

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

Entwicklung eines zielgerichteten Transportsystems über die Blut-Hirn-Schranke
mittels proteinmarkiertem LRP1

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

vorgelegt von

Miriam Victoria Hillmann
geb. in Hamburg

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand:

[REDACTED]

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter:

[REDACTED]

Tag der Promotion:

24. April 2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
2 Literaturdiskussion.....	3
2.1 Blut-Hirn-Schranke.....	3
2.1.1 Funktion.....	3
2.1.2 Aufbau.....	4
2.2 Medikamententransport über die Blut-Hirn-Schranke	7
2.2.1 Problematik	7
2.2.2 Klassische Verfahren.....	7
2.2.3 Überwindung der Blut-Hirn-Schranke	8
2.2.4 Öffnung der Blut-Hirn-Schranke.....	12
2.3 LRP1	14
2.3.1 LDL Rezeptor Familie	14
2.3.2 LRP1 Aufbau	15
2.3.3 Funktion.....	16
2.3.4 LRP1 als Zielstruktur für gerichteten Transport.....	17
3 Material.....	20
3.1 Chemikalien	20
3.2 Puffer und Lösungen	21
3.3 Kits.....	23
3.4 Zelllinien und Bakterien	23
3.5 Marker.....	23
3.6 Antikörper.....	24
3.7 Enzyme.....	25
3.8 Geräte.....	26
3.9 Verbrauchsmaterialien	27
3.10 Programme	27
4 Methoden	28
4.1 Zellkultur	28
4.1.1 Kultivieren und Passagieren	28
4.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen	29
4.1.3 Zellzahlbestimmung.....	29
4.2 Biochemische und analytische Methoden	30

4.2.1	Transfektionen.....	30
4.2.1.1	Transiente Transfektion.....	30
4.2.1.2	Stabile Transfektion	31
4.2.1.2.1	Antibiotische Tötungskurve	32
4.2.1.2.2	Einzelklon Selektion	32
4.2.2	Aufnahme von Antikörpern	32
4.2.3	Zelloberflächenbiotinylierung und Immunpräzipitation.....	33
4.2.4	Lyse der Zellen	34
4.2.5	Bestimmung der Proteinkonzentration – Bradford assay	34
4.2.6	TCA Fällung.....	35
4.2.7	SDS PAGE	35
4.2.8	Elektrophorese	36
4.2.9	Western Blot.....	36
4.2.10	Coomassie- Färbung.....	37
4.2.11	Immuno-Staining	37
4.3	DNA-Analyse und DNA-Klonierung.....	37
4.3.1	Polymerase Ketten Reaktion	38
4.3.2	Agarose-Gelelektrophorese	40
4.3.3	Verdau mit Restriktionsenzymen	41
4.3.4	DNA Ligation	42
4.3.5	Transformation chemisch kompetenter E.coli	42
4.3.6	Plasmid Präparation in Bakterien.....	43
4.3.7	DNA Sequenzierung.....	43
5	Ergebnisse	44
5.1	Klonierung in pcDNA.....	44
5.2	Klonierung in pAAV	46
5.3	Transfektionen	47
5.4	Stabile Transfektion bEnd.3	50
5.5	Vergleich der anti-Myc-Antikörper	51
5.5.1	Einzelklonselektion	53
5.6	Oberflächliche Bindung und Internalisierung von Antikörpern	54
5.6.1	CHO K1 Zellen	54
5.6.2	bEnd.3 Zellen	56
5.7	Oberflächenbiotinylierung der bEnd.3 Zellen.....	61
6	Diskussion.....	63
7	Zusammenfassung	71

8	Referenzen.....	72
9	Anhang.....	79
10	Danksagung	81
11	Tabellarischer Lebenslauf.....	82

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ABC-Tr.	ATP-binding Cassette Transporter
APS	Ammoniumpersulfat
Aβ	Amyloid-beta
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementary DNA
CHO	Chinese Hamster Ovary
CO ₂	Kohlendioxid
CpG	Cytosin-Phosphatrest-Guanin
CSF	cerebrospinale Flüssigkeit
ctrl	Kontrolle
Cu	Kupfer
d	Tag
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
E. coli	Escherichia coli
engl.	englisch
EZR	Extrazellulärraum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FPLC	Fast protein liquid chromatography
g	je nach Zusammenhang mittlere Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²) oder gramm
GST	Gluthation-S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HRP	horse radish peroxidase
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunglobulin G
IL-6-R	Interleukin-6-Rezeptor
IZR	Intrazellulärraum
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny Broth
LRP1	Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1
M	Molar (Mol/Liter)
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger-RNA
MS	Multiple Sklerose

