle Werte wurden durch Division durch den Mittelwert der unbehandelten Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt normiert. Abgebildet sind die Mittelwerte ± Standardfehler je Gruppe. (C) TEER Werte direkt und (D) 24 h nach einstündiger Inkubation mit 270 nmol/l rt-PA. (E) parazelluläre Diffusion von FITC-markiertem fluoreszierendem Dextran 24 h nach rt-PA Inkubation. Die Normierung der gemessenen Werte erfolgte durch Division durch den Mittelwert der unbehandelten Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler je Gruppe, sowie die individuellen Werte als einzelne Punkte von n = 8 bEnd.3 Zellen pro Gruppe aus einem Experiment. Für die statistische Analyse wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (* p < 0,05).

4.3 LRP1-abhängige Aufnahme von rt-PA in CHO Zellen

Ein Transport von t-PA über die intakte BHS wurde bereits durch mehrere Autoren beschrieben. Als Transportrezeptor konnte dabei LRP1 identifiziert werden. In den vorliegenden Untersuchungen konnten wir eine rt-PA Aufnahme in LRP1 exprimierenden CHO

K1 Zellen nachweisen, wohingegen die LRP1 defizienten CHO 13-5-1 Zellen eine signifikant geringere, kaum nachweisbare Aufnahme von rt-PA zeigten. Durch gleichzeitige Inkubation mit 100 µg/ml des gegen die ligandenbindenden Domänen II und IV gerichteten monoklonalen LRP1 Antikörpers 11E2 konnte die LRP1-abhängige Aufnahme nach Inkubation mit 270 nmol/l rt-PA in den LRP1 exprimierende CHO K1 Zellen gegenüber unbehandelten CHO K1 Zellen mit normaler rt-PA Aufnahme um 78,9% ($p < 0,0001$) verringert werden (Abb. 7 B). Kein signifikanter Unterschied ($p = 0,6282$) bestand dagegen zwischen den mit dem 11E2 Antikörper behandelten CHO K1 Zellen und der Negativkontrolle mit LRP1 defizienten CHO 13-5-1 Zellen.

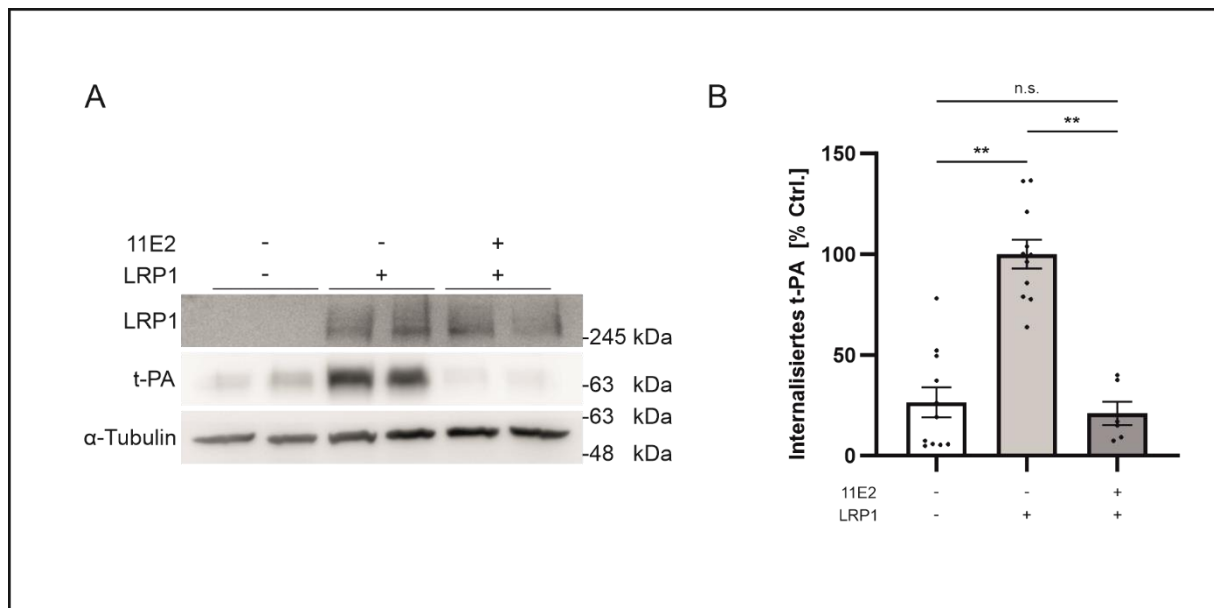


Abbildung 7: LRP1-abhängige Aufnahme von rt-PA in CHO Zellen

(A) Repräsentative Immunoblots von rt-PA in Zelllysaten von CHO K1 und CHO 13-5-1 Zellen nach Inkubation mit 270 nmol/l rt-PA über eine Stunde. CHO 13-5-1 Zellen, die kein LRP1 enthalten wurde als Negativkontrolle verwendet. CHO K1 Zellen, die LRP1 in Wildtypmengen exprimieren, wurden mit 100 µg/ml des gegen die Domänen II und IV gerichteten monoklonalen LRP1 Antikörper 11E2 inkubiert und mit unbehandelten CHO K1 Zellen verglichen. (B) Die rt-PA Menge in den Zelllysaten wurde durch densitometrische Messung der entsprechenden Banden im Western Blot bestimmt. Alle gemessenen Werte für rt-PA in den Zelllysaten wurden durch die Werte der Ladekontrolle (α -Tubulin) dividiert. Die bereinigten Werte wurden durch den Mittelwert der Positivkontrolle in Form der unbehandelten CHO K1 Zellen dividiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler je Gruppe, sowie die individuellen Werte als einzelne Punkte von $n = 11$ (CHO 13-5-1), $n = 11$ (CHO K1) und $n = 6$ (CHO K1 + 11E2) aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Für die statistische Analyse wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.4 LRP1-abhängiger Transport von rt-PA über eine Endothelbarriere

Die Fähigkeit des Antikörpers 11E2 den *in vitro* Transport von [125 I]-markiertem rt-PA über eine Endothelzellbarriere zu reduzieren, wurde ebenfalls an unserem Modell der BHS (Abb. 8 A) untersucht. Dazu wurden sowohl bEnd.3-, sowie primäre mikrovaskuläre Endothelzellen untersucht. Neben rt-PA wurde zusätzlich [14 C]-markiertes Inulin als Marker für die parazelluläre Diffusion hinzugegeben. In Anwesenheit von 100 µg/ml des LRP1 Antikörpers 11E2 zeigte sich der Transport von [125 I]-rt-PA von der luminalen zur abluminalen Seite unseres *in vitro* Modells der BHS um 61 % ($p = 0,06$) in bEnd.3 Zellen (Abb. 8 B) und um 39,1

% ($p = 0,01$) in primären mikrovaskulären Endothelzellen (Abb. 8 C) vermindert. Der Transport von rt-PA über diese Zellbarrieren wurde dabei durch Berechnung des TQ verglichen.

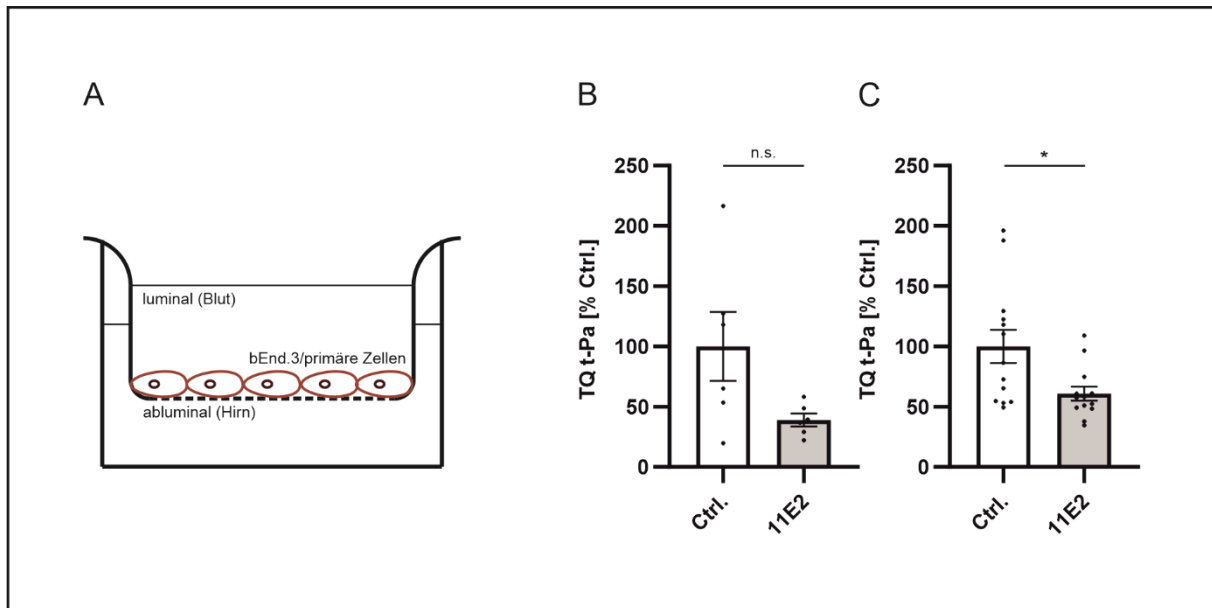


Abbildung 8: LRP1-abhängiger Transport von rt-PA über eine Endothelbarriere

(A) bEnd.3 und primäre mikrovaskuläre Endothelzellen wurden in TransWell Zellkultureinsätzen kultiviert. Zellwachstum und Barriereigenschaften wurden im CellZscope überwacht. Im Modell für die BHS repräsentiert die luminalen Seite die Blut- und die abluminalen Seite die Hirnseite. Der Transport von 270 nmol/l [125 I]-rt-PA von der luminalen zur abluminalen Seite wurde über den Zeitraum einer Stunde untersucht. Als Marker für die Integrität der Zellbarriere erfolgte die Messung der parazellulären Diffusion von 1 μ Ci/ml [14 C]-Inulin von der luminalen zur abluminalen Seite. Die Versuchsgruppe wurde zusätzlich mit 100 μ g/ml des gegen die Domänen II und IV gerichteten monoklonalen LRP1 Antikörpers 11E2 inkubiert. In Anwesenheit des 11E2 Antikörpers zeigt sich der Transport von [125 I]-rt-PA über die Zellbarriere in bEnd.3 (B) und primären mikrovaskulären Endothelzellen (C) reduziert. Der TQ von der luminalen zur abluminalen Seite wurde durch Division des prozentualen [125 I]-rt-PA Transportes durch die prozentuale parazelluläre Diffusion von [14 C]-Inulin berechnet. Alle Werte wurden durch Division durch den Mittelwert der unbehandelten Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler je Gruppe, sowie die individuellen Werte als einzelne Punkte von $n = 6$ (bEnd.3) und $n = 13$ (primäre mikrovaskuläre Endothelzellen) pro Gruppe aus jeweils einem Experiment. Für die statistische Analyse wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (* $p < 0,05$).

5 Diskussion

5.1 MMP9 und Claudin-5 Levels nach rt-PA Inkubation

Während eines ischämischen Schlaganfalls kommt es über verschiedene Mechanismen zu einer Schädigung des Hirnparenchyms. In der Frühphase des Schlaganfalls ist vor allem der Sauerstoff- und Glukosemangel für diese Schädigung des Hirnparenchyms und der besonders vulnerablen Neurone verantwortlich. Im zeitlichen Verlauf können in einigen Fällen weitere Schädigungen durch Komplikationen wie die Entstehung eines Hirnödems oder einer Hirnblutung beobachtet werden. Der Entstehung dieser Komplikationen geht eine Schädigung der BHS voraus, die sogar bei Patienten ohne komplikativen Krankheitsverlauf nachzuweisen ist. Auffällig ist dabei eine Verminderung der Konzentration von den für die Permeabilität der BHS bedeutenden TJ Proteine Claudin-5 und Occludin. Gleichzeitig kommt es zu einer Erhöhung der Konzentration und Aktivität der MMP9, die dazu in der Lage ist, diese beiden TJ

Proteine zu Spalten und damit abzubauen. Die Erhöhung von MMP9 Konzentration und Aktivität ist dabei unter anderem auf eine vermehrte Freisetzung aus Mikroglia zurückzuführen. Neben Entzündungsmediatoren kann auch t-PA LRP1-abhängig diese Freisetzung stimulieren. Vor diesem Hintergrund konnte bereits eine gesteigerte MMP9 Freisetzung und damit einhergehend ein gesteigerter Abbau von TJ Proteinen mit resultierender Schädigung der BHS nach einer Schlaganfalltherapie mit rt-PA (Actilyse®) nachgewiesen werden (8, 9, 11–13, 17, 71). Kontrovers wird aktuell der Ursprung der MMP9 diskutiert. Neben einer t-PA und LRP1-abhängigen MMP9 Freisetzung aus Mikrogliazellen konnten einige Autoren auch eine Freisetzung aus Endothelzellen beobachten (15, 17, 65). Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass die Freisetzung von MMP9 aus Endothelzellen nur eine untergeordnete Rolle gegenüber einer Freisetzung aus Mikroglia spielt. In unseren Versuchen mit Endothelzellen konnten wir weder höhere Konzentrationen der MMP9, noch verringerte Konzentrationen von Claudin-5 nach rt-PA Inkubation beobachten. Das spricht dafür, dass rt-PA weder durch eine Steigerung der MMP9 Freisetzung, noch durch eine direkte Interaktion mit Endothelzellen dazu in der Lage ist, die Claudin-5 Konzentration zu beeinflussen. Die hier durchgeführte alleinige Messung der Claudin-5 Konzentration kann dabei lediglich einen Aspekt der Schädigung einer Endothelzellbarriere abbilden. Durch die besondere Rolle von Claudin-5 für die Permeabilität der BHS ist seine Konzentration allerdings ein entscheidender Einflussfaktor (9). Um die Auswirkungen der rt-PA Inkubation möglichst genau und ohne andere Störfaktoren untersuchen zu können, wurden die Endothelzellen mit serumfreiem Medium mit oder ohne rt-PA inkubiert. Dadurch konnten direkte Interaktionen zwischen rt-PA und den Endothelzellen genau untersucht werden. Indirekte Effekte, die durch das Enzym Plasminogen, das normalerweise in Anwesenheit von t-PA in seine enzymatisch aktive Form Plasmin umgewandelt wird, konnten dagegen nicht erfasst werden. Obwohl Plasmin eine Vielzahl an Interaktionspartnern und Substraten hat, konnten in vorherigen Untersuchungen bereits einige durch t-PA und LRP1 Interaktion hervorgerufene Effekte als plasminunabhängig identifiziert werden (65, 70). Die Verwendung von serumfreiem Medium führt neben der fehlenden Berücksichtigung von Plasmin auch zu einer Beeinträchtigung des Zellwachstum und im Zeitlichen Verlauf sogar Absterben der Zellen. Das macht eine Beobachtung der Zellen über den Zeitraum von 24 h nach der rt-PA Inkubation unmöglich. Der Einfluss von rt-PA auf langfristige Veränderungen der Protein- und Enzymkonzentrationen durch eine möglicherweise veränderte Expression können daher in diesem Versuchsaufbau nicht gemessen werden. Die Rolle einer veränderter Expressionen von TJ Proteinen oder der MMP9 und deren Bedeutung für auf das Auftreten von schwerwiegenden Komplikationen eines Schlaganfalls im Zusammenhang mit einer thrombolytischen Therapie ist nicht vollständig geklärt (70). Es ist allerdings davon auszugehen, dass eine gesteigerte Expression der MMP9 im Gegensatz zu einer vermehrten Freisetzung aus intrazellulären Speichern erst im weiteren Verlauf, nicht aber in der Akutsituation einer Ischämie Auswirkungen auf die Konzentration von TJ Proteinen und die Integrität der BHS hätte. Insgesamt konnten im dargestellten Versuchsaufbau zwar keine Änderung der Konzentrationen der MMP9 oder von Claudin-5 nach rt-PA Inkubation beobachtet werden, durch die gewählte Methode konnten allerdings zum einen keine sehr geringen Konzentrationsänderungen gemessen werden und zum anderen keine Aussage über den funktionellen Zustand einer Zellbarriere getroffen werden, weshalb weitere Experimente für eine differenzierte Aussage benötigt wurden. Ein weiterer nicht abgebildeter Aspekt ist die Tatsache, dass die meisten Autoren eine t-PA-bedingte Schädigung der BHS vor allem unter ischämischen Bedingungen nachweisen konnten (17, 62, 68). Es konnte dabei gezeigt werden, dass t-PA sowohl die initiale Permeabilitätserhöhung in der Frühphase nach einer Ischämie vermittelt, sondern auch über eine gesteigerte Freisetzung von MMP9 zu einem Abbau von TJ Proteinen wie Claudin-5 beiträgt. Da die durchgeführten Experimente nicht unter sauerstoffarmen Bedingungen durchgeführt wurden, kann insbesondere über die t-PA-vermittelte Permeabilitätssteigerung während der Frühphase einer Ischämie nur eine eingeschränkte Aussage getroffen werden. Da in der Frühphase nach einer