ng	Nanogramm
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NVU	neurovaskuläre Unit
n.s.	nicht signifikant
OD600	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 Nanometern
PAGE	Polyacrylamid Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PEI	Polyethylenimin
P-gp	P-Glykoprotein
RNA	Ribonucleic acid
RPM	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfatyl
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	je nach Zusammenhang Valin oder Volt
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien.....	20
Tabelle 2: Puffer, Lösungen und deren Zusammensetzung	21
Tabelle 3: Kits	23
Tabelle 4: Zelllinien	23
Tabelle 5: Bakterien	23
Tabelle 6: Marker	24
Tabelle 7: Primärantikörper	24
Tabelle 8: Sekundärantikörper	25
Tabelle 9: Enzyme	25
Tabelle 10: Restriktionsenzyme	25
Tabelle 11: Geräte	26
Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien.....	27
Tabelle 13: Programme.....	27
Tabelle 14: Trypsinierung der Zelllinien.....	29
Tabelle 15: bEnd.3 Transfektion mit Lipofectamine	31
Tabelle 16: Aufnahme von Antikörpern	33
Tabelle 17: Pipettierschema BSA Standard	35
Tabelle 18: SDS-PAGE Sammelgel 1.5 mm	36
Tabelle 19: SDS-PAGE Trenngel 1.5 mm	36
Tabelle 20: Primer Klonierung pcDNA.....	39
Tabelle 21: Primer Klonierung pLBCX.....	39
Tabelle 22: Primer Klonierung pAAV	39
Tabelle 23: Ansatz PCR.....	40
Tabelle 24: PCR Amplifikation.....	40
Tabelle 25: Verdau mit Restriktionsenzymen	41
Tabelle 26: DNA Ligation	42

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau myc-LRPCT Rezeptor.....	2
Abbildung 2: Die neurovaskuläre Einheit.....	6
Abbildung 3: Wege über die Blut-Hirn-Schranke	12
Abbildung 4: Aufbau LRP1 Rezeptor.....	16
Abbildung 5: Aufbau myc-LRPCT Rezeptor.	44
Abbildung 6: Restriktionsverdau pcDNA-Leader-myc-LRPCT	45
Abbildung 7: Vektorkarte pcDNA-Leader-Myc-LRPCT	45
Abbildung 8: Restriktionsverdau pAAV-GFP-Leader-Myc-LRPCT.....	46
Abbildung 9: Vektorkarte pAAV-GFP-Leader-Myc-LRPCT	47
Abbildung 10: Transfektion mit myc-LRPCT.....	48
Abbildung 11: Transiente Transfektion des myc-LRPCT Konstruktes in bEnd.3.....	49
Abbildung 12: Restriktionsverdau pLBCX-Leader-Myc-LRPCT	50
Abbildung 13: Vektorkarte pLBCX-Leader-Myc-LRPCT	51
Abbildung 14: Vergleich anti-Myc-Antikörper in stabil transfizierten myc-LRPCT bEnd.3 Zellen.....	52
Abbildung 15: Einzel-Zell-Selektion nach der stabilen Transfektion (myc-LRPCT bEnd.3)	53
Abbildung 16: Oberflächlich gebundene Antikörper bei CHO K1 Zellen	55
Abbildung 17: Internalisierte Antikörper bei CHO K1 Zellen	56
Abbildung 18: Aufgenommene Antikörper bei myc-LRPCT bEnd.3 Zellen	57
Abbildung 19: Gebundene und aufgenommene Antikörper bei myc-LRPCT bEnd.3 Zellen nach unterschiedlichen Zeiträumen	58
Abbildung 20: Gebundene und aufgenommene Antikörper bei G7- myc-LRPCT bEnd.3 Zellen, inkubiert mit verschiedenen Mengen NH ₄ Cl	60
Abbildung 21: Basolateral aufgenommene Antikörper bei myc-LRPCT bEnd.3 Zellen	61
Abbildung 22: Oberflächenbiotinylierung myc-LRPCT bEnd.3 – Zellen	62
Abbildung 24: pAAV Vektorkarte	79
Abbildung 23: pcDNA Vektorkarte.....	79
Abbildung 25: pLBCX Vektorkarte.....	80