Ischämie die BHS weitestgehend intakt bleibt, erscheinen in dieser frühen Phase auch andere Mechanismen als die t-PA und LRP1 vermittelte Steigerung von Konzentration und Aktivität der MMP9 und dem resultierenden Abbau von TJ Protein Proteinen beteiligt zu sein (11).

5.2 Auswirkungen von rt-PA auf die Barriereigenschaften von Endothelzellen

Bereits vor Eintreten der Schädigung der BHS nach einer Ischämie kommt es in der Frühphase, unmittelbar nach deren Einsetzen zu Funktionsstörungen der BHS. Besonders wichtig ist die von einigen Autoren beschriebene Hyperpermeabilität der BHS und der damit einhergehende Verlust der Selektivität der BHS für transportierte Stoffe (12, 61). Auf welche Weise t-PA, möglicherweise LRP1-abhängig, diese initiale Hyperpermeabilität beeinflusst, ist nicht vollständig geklärt. Eine Beteiligung von t-PA erscheint allerdings sehr wahrscheinlich, da t-PA die Permeabilität und Schädigung der BHS über diverse Mechanismen beeinflussen kann (9, 17, 25, 62, 63, 65, 71). Um einen Einfluss von rt-PA auf die Permeabilität einer Zellbarriere zu untersuchen, haben wir die parazelluläre Diffusion von FITC-Dextran, sowie die TEER Werte in unserm *in vitro* Modell der BHS während Inkubation mit rt-PA gemessen. Selbst 24 h nach der Inkubation mit rt-PA konnten wir keine vermehrte parazelluläre Diffusion im Vergleich zu unbehandelten Zellen zeigen. Ebenfalls konnten wir keinen signifikanten Unterschied der TEER Werte nach 24 h zwischen rt-PA inkubierten und unbehandelten Zellen messen. Den einzigen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnten wir sechs Stunden nach rt-PA Inkubation beobachten. Die rt-PA inkubierten Zellen zeigten zu diesem Zeitpunkt einen niedrigeren TEER Wert als die unbehandelte Kontrollgruppe. Im zeitlichen Verlauf ließ sich dieser Unterschied allerdings nicht mehr nachweisen. Insgesamt entsprechen diese Beobachtungen also denen der vorangegangenen Experimente. In Anwesenheit von rt-PA konnten wir weder veränderte Konzentrationen von MMP9 oder Claudin-5 messen, noch bestand ein funktioneller Unterschied zwischen rt-PA inkubierter und unbehandelter Kontrollgruppe. Gerade der Zeitpunkt 24 h nach Inkubation ist dabei besonders interessant, da zu diesem Zeitpunkt bereits Veränderungen der TJ-Protein Konzentrationen und Änderungen der Permeabilität der BHS bei einem Schlaganfall nachweisbar sind (9). Für die Messungen der Barriereigenschaften der Zellen in unserem *in vitro* Modell der BHS wurde das CellZscope verwendet. Dabei handelt es sich um ein etabliertes System zur Charakterisierung von Zellbarrieren in Form von TEER Werten und Kapazität (81, 83, 96). Die Aussagekraft des TEER Wertes im Hinblick auf die Funktionalität einer Zellbarriere ist dabei begrenzt. Daher wurde zusätzlich zur Messung der TEER Werte die parazelluläre Diffusion von FITC-Dextran bestimmt. Insgesamt deuten die von uns beschriebenen Ergebnisse darauf hin, dass es weder funktionelle, noch durch TEER Werte repräsentierte strukturelle Unterschiede zwischen mit rt-PA inkubierten Endothelzellen und der unbehandelten Kontrollgruppe gibt. Die Tatsache, dass es keinen Unterschied der parazellulären Diffusion zwischen rt-PA inkubierten und unbehandelten Kontrollzellen gibt, stützt diese Annahme. Vor diesem Hintergrund erscheint der gemessene Unterschied der TEER Werte 6 h nach rt-PA Inkubation zumindest für die Funktion der Endothelbarriere unbedeutend. Die Messung der parazellulären Diffusion zu verschiedenen Zeitpunkten könnte in diesem Fall weitere Erkenntnisse bringen, wurde allerdings aufgrund des nach 24 h gleichen Ergebnisses nicht vorgenommen. Obwohl die Messung der parazellulären Diffusion zusätzlich zu den TEER Werten eine bessere Beurteilung der Ergebnisse besonders im Hinblick auf die Funktion der Endothelbarriere erlaubt, stellt sie auch eine Schwachstelle des experimentalen Aufbaus dar. Um eine möglichst genaue Fluoreszenzmessung zu ermöglichen, wurden die Versuche mit

phenolrot- und serumfreiem Medium durchgeführt, da sowohl der Farbstoff, als auch im Serum enthaltene Proteine mit der Messung interferieren könnten. In serumfreiem Medium zeigen die Zellen im Allgemeinen ein verlangsamtes Wachstumsmuster und können nicht über längere Zeit kultiviert werden. Dieser Zusammenhang könnte erklären, warum die TEER Werte mit zunehmender Dauer der Beobachtung kontinuierlich abgefallen sind. Trotzdem erlaubt der direkte Vergleich beider Gruppen die Aussage, dass eine rt-PA Inkubation nicht zu einer in diesem Versuchsaufbau messbaren Verschlechterung der Barriereigenschaften oder einen schnelleren Abfall der TEER Werte führt. Durch die Verwendung von serumfreiem Medium können auch weitere Effekte, die auf einen regelhaften Zellstoffwechsel unter normalen Bedingungen angewiesen sind, nicht erfasst werden. In gleicher Weise kann der Einfluss von Plasmin, das als Produkt der von t-PA katalysierten Spaltung von Plasminogen nur in serumhaltigem Medium auftritt, nicht beurteilt werden. Die alleinige Verwendung von Endothelzellen hat auch hier zur Folge, dass zwar die Interaktionen mit Endothelzellen gut beurteilt werden können, Effekte die von anderen an der Ausbildung der BHS beteiligten Zellen hervorgerufen werden jedoch nicht beurteilt werden können. Die BHS ist vielmehr durch das Zusammenwirken verschiedener Zelltypen, die sich gegenseitig beeinflusst charakterisiert (10). Während ein Modell bestehend aus verschiedenen Zelltypen die tatsächlichen Verhältnisse der BHS *in vivo* genauer repräsentiert, erlaubt ein nur aus Endothelzellen bestehendes Modell eine Beurteilung der Rolle isolierter Endothelzellen am t-PA und LRP1 abhängigen Zusammenbruch der BHS, weshalb es für die Fragestellung dieser Arbeit besser geeignet scheint. Aus diesem Grund wurden auch weitere Auslöser einer BHS Schädigung wie ein sauerstoff- und glukosearmes Milieu oder Mediatoren von Entzündungsreaktionen, sowie reaktive Sauerstoffspezies nicht beurteilt (8, 11, 12). Da in diesen speziell auf die Endothelzellen ausgelegten Experimenten keine Veränderung von TJ Protein und MMP9 Konzentrationen, sowie TEER Werten oder parazellulärer nach rt-PA Inkubation messbar war, konnten folgende Hypothese aufstellen: Eine alleinige Interaktion von rt-PA und Endothelzellen liefert keinen Hinweis auf die von vielen Autoren beschriebenen schädlichen Effekte von t-PA auf eine Endothelbarriere wie die BHS. Eine Interaktion von rt-PA und anderen Zelltypen die an der Ausbildung der BHS beteiligt sind erscheint daher notwendig. Da Endothelzellen im direkten Kontakt zum Blut stehen ist der Transport von t-PA über eine Endothelzell Barriere Voraussetzung für eine Interaktion von t-PA und anderen Zelltypen der BHS. Daher kommt diesem LRP1-abhängigen Transport von t-PA eine besondere Rolle zu.

5.3 LRP1-abhängige Aufnahme von rt-PA in CHO Zellen

LRP1 wurde als Mitglied der LDL-Rezeptor Genfamilie zunächst als ein Zelloberflächenrezeptor beschrieben, der am Lipidstoffwechsel beteiligt ist. Darüber hinaus konnte eine Beteiligung von LRP1 an Vorgängen der zellulären Signalübermittlung und am Transport von Liganden nachgewiesen werden (41). Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der LDL-Rezeptor Genfamilie konnte für LRP1 eine Vielzahl verschiedenen Liganden identifiziert werden. Dafür verantwortlich ist die Ausstattung von LRP1 mit insgesamt vier verschiedenen ligandenbindenden Domänen (46, 48). Sowohl t-PA, als auch der Komplex aus t-PA und seinem Inhibitor PAI-1 sind Liganden von LRP1 und binden an die ligandenbindenden Domänen II und IV. Neben durch die Interaktion von t-PA und LRP1 vermittelten Prozessen der zellulären Signalübermittlung konnte auch ein LRP1-abhängiger Transport von t-PA über die BHS gezeigt werden (15, 72). Die LRP1- und t-PA-abhängigen Vorgänge scheinen in der Pathologie der BHS während des Schlaganfalls eine entscheidende Rolle zu spielen (17, 61, 62, 64, 65, 67, 68, 71, 72). Eine Blockade dieser Interaktionen könnte demnach protektive

Effekte haben. Um zu untersuchen, ob die Interaktion von t-PA und LRP1 durch die Gabe eines gegen die ligandenbindenden Domänen II und IV von LRP1 gerichteten monoklonalen Antikörpers möglich ist, haben wir die LRP1-abhängige Internalisation von rt-PA untersucht. Dass eine Inhibition der t-PA Aufnahme durch Blockade von LRP1 grundsätzlich möglich ist, konnte bereits gezeigt werden (26). Die Fähigkeit unseres LRP1 Antikörpers 11E2 ebenfalls die rt-PA Aufnahme zu blockieren, haben wir an seiner Aufnahme in CHO Zellen untersucht. Auch wenn der verwendete Zelltyp keine Aussage über LRP1-abhängige Vorgänge innerhalb der BHS zu treffen, eignen sich gut um generell die Interaktion von t-PA und LRP1 zu untersuchen. In einem robusten Versuchsaufbau konnten wir im Vergleich von LRP1 exprimierenden CHO K1 Zellen mit LRP1 defizienten CHO 13-5-1 Zellen nur eine rt-PA Aufnahme in Anwesenheit von LRP1 nachweisen. Durch die gleichzeitige Applikation des LRP1 Antikörpers 11E2 konnten wir die rt-PA Aufnahme in LRP1 exprimierenden Zellen fast vollständig verhindern. Damit konnten wir beweisen, dass auch der von uns genutzte LRP1 Antikörper 11E2 zur Blockade der Interaktion von rt-PA und LRP1 geeignet ist. Die Tatsache, dass die rt-PA Aufnahme nahezu vollständig durch den Antikörper blockiert wurde, zeigt auch, dass LRP1 nicht nur ein, sondern vermutlich der wichtigste endozytotische Rezeptor für rt-PA ist. Die Internalisation von t-PA ist physiologisch in der Leber zu beobachten, wo t-PA und t-PA-PAI-1 Komplexe nach der zellulären Aufnahme abgebaut werden (23, 24, 26). Im Zusammenhang mit dieser LRP1-abhängigen Aufnahme von t-PA aus dem Gefäßsystem in die Leber könnte ein therapeutisch genutzter LRP1 Antikörper Einfluss auf eine Schlaganfalltherapie mit rt-PA nehmen. Eine LRP1 Blockade könnte zu einer verminderten rt-PA Aufnahme in die Leber und somit zu einer Verlängerung der HWZ von rt-PA im Blut führen. Das könnte möglicherweise die Thrombolyse effizienter machen oder sogar eine Reduktion der benötigten rt-PA Konzentration ermöglichen. In den beschriebenen Experimenten wurde eine vergleichsweise hohe Konzentration des Antikörpers von 100 µg/ml verwendet, um einen möglichst eindeutigen Effekt zu sehen. Wahrscheinlich würde auch weitaus geringere Mengen des Antikörpers ausreichen, um ähnliche Effekte zu erzielen (42). Eine genauere Untersuchung der tatsächlich benötigten Konzentration wäre daher vor weiteren Experimenten sinnvoll. Da auch die Versuche zur LRP1-abhängigen Aufnahme von rt-PA mit serumfreiem Medium durchgeführt wurden, konnten eventuelle Interaktionen des Antikörpers wie beispielsweise unspezifische Bindungen mit im Serum enthaltenden Stoffen nicht beurteilt werden. Eine weitere Einschränkung in der Aussagekraft der Versuche ist die Wahl der Zellen. Da die verwendeten CHO Zellen aus dem Ovar stammen, könnten eventuelle gewebsspezifische Besonderheit der an den t-PA und LRP1 Interaktionen beteiligten Zellen nicht abgebildet werden. Auch die Tatsache, dass es sich um immortalisierte Zellen mit einem veränderten Wachstumsmuster handelt, könnte die Ergebnisse beeinflusst haben. Mittels Westen-Blot wurde in den Versuchen die Konzentration von LRP1 gemessen. Diese Methode erlaubt keine genaue Quantifizierung und kann keine eventuell vorhandenen Veränderungen der Expressionen von LRP1 gegenüber primären Zellen nachweisen. Trotzdem belegen die Ergebnisse eindrücklich die Wirksamkeit des LRP1 Antikörpers 11E2 hinsichtlich der Blockade der Internalisierung von rt-PA. Der 11E2 Antikörper scheint somit für weitere Experimente, welche die BHS und ihre Pathologien besser repräsentieren können, gut geeignet zu sein.

5.4 LRP1-abhängiger Transport von rt-PA über eine Endothelbarriere

In den vorliegenden Untersuchungen konnte kein Anhalt dafür gefunden werden, dass rt-PA dazu in der Lage ist, eine aus isolierten Endothelzellen bestehende Zellbarriere funktionell oder im Hinblick auf die Konzentrationen von TJ Proteinen negativ zu beeinflussen. Auf