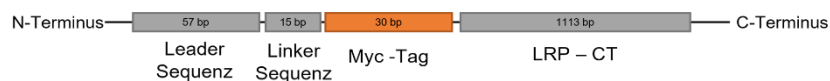
1 Einleitung

In Folge des demographischen Wandels und des stetigen medizinischen Fortschrittes, kommt es weltweit, aber vor allem in den Industrienationen, zu einem Anstieg der durchschnittlichen Lebenserwartung. Dies hat zur Folge, dass ein zunehmender Anteil der Bevölkerung an neurodegenerativen Erkrankungen leidet. Dazu gehören Erkrankungen wie beispielsweise die Alzheimer Demenz (AD), sowie andere Formen der Demenz, Morbus Parkinson, Multiple Sklerose, aber auch zerebrovaskuläre Krankheiten und verschiedene Hirntumore [1]. Es wird davon ausgegangen, dass die Anzahl der Betroffenen bis zum Jahr 2050 auf mehr als 3 Millionen Menschen in Deutschland und mehr als 16 Millionen Menschen in Europa ansteigt [2]. Neben dem Gesundheitsverlust des Individuums entwickelt sich daraus auch eine wachsende gesellschaftliche und volkswirtschaftliche Problematik.

Eines der größten Hindernisse bei der Therapie eben dieser Erkrankungen stellt die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) dar. Dies ist eine selektive Barriere zwischen Blutstrom und zentralem Nervensystem (ZNS), die von den meisten entwickelten Medikamenten nicht überwunden werden kann [3]. Die zentrale Herausforderung besteht also darin, Mechanismen zu entwickeln, mit denen die Therapeutika an ihren Wirkort – das Gehirn – gelangen können. Ein Ansatz, der dabei seit vielen Jahren verfolgt wird, ist die Nutzung bereits vorhandener Transportsysteme an der BHS. In diesem Zusammenhang ist den letzten Jahren der *low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)* Rezeptor intensiv untersucht worden. LRP1 bindet über 80 verschiedene Liganden und ist somit in viele verschiedene Stoffwechselwege eingebunden [4]. Zusätzlich sind Veränderungen in der Funktion von LRP1 auch mit der Pathogenese der Alzheimer Demenz assoziiert [5]. Aufgrund der zentralen Rolle im Rahmen Endozytose- und Transzytose, kommt LRP1 auch als möglicher Transporter von Medikamenten ins ZNS in Betracht [4].

Ziel dieser Arbeit war es, einen artifiziell modifizierten LRP1-Rezeptor herzustellen, in verschiedenen Zelllinien zu exprimieren und anhanddessen das Bindungs-, Aufnahme- und Transzytose-Verhalten von spezifischen Antikörpern (9E10) zu untersuchen. Dazu wurde an die c-terminalen 1113 Basenpaare des LRP1 Rezeptors an dem n-terminalen Ende der c-Myc-Tag fusioniert (s. Abbildung 1). C-Myc ist ein Transkriptionsfaktor und wird normalerweise in proliferierendem Gewebe überexprimiert [6]. Im labormethodischen Kontext wird der c-Myc-tag häufig als

Markierung zur Detektion von rekombinanten Proteinen genutzt. Entscheidend für diese Arbeit hingegen sind die Eigenschaften des c-Myc-tags sowie die Verfügbarkeit von entsprechenden Antikörpern [7]. Der an den hergestellten LRP1 Rezeptor gebundene c-Myc-tag hilft dabei, die Integration des Rezeptors in die Zielzellen zu detektieren und die Funktionalität zu untersuchen. Durch Herstellung eines funktionsfähigen artifiziellen LRP1 Rezeptor und Expression an der BHS eröffnet sich somit die Möglichkeit, wichtige Medikamente gegen neurodegenerative Krankheiten zielgerichtet an ihren Wirkungsort zu transportieren.

A**B**

GAA – CAA – AAA – CTT – ATT – TCT – GAA – GAA – GAT – CTG
 GLU – GLN – LYS – LEU – ILE – SER – GLU – GLU – ASP – LEU

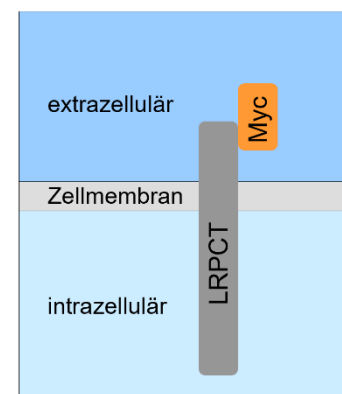
C

Abbildung 1: Aufbau myc-LRPCT Rezeptor.