Grundlage dessen entwickelten wir die Hypothese, dass für die in der Literatur beschriebenen schädlichen Effekte der Interaktion von t-PA und LRP1 eine Interaktion mit anderen Zelltypen im Hirnparenchym entscheidend ist. Voraussetzung dafür, dass rt-PA aus dem Blutstrom mit anderen im Hirnparenchym lokalisierten Zellen in Kontakt kommt, ist ein Transport über die BHS, beziehungsweise die Endothelzellbarriere der BHS. Die Blockade der Interaktion und somit des Transportes von t-PA durch LRP1 könnte dazu beitragen, schädliche Effekte auf die BHS zu minimieren. Neben einer t-PA und LRP1 vermittelten Schädigung der BHS sind auch weitere schädliche Effekte innerhalb des Hirnparenchyms denkbar. Ein verminderter t-PA Transport in das Hirnparenchym könnte auch zu einer Verringerung exzitotoxischer t-PA Effekte auf Neurone führen. Diese t-PA vermittelten schädlichen Effekte zu minimieren scheint besonders während einer thrombolytischen Therapie des ischämischen Schlaganfalls sinnvoll, da dort t-PA in hohen Konzentrationen verabreicht wird. LRP1 konnte bereits als wichtiger Rezeptor in der Aufnahme von zirkulierendem t-PA in die Leber identifiziert werden (23, 24, 26). Über die Aufnahme in die Leber konnte auch ein LRP1-abhängiger Transport von t-PA über die BHS nachgewiesen werden (61, 72). Ein vielversprechender Ansatz, diesen Transport zu modulieren, ist die Verwendung eines gegen die t-PA bindenden Domänen von LRP1 gerichteten monoklonalen Antikörpers. Der von uns verwendete LRP1 Antikörper 11E2 eignete sich in den Versuchen zur LRP1-abhängigen rt-PA Internalisation dazu, die Interaktion von LRP1 und rt-PA zu verhindern. Auch in den darauf durchgeführten Versuchen zum rt-PA Transport in unserem *in vitro* Modell der BHS konnten wir einen verminderten Transport in Anwesenheit des 11E2 Antikörpers beobachten. Bei einer genauen Betrachtung der gemessenen Parameter erscheinen diese Resultate insgesamt stimmig. Die untersuchten Zellen wurden anhand der gemessenen TEER Werte in zwei Gruppen eingeteilt. Es konnte nach Abschluss der Versuche kein signifikanter Unterschied der parazellulären Diffusion zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Die insgesamt geringe parazelluläre Diffusion weist darüber hinaus auf eine intakte und dichte Zellbarriere hin. Eine möglichst genau Messung des transportierten t-PA konnte durch radioaktive Markierung mit ¹²⁵I gewährleistet werden. Die Messung der Radioaktivität ist besonders sensitiv, da bereits sehr geringe Mengen verlässlich gemessen werden können. Die prozentuale Menge des transportierten rt-PA war insgesamt etwas höher als in vergleichbaren Messungen anderer Publikationen. Während dort ein t-PA Transport von etwa 4 % beschrieben wurde, konnten wir einen t-PA Transport von etwa 10 % beobachten. Das könnte damit zu erklären sein, dass für unsere Experimente lediglich Endothelzellen verwendet wurden. Im Gegensatz dazu erlaubt ein *in vitro* Modell einer Co-Kultur von Endothelzellen und Gliazellen eine genauere Abbildung der *in vivo* Verhältnisse mit insgesamt höheren TEER Werten (72). Eine Stärke der beschriebenen Versuche ist die Verwendung sowohl von immortalisierten bEnd.3, als auch primären mikrovaskulären Endothelzellen. Mögliche Unterschiede durch ein verändertes Wachstum von immortalisierten Zellen gegenüber primären Zellen konnte so berücksichtigt werden. Ein weiterer Aspekt ist die Wahl der Zeit, über die der rt-PA Transport untersucht wird. Aufgrund der Stimulation der Ausbildung von TJ Proteinen und somit des TEER Wertes durch Inkubation der Zellen mit serumfreiem Medium und Hydrokortison könnte es im weiteren Verlauf durch den Mangel an Serum im Medium zu Einschränkungen im zellulären Stoffwechsel kommen. Daher wurde eine relativ kurze Zeit von 60 min für den Transport gewählt. Eine Beobachtung über einen längeren Zeitpunkt könnte möglicherweise einen deutlicheren Effekt in der Reduktion des LRP1-abhängigen Transportes durch Antikörperinkubation ergeben. Im Zusammenhang mit dem zellulären Stoffwechsel wurden auch die sauerstoff- und glukosearmen Bedingungen, die im betroffenen Gebiet eines Schlaganfalls zu erwarten wären, nicht berücksichtigt. Dieser Aspekt erscheint weniger wichtig, wenn man den physiologischen LRP1-abhängigen Transport von LRP1 untersuchen will. Besonders in der Frühphase eines Schlaganfalls konnte allerdings ein zunehmender LRP1-unabhängiger Transport beschrieben werden (61, 72). Die Gabe eines LRP1 Antikörpers könnte allerdings auch bei einem gesteigerten, rezeptorunabhängigen Transport

positive Effekte haben. Bei einer unselektiv gesteigerten Permeabilität der BHS wäre auch eine Translokation von Antikörpern über BHS denkbar. Ein ins Hirnparenchym transportierte LRP1 Antikörper könnte somit Interaktionen von LRP1 und rt-PA direkt im Hirnparenchym hemmen. Das könnte auch die t-PA und LRP1-abhängige Freisetzung der MMP9 aus Mikrogliazellen beeinflussen und verringern.

5.5 Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur

Beim Vergleich der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse mit bereits publizierten Ergebnissen haben sich mehrere Schwierigkeiten ergeben. LRP1, t-PA und auch die Interaktion beider Partner sind Gegenstand aktueller Forschung und werden kontrovers diskutiert. Bereits die Charakterisierung der physiologischen Funktion von LRP1 gestaltet sich schwierig, da LRP1-Knockout Tiere nicht lebensfähig sind und bereits *in utero* versterben (38). Aufgrund der bedeutenden Funktionen von LRP1 für Entwicklungsprozesse ist daher nur eine gewebsspezifische Untersuchung der Funktionen von LRP1 in Tiermodellen mit einzelnen LRP1 defizienten Geweben möglich. Zudem erschwert die Tatsache, dass die Interaktionen von t-PA und LRP1 an vielfältigen, zum Teil sogar gegensätzlichen Effekten beteiligt sind, die Einordnung einzelner Ergebnisse in den Kontext. Eine scharfe Trennung zwischen physiologischer und pathologischer, sowie protektiver und schädlicher Funktion ist insbesondere bei neurologischen Erkrankungen nur schwer möglich. Die therapeutische Nutzung von gegen LRP1 gerichteten Antikörpern birgt somit möglicherweise unentdeckte Risiken. Neben möglichen protektiven Effekten könnte die Verhinderung der Interaktion von t-PA und LRP1 auch zum Wegfallen protektiver Effekte führen (17). Trotzdem gibt es bereits vielversprechende Arbeiten, in denen insgesamt ein positiver Einfluss einer LRP1 Blockade im Zusammenhang des Schlaganfalls nachgewiesen werden konnten. In den meisten Studien wurde für eine solche Blockade das RAP genutzt (62, 73). Im direkten Vergleich zwischen einer LRP1 Blockade durch RAP oder einen monoklonalen Antikörper erscheint ein Antikörper sinnvoller. Im Gegensatz zu RAP erlaubt ein monoklonaler Antikörper eine wesentlich spezifischere Blockade von LRP1, ohne andere Mitglieder der LDLR-Genfamilie zu blockieren. Durch die unspezifische Blockade auch anderer Vertreter der LDLR-Genfamilie könnten weitaus schwerwiegendere Nebenwirkungen entstehen als auch einer alleinigen Blockade von LRP1. Des Weiteren ist die therapeutische Nutzung von monoklonalen Antikörpern mittlerweile gut erforscht und die zu erwartenden Nebenwirkungen, sowie deren Therapie sind zu großen Teilen bekannt (97).

6 Zusammenfassung

Ein entscheidender Schritt in der Pathogenese des ischämischen Schlaganfalls ist die Schädigung und schließlich der Zusammenbruch der BHS. Die Permeabilitätsänderung der BHS ist ein wichtiger Meilenstein in der Entstehung von schlaganfallbedingten Komplikationen wie der Ausbildung eines Hirnödems oder einer Hirnblutung (11). Maßgeblich an diesen Prozessen beteiligt ist der Abbau von TJ Proteinen, insbesondere von Claudin-5 (9). Bei Schlaganfallpatienten konnte eine Erhöhung der Konzentration von MMPs wie der MMP2 und der MMP9 festgestellt werden. Bei MMPs handelt es sich um induzierbare Endopeptidasen,

die dazu in der Lage sind diverse Proteine die an der Formation der EZM, sowie der BHS beteiligt sind, zu spalten (8, 13). Nach einer thrombolytischen Therapie mit rt-PA konnte ein verstärkter Zusammenbruch der BHS, einhergehend mit einer gesteigerten Degeneration von TJ Proteinen wie Claudin-5 beobachtet werden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass rt-PA den Abbau von TJ Proteinen während eines Schlaganfalls beschleunigt (11). Es ist in diesem Zusammenhang wahrscheinlich, dass rt-PA dabei mit dem an der Zelloberfläche lokalisierten Rezeptor LRP1 interagiert (15, 50). Es konnte bereits gezeigt werden, dass t-PA während eines Schlaganfalls eine LRP1-abhängige Erhöhung der Konzentration und Aktivität der MMP9 induzieren kann (17, 68). Neben Endothelzellen als Möglicher Quelle einer gesteigerten MMP9 Konzentration und Aktivität stehen insbesondere Mikrogliazellen unter Verdacht (8, 13, 15, 17, 65, 70). Voraussetzung dafür, dass rt-PA im Hirnparenchym zu einer Steigerung der MMP9 Freisetzung führen kann, ist sein Transport über die BHS. Da LRP1 als Transportrezeptor für t-PA über eine intakte BHS identifiziert werden konnte, ist ein möglicher Ansatz zur Verringerung der t-PA-verursachten Nebenwirkungen einer Schlaganfalltherapie die Blockade der ligandenbindenden Domänen von LRP1 durch einen monoklonalen Antikörper (72). Aus den Ergebnissen der durchgeführten Experimente haben wir die Hypothese abgeleitet, dass rt-PA zunächst über die BHS transportiert werden muss, um die MMP9 oder Claudin-5 Konzentration, sowie die Barriereeigenschaften einer Endothelzellbarriere zu beeinflussen. Eine Änderung der MMP9 oder Claudin-5 Konzentration in isolierten endothelialen bEnd.3 Zellen konnte nach Inkubation mit hohen therapeutischen Konzentrationen von rt-PA nicht beobachtet werden. Auch eine Änderung der Barriereeigenschaften in Anwesenheit von rt-PA, repräsentiert durch Messung von TEER Werten, sowie der parazellulären Diffusion von FITC-markiertem Dextran, konnte an isolierten Endothelzellen nicht nachgewiesen werden. Wir konnten zeigen, dass die Internalisierung von rt-PA, sowie der Transport über eine Endothelzellbarriere LRP1-abhängig ist. Sowohl die Internalisierung, also auch der Transport von rt-PA konnte dabei durch die Zugabe des gegen die ligandenbindenden Domänen II und IV gerichteten monoklonalen Antikörpers 11E2 signifikant reduziert werden. Somit konnten wir die bereits beschriebene Rolle von LRP1 als Transportrezeptor für t-PA bestätigen. Davon ausgehend, dass ein Großteil der während eines Schlaganfalls freigesetzten MMP9 ihren Ursprung in Mikroglia hat, ist ein t-PA Transport über die BHS Voraussetzung für eine t-PA vermittelt gesteigerte Freisetzung (17, 61, 68, 69, 72). Andere Autoren konnte bereits erfolgreich den LRP1-abhängigen Transport, sowie weitere t-PA-abhängige Effekte durch Blockade von LRP1 verhindert (14, 62, 73, 74). In den meisten Publikationen wurde dabei RAP als Inhibitor für LRP1 verwendet (49). Trotz vielversprechender Ergebnisse *in vivo* erscheint eine therapeutische Nutzung von RAP aufgrund mangelnder klinischer Erfahrungen und der Tatsache, dass es eine Wirkung auf sämtliche Mitglieder der LDLR-Familie hat, der Verwendung eines monoklonalen LRP1 Antikörpers unterlegen (62, 65, 73). Monoklonale Antikörper wirken im Vergleich zu RAP spezifischer und die therapeutische Nutzung, sowie mögliche Nebenwirkungen sind gut untersucht (97). Neben den bereits beschriebenen Effekten könnte eine LRP1 Blockade auch einen weiteren Nutzen haben. t-PA hat eine vergleichsweise kurze HWZ im Gefäßsystem, da es rasch LRP1-vermittels in die Leber aufgenommen und abgebaut wird (16, 24). Eine Blockade von LRP1 könnte zu gesteigerten Konzentrationen und einer insgesamt verlängerten HWZ im Gefäßsystem führen, was möglicherweise einen positiven Effekt auf eine thrombolytische Therapie haben könnte. Insgesamt bleiben die komplexen und diversen Prozesse, die von einer Interaktion von t-PA und LRP1 abhängen nur unvollständig verstanden. Ein besseres Verständnis dieser Interaktion könnte nicht nur im Fall des Schlaganfalls, sondern auch bei anderen neurologischen Erkrankungen zu neuen Erkenntnissen führen, sodass die Interaktion von t-PA und LRP1 weiterhin ein vielversprechendes Thema Forschung ist.

7 Literatur

1. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2020; 141(9):e139-e596. doi: 10.1161/CIR.0000000000000757.
2. Radu RA, Terecoasă EO, Băjenaru OA, Tiu C. Etiologic classification of ischemic stroke: Where do we stand? *Clin Neurol Neurosurg* 2017; 159:93–106. doi: 10.1016/j.clineuro.2017.05.019.
3. www.world-stroke.org. WSO_Global_Stroke_Fact_Sheet.
4. Phipps MS, Cronin CA. Management of acute ischemic stroke. *BMJ* 2020; 368:l6983. doi: 10.1136/bmj.l6983.
5. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 1995; 333(24):1581–7. doi: 10.1056/NEJM199512143332401.
6. Rha J-H, Saver JL. The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke* 2007; 38(3):967–73. doi: 10.1161/01.STR.0000258112.14918.24.
7. Ringelb PA, Hamann GF, Röther J, Jansen O, Groden C, Veltkamp R. Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls - Ergänzungen 2015 2015.
8. Abdullahi W, Tripathi D, Ronaldson PT. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection. *Am J Physiol Cell Physiol* 2018; 315(3):C343-C356. doi: 10.1152/ajpcell.00095.2018.
9. Lv J, Hu W, Yang Z, Li T, Jiang S, Ma Z et al. Focusing on claudin-5: A promising candidate in the regulation of BBB to treat ischemic stroke. *Prog Neurobiol* 2018; 161:79–96. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.12.001.
10. Muoio V, Persson PB, Sendeski MM. The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiol (Oxf)* 2014; 210(4):790–8. doi: 10.1111/apha.12250.
11. Jiang X, Andjelkovic AV, Zhu L, Yang T, Bennett MVL, Chen J et al. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. *Prog Neurobiol* 2018; 163-164:144–71. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.10.001.
12. Merali Z, Huang K, Mikulis D, Silver F, Kassner A. Evolution of blood-brain-barrier permeability after acute ischemic stroke. *PLoS ONE* 2017; 12(2):e0171558. doi: 10.1371/journal.pone.0171558.
13. Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* 2001; 21(19):7724–32.
14. Suzuki Y, Nagai N, Yamakawa K, Kawakami J, Lijnen HR, Umemura K. Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein. *Blood* 2009; 114(15):3352–8. doi: 10.1182/blood-2009-02-203919.
15. Hébert M, Lesept F, Vivien D, Macrez R. The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA). *Rev Neurol (Paris)* 2016; 172(3):186–97. doi: 10.1016/j.neurol.2015.10.002.
16. Loscalzo Joseph, Braunwald Eugene. Tissue Plasminogen Activator.
17. Zhu J, Wan Y, Xu H, Wu Y, Hu B, Jin H. The role of endogenous tissue-type plasminogen activator in neuronal survival after ischemic stroke: friend or foe? *Cell Mol Life Sci* 2019. doi: 10.1007/s00018-019-03005-8.