- A. Sequenzabschnitte des Rezeptors
- B. Basen- und Aminosäuresequenz des myc-Tags
- C. Schematische Anordnung des Rezeptors in der Zellmembran

2 Literaturdiskussion

2.1 Blut-Hirn-Schranke

Im gesamten menschlichen Körper versorgen Blutgefäße das Gewebe und die Organe mit Nährstoffen. Außerdem sind die Blutgefäße für den Abtransport von Kohlenstoffdioxid und Stoffwechselabbauprodukten zuständig [8]. Die Gefäße im zentralen Nervensystem weisen dabei besondere Charakteristika auf, welche bereits Paul Ehrlich 1885 in Tierversuchen beobachtete. Er injizierte einen Farbstoff in den Blutstrom von Ratten und sah im peripheren Gewebe eine deutlich höhere Akkumulation als im neuronalen Gewebe [8][9]. In späteren elektronenmikroskopischen Aufnahmen und weiteren Experimenten zeigte sich, dass verschiedene Mechanismen auf strenge Art und Weise den Transport von Ionen, Molekülen und Zellen zwischen Blut und ZNS regulieren. Die dabei entstehende Grenze aus zellulären und nicht-zellulären Bestandteilen wird als Blut-Hirn-Schranke (BHS) bezeichnet [8].

Zusätzlich existieren im ZNS noch die Blut-Meningen-Schranke, sowie eine Barriere zwischen Blut und Cerebrospinalflüssigkeit. Diese werden im Folgenden nicht näher betrachtet.

2.1.1 Funktion

Die Hauptaufgabe der BHS besteht darin, eine aktiv regulierte Versorgung des ZNS mit Nährstoffen zu gewährleisten und gleichzeitig einen Schutz vor Toxinen, Entzündungen und Erkrankungen zu bieten [3]. Die neuronale Homöostase muss zu jeder Zeit innerhalb eines geringen Schwankungsbereich erhalten bleiben, um die neuronale Aktivität aufrechtzuerhalten [10]. Dafür gibt es BHS-spezifische Transporter, Rezeptoren und Signalwege, die Influx und Efflux modulieren. Durch junctionale Verbindungen entsteht zusätzlich ein hoher elektrischer Widerstand [11].

Nur wenige Areale im ZNS weisen anstelle einer BHS fenestrierte Kapillaren auf. Diese Areale werden als zirkumventrikuläre Organe bezeichnet. Dazu gehören: Plexus Choroideus, Eminentia mediana, Neurohypophyse, Area postrema, Epiphyse, Subfornikal- und Subkommissuralorgan. Diese Strukturen sind unter anderem an der Sekretion von neuroendokrinen Hormonen beteiligt und können durch uneingeschränkten Zugang zu der Blutzusammensetzung darauf reagieren [12].

2.1.2 Aufbau

Bei den zerebralen Gefäßen, welche Bestandteil der BHS sind, handelt es sich um kontinuierliche, nicht-fenestrierte Kapillaren, die die größte Austauschfläche zwischen Blut und Gehirn darstellen [13]. Dabei werden physikalische, metabolische und Transport Eigenschaften der physiologischen Barriere durch Endothelzellen ausgebildet. Die Regulation der Barriere geschieht durch verschiedene Gefäß-, Immun-, und neuronale Zellen [14]. Gemeinsam bilden sie die sogenannten neurovaskulären Einheiten (NVU), welche die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke an der Grenze zwischen Blut und ZNS induzieren (s. Abbildung 2) [8]. Zu den zellulären Bestandteilen gehören die Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten.