18. Levin EG, Santell L, Osborn KG. The expression of endothelial tissue plasminogen activator in vivo: a function defined by vessel size and anatomic location. *J Cell Sci* 1997; 110 (Pt 2):139–48.
19. Teesalu T, Kulla A, Simisker A, Sirén V, Lawrence DA, Asser T et al. Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system. *Thromb Haemost* 2004; 92(2):358–68. doi: 10.1160/TH02-12-0310.
20. Kruithof EKO, Dunoyer-Geindre S. Human tissue-type plasminogen activator. *Thromb Haemost* 2014; 112(2):243–54. doi: 10.1160/TH13-06-0517.
21. Fernández-Monreal M, López-Atalaya JP, Benchenane K, Léveillé F, Cacquevel M, Plawinski L et al. Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator? *Mol Cell Neurosci* 2004; 25(4):594–601. doi: 10.1016/j.mcn.2003.11.002.
22. Pawlak R, Magarinos AM, Melchor J, McEwen B, Strickland S. Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat Neurosci* 2003; 6(2):168–74. doi: 10.1038/nn998.
23. Bakhit C, Lewis D, Billings R, Malfroy B. Cellular catabolism of recombinant tissue-type plasminogen activator. Identification and characterization of a novel high affinity uptake system on rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1987; 262(18):8716–20.
24. Chandler WL, Alessi MC, Aillaud MF, Henderson P, Vague P, Juhan-Vague I. Clearance of tissue plasminogen activator (TPA) and TPA/plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) complex: relationship to elevated TPA. *Circulation* 1997; 96(3):761–8. doi: 10.1161/01.cir.96.3.761.
25. Melchor JP, Strickland S. Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb Haemost* 2005; 93(4):655–60. doi: 10.1160/TH04-12-0838.
26. Orth K, Willnow T, Herz J, Gething MJ, Sambrook J. Low density lipoprotein receptor-related protein is necessary for the internalization of both tissue-type plasminogen activator-inhibitor complexes and free tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 1994; 269(33):21117–22.
27. Bu G, Williams S, Strickland DK, Schwartz AL. Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(16):7427–31.
28. Andreasen PA, Sottrup-Jensen L, Kjølner L, Nykjaer A, Moestrup SK, Petersen CM et al. Receptor-mediated endocytosis of plasminogen activators and activator/inhibitor complexes. *FEBS Lett* 1994; 338(3):239–45.
29. Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R et al. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 1994; 368(6470):419–24. doi: 10.1038/368419a0.
30. Seeds NW, Basham ME, Haffke SP. Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(24):14118–23.
31. Madani R, Hulo S, Toni N, Madani H, Steimer T, Muller D et al. Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J* 1999; 18(11):3007–12. doi: 10.1093/emboj/18.11.3007.

32. Samson AL, Medcalf RL. Tissue-type plasminogen activator: a multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity. *Neuron* 2006; 50(5):673–8. doi: 10.1016/j.neuron.2006.04.013.
33. Seeds NW, Basham ME, Ferguson JE. Absence of tissue plasminogen activator gene or activity impairs mouse cerebellar motor learning. *J Neurosci* 2003; 23(19):7368–75.
34. Pawlak R, Nagai N, Urano T, Napiorkowska-Pawlak D, Ihara H, Takada Y et al. Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice. *Neuroscience* 2002; 113(4):995–1001. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00166-5.
35. Martin AM, Kuhlmann C, Trossbach S, Jaeger S, Waldron E, Roebroek A et al. The functional role of the second NPXY motif of the LRP1 beta-chain in tissue-type plasminogen activator-mediated activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 2008; 283(18):12004–13. doi: 10.1074/jbc.M707607200.
36. Siao C-J, Tsirka SE. Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *J Neurosci* 2002; 22(9):3352–8.
37. Ling C, Zou T, Hsiao Y, Tao X, Chen Z-L, Strickland S et al. Disruption of tissue plasminogen activator gene reduces macrophage migration. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 349(3):906–12. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.08.111.
38. Herz J, Bock HH. Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu Rev Biochem* 2002; 71:405–34. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135342.
39. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232(4746):34–47.
40. Willnow TE. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J Mol Med (Berl)* 1999; 77(3):306–15. doi: 10.1007/s001090050356.
41. Brown MS, Herz J, Goldstein JL. LDL-receptor structure. Calcium cages, acid baths and recycling receptors. *Nature* 1997; 388(6643):629–30. doi: 10.1038/41672.
42. Storck SE, Pietrzik CU. Endothelial LRP1 - A Potential Target for the Treatment of Alzheimer's Disease : Theme: Drug Discovery, Development and Delivery in Alzheimer's Disease Guest Editor: Davide Brambilla. *Pharm Res* 2017; 34(12):2637–51. doi: 10.1007/s11095-017-2267-3.
43. Auderset L, Cullen CL, Young KM. Low Density Lipoprotein-Receptor Related Protein 1 Is Differentially Expressed by Neuronal and Glial Populations in the Developing and Mature Mouse Central Nervous System. *PLoS ONE* 2016; 11(6):e0155878. doi: 10.1371/journal.pone.0155878.
44. Andersen OM, Dagil R, Kragelund BB. New horizons for lipoprotein receptors: communication by β -propellers. *J Lipid Res* 2013; 54(10):2763–74. doi: 10.1194/jlr.M039545.
45. Emonard H, Théret L, Bennisroune AH, Dedieu S. Regulation of LRP-1 expression: make the point. *Pathol Biol* 2014; 62(2):84–90. doi: 10.1016/j.patbio.2014.02.002.
46. Horn IR, van den Berg BM, van der Meijden PZ, Pannekoek H, van Zonneveld AJ. Molecular analysis of ligand binding to the second cluster of complement-type repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein. Evidence for an allosteric component in receptor-associated protein-mediated inhibition of ligand binding. *J Biol Chem* 1997; 272(21):13608–13.

47. Bres EE, Faissner A. Low Density Receptor-Related Protein 1 Interactions With the Extracellular Matrix: More Than Meets the Eye. *Front Cell Dev Biol* 2019; 7:31. doi: 10.3389/fcell.2019.00031.
48. Neels JG, van den Berg BM, Lookene A, Olivecrona G, Pannekoek H, van Zonneveld AJ. The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties. *J Biol Chem* 1999; 274(44):31305–11.
49. Willnow TE, Rohlmann A, Horton J, Otani H, Braun JR, Hammer RE et al. RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors. *EMBO J* 1996; 15(11):2632–9.
50. Lillis AP, Mikhailenko I, Strickland DK. Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. *J Thromb Haemost* 2005; 3(8):1884–93. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01371.x.
51. Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J* 1988; 7(13):4119–27.
52. May P, Herz J, Bock HH. Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(19-20):2325–38. doi: 10.1007/s00018-005-5231-z.
53. Candela P, Saint-Pol J, Kuntz M, Boucau M-C, Lamartiniere Y, Gosselet F et al. In vitro discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. *Brain Res* 2015; 1594:15–26. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.047.
54. Rohlmann A, Gotthardt M, Hammer RE, Herz J. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J Clin Invest* 1998; 101(3):689–95. doi: 10.1172/JCI1240.
55. Herz J, Gotthardt M, Willnow TE. Cellular signalling by lipoprotein receptors. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11(2):161–6.
56. Strickland DK, Ranganathan S. Diverse role of LDL receptor-related protein in the clearance of proteases and in signaling. *J Thromb Haemost* 2003; 1(7):1663–70. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00330.x.
57. Nikolakopoulou AM, Wang Y, Ma Q, Sagare AP, Montagne A, Huuskonen MT et al. Endothelial LRP1 protects against neurodegeneration by blocking cyclophilin A. *J Exp Med* 2021; 218(4). doi: 10.1084/jem.20202207.
58. Boucher P, Gotthardt M, Li W-P, Anderson RGW, Herz J. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* 2003; 300(5617):329–32. doi: 10.1126/science.1082095.
59. May P, Herz J. LDL receptor-related proteins in neurodevelopment. *Traffic* 2003; 4(5):291–301. doi: 10.1034/j.1600-0854.2003.00086_4_5.x.
60. Bacskai BJ, Xia MQ, Strickland DK, Rebeck GW, Hyman BT. The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(21):11551–6. doi: 10.1073/pnas.200238297.
61. Benchenane K, Berezowski V, Fernández-Monreal M, Brillault J, Valable S, Dehouck M-P et al. Oxygen glucose deprivation switches the transport of tPA across the blood-brain

- barrier from an LRP-dependent to an increased LRP-independent process. *Stroke* 2005; 36(5):1065–70. doi: 10.1161/01.STR.0000163050.39122.4f.
62. Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest* 2003; 112(10):1533–40. doi: 10.1172/JCI19212.
 63. Su EJ, Cao C, Fredriksson L, Nilsson I, Stefanitsch C, Stevenson TK et al. Microglial-mediated PDGF-CC activation increases cerebrovascular permeability during ischemic stroke. *Acta Neuropathol* 2017; 134(4):585–604. doi: 10.1007/s00401-017-1749-z.
 64. Benchenane K, López-Atalaya JP, Fernández-Monreal M, Touzani O, Vivien D. Equivocal roles of tissue-type plasminogen activator in stroke-induced injury. *Trends Neurosci* 2004; 27(3):155–60. doi: 10.1016/j.tins.2003.12.011.
 65. Chen Zhang, Jie An, Woldeab B Haile, Ramiro Echeverry, Dudley K Strickland, Manuel Yepes. Microglial low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates the effect of tissue-type plasminogen activator on matrix metalloproteinase-9 activity in the ischemic brain.
 66. Fredriksson L, Nilsson I, Su EJ, Andrae J, Ding H, Betsholtz C et al. Platelet-derived growth factor C deficiency in C57BL/6 mice leads to abnormal cerebral vascularization, loss of neuroependymal integrity, and ventricular abnormalities. *Am J Pathol* 2012; 180(3):1136–44. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.12.006.
 67. Su EJ, Fredriksson L, Geyer M, Folestad E, Cale J, Andrae J et al. Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat Med* 2008; 14(7):731–7. doi: 10.1038/nm1787.
 68. Zhang C, An J, Strickland DK, Yepes M. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates tissue-type plasminogen activator-induced microglial activation in the ischemic brain. *Am J Pathol* 2009; 174(2):586–94. doi: 10.2353/ajpath.2009.080661.
 69. Zhang C, An J, Haile WB, Echeverry R, Strickland DK, Yepes M. Microglial low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates the effect of tissue-type plasminogen activator on matrix metalloproteinase-9 activity in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29(12):1946–54. doi: 10.1038/jcbfm.2009.174.
 70. Hu K, Yang J, Tanaka S, Gonias SL, Mars WM, Liu Y. Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J Biol Chem* 2006; 281(4):2120–7. doi: 10.1074/jbc.M504988200.
 71. Wang X, Lee S-R, Arai K, Lee S-R, Tsuji K, Rebeck GW et al. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med* 2003; 9(10):1313–7. doi: 10.1038/nm926.
 72. Benchenane K, Berezowski V, Ali C, Fernández-Monreal M, López-Atalaya JP, Brillault J et al. Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation* 2005; 111(17):2241–9. doi: 10.1161/01.CIR.0000163542.48611.A2.
 73. Li D-D, Pang H-G, Song J-N, Zhao Y-L, Zhang B-F, Ma X-D et al. Receptor-associated protein promotes t-PA expression, reduces PAI-1 expression and improves neurorecovery after acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 2015; 350(1-2):84–9. doi: 10.1016/j.jns.2015.02.022.

74. Suzuki Y, Nagai N, Umemura K, Collen D, Lijnen HR. Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *J Thromb Haemost* 2007; 5(8):1732–9. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02628.x.
75. 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.
76. PUCK TT, CIECIURA SJ, ROBINSON A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* 1958; 108(6):945–56. doi: 10.1084/jem.108.6.945.
77. FitzGerald DJ, Fryling CM, Zdanovsky A, Saelinger CB, Kounnas M, Winkles JA et al. Pseudomonas exotoxin-mediated selection yields cells with altered expression of low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Cell Biol* 1995; 129(6):1533–41. doi: 10.1083/jcb.129.6.1533.
78. Yuen D, Leu R, Tse J, Wang S, Chen LL, Chen L. Novel characterization of bEnd.3 cells that express lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1. *Lymphology* 2014; 47(2):73–81.
79. Deli MA, Joó F. Cultured vascular endothelial cells of the brain. *Keio J Med* 1996; 45(3):183-98; discussion 198-9. doi: 10.2302/kjm.45.183.
80. Perrière N, Demeuse P, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux J-P et al. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J Neurochem* 2005; 93(2):279–89. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.03020.x.
81. Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud P-O, Deli MA et al. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab* 2016; 36(5):862–90. doi: 10.1177/0271678X16630991.
82. Deli MA, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol* 2005; 25(1):59–127. doi: 10.1007/s10571-004-1377-8.
83. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom* 2015; 20(2):107–26. doi: 10.1177/2211068214561025.
84. Hoheisel D, Nitz T, Franke H, Wegener J, Hakvoort A, Tilling T et al. Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244(1):312–6. doi: 10.1006/bbrc.1997.8051.
85. Brown RC, Morris AP, O’Neil RG. TIGHT JUNCTION PROTEIN EXPRESSION AND BARRIER PROPERTIES OF IMMORTALIZED MOUSE BRAIN MICROVESSEL ENDOTHELIAL CELLS. *Brain Res* 2006; 1130(1):17–30. doi: 10.1016/j.brainres.2006.10.083.
86. 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.
87. Duhamel RC, Schur PH, Brendel K, Meezan E. pH gradient elution of human IgG1, IgG2 and IgG4 from protein A-sepharose. *J Immunol Methods* 1979; 31(3-4):211–7. doi: 10.1016/0022-1759(79)90133-9.

88. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150(1):76–85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
89. Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 1994; 32:5–8. doi: 10.1385/0-89603-268-X:5.
90. Matsumoto H, Haniu H, Komori N. Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE. *Methods Mol Biol* 2019; 1855:101–5. doi: 10.1007/978-1-4939-8793-1_10.
91. Brunelle JL, Green R. Coomassie blue staining. *Methods Enzymol* 2014; 541:161–7. doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00013-6.
92. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981; 112(2):195–203. doi: 10.1016/0003-2697(81)90281-5.
93. Taylor SC, Posch A. The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int* 2014; 2014:361590. doi: 10.1155/2014/361590.
94. Markwell MA. A new solid-state reagent to iodinate proteins. I. Conditions for the efficient labeling of antiserum. *Anal Biochem* 1982; 125(2):427–32. doi: 10.1016/0003-2697(82)90025-2.
95. Koontz L. TCA precipitation. *Methods Enzymol* 2014; 541:3–10. doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00001-X.
96. Santa-Maria AR, Heymans M, Walter FR, Culot M, Gosselet F, Deli MA et al. Transport Studies Using Blood-Brain Barrier In Vitro Models: A Critical Review and Guidelines. *Handb Exp Pharmacol* 2020. doi: 10.1007/164_2020_394.
97. Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJT. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(4):325–38. doi: 10.1038/nrd3003.

8 Anhang

8.1 Danksagung

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Philip Herbert Klecker
Geburtsdatum: 10.03.1995
Nationalität: Deutsch

Ausbildung:

2001-2005: Grundschule Mönchengladbach Hardt
2005-2013: Bischöfliche Marienschule Mönchengladbach,
Abschluss mit Abitur
2013-2015: Ausbildung zum Rettungsassistenten
2016-2022: Studium der Humanmedizin an der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz
Sprachkenntnisse: Deutsch und Englisch fließend

Berufliche Tätigkeit:

2014-2016: Rettungsassistent beim Arbeiter-Samariter Bund Region
Düsseldorf e.V.
2016-2019: Study Assistant bei Profil Mainz GmbH & Co. KG
2019-2022: Rettungsassistent beim Malteser Hilfsdienst e.V.
Wiesbaden/Rheingau-Taunus-Kreis
Ab 2023: Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe
und Frauengesundheit der Universitätsmedizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Ehrenamtliche Tätigkeit:

2016-2022: Arbeiter-Samariter Bund Region Düsseldorf e.V.