Die Endothelzellen bilden die innerste Schicht und damit die Wand des Blutgefäßes [10]. Die Neuroendothelzellen unterscheiden sich von peripheren Endothelzellen durch die fehlende Fenestrierung und die hochgradige Polarisierung, welche durch parazelluläre, junctionale Verbindungen herbeigeführt wird [15]. Durch die Polarisierung können die Neuroendothelzellen unterschiedliche Transporteigenschaften apikal und basal ausbilden. Dazu gehören die luminalen Efflux-Transporter, die potentielle lipophile Toxine, welche durch die Zellmembran diffundieren können, wieder nach extrazellulär hinaus transportieren [15]. Eine bekannte Gruppe dieser Efflux-Pumpen sind die ATP-binding cassette Transporter (ABC-Transporter), zu denen auch der P-Glykoprotein Transporter gehört [16]. Auch für die kontrollierte Versorgung mit Glucose und Aminosäuren gibt es spezifische Transporter, wie den GLUT1 oder den kationischen Aminosäuretransporter 1 [16]. Auffällig ist außerdem die niedrige Transzytose-Rate, welche den transzellulären Transport von Molekülen limitiert. Eine weitere Aufgabe der Neuroendothelzellen besteht in der Kontrolle der Leukozyteninfiltration über die BHS. Unter physiologischen Bedingungen zeigen die Neuroendothelzellen eine geringe Expression an Leukozyten-Adhensions-Molekülen. Unter pathologischen Bedingungen verändert sich dies und die Diapedese in das ZNS wird über zusätzliche Adhensions-Moleküle, wie das aktivierte Leukozyten-Adhensions-Molekül, hochreguliert [17]. Um die Integrität der BHS intakt zu halten, ist ein hoher Energieaufwand notwendig, weshalb Neuroendothelzellen eine vermehrte Anzahl Mitochondrien aufweisen [18].

Die abluminale Seite der Neuroendothelzellen wird von Perizyten bedeckt, welche in die gemeinsame, vaskuläre Basalmembran eingebettet sind. Im Vergleich zur

Peripherie ist der Umfang und das Verhältnis der Perizyten zu Neuroendothelzellen deutlich erhöht [11]. Perizyten haben weite Ausläufer und können mehrere Neuroendothelzellen umspannen. Sie enthalten kontraktile Elemente und können so den Durchmesser der Blutgefäße verändern [19]. Die Ausläufer haben keinen direkten Kontakt zu den Neuroendothelzellen, sondern sind über sogenannte peg- und socket-Kontakte verknüpft [14]. Zusätzlich spielen die Perizyten eine Rolle bei der Angiogenese, Gefäßstabilisierung, Kontrolle des zerebralen Blutflusses und der Leukozytentransmigration [3].

Astrozyten umgeben mit ihren Zellkörpern die Neurone und haben gleichzeitig mit ihren Ausläufern Kontakt zu der abluminalen Seite der Neuroendothelzellen [11]. So können sie, basierend auf neuronaler Aktivität, den Blutfluss und die Sauerstoffversorgung des Gehirns regulieren. Sie haben sowohl einen Einfluss auf die Induktion der BHS, sowie auf die Erhaltung der Integrität und die Anpassung an verschiedene Situationen [8]. Astrozyten sind über mehrere Mechanismen in die Hochregulation verschiedener Schrankeneigenschaften involviert. Über Erhöhung der Expression von Occludin und Claudin können sie Einfluss auf Tight Junctions nehmen [20]. Sie sezernieren außerdem Angiogenesefaktoren, wie VEGF, und Liganden von Rezeptoren der Neuroendothelzellen, wodurch junctionale Proteine hochreguliert werden können und die Permeabilität der BHS gesenkt werden kann [8]. Eine weitere Regulation der Permeabilität findet über die Sezernierung von Apolipoprotein E (ApoE) statt [21].

Zusätzlich zu den zellulären Komponenten, gehört zu einer intakten BHS auch eine kontrollierte Extrazellulärmatrix (EZM) mit einer Basalmembran. Die Basalmembran ist 20-200 nm dick und besteht überwiegend aus Strukturproteinen, wie Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin, sowie weiteren Glykoproteinen [22]. Es kann eine innere vaskuläre Basalmembran, hergestellt durch Neuroendothelzellen und Perizyten, von einer äußeren parenchymatösen Basalmembran, hergestellt durch Astrozyten, unterschieden werden [14]. Gemeinsam stellen sie eine weitere mechanische Barriere da, dienen aber auch als Ansatzpunkt für Signalwege und Verankerungen [14].

Durch junctionale Komplexe wird eine Polarisierung der Endothelzellen herbeigeführt. Diese reduzieren die parazelluläre Diffusion von geladenen Stoffen aus dem Blutplasma in die extrazelluläre Flüssigkeit des Gehirns [23]. Zu den junctionalen Komplexen gehören Adherens Verbindungen und Tight Junctions.

Die Adherens-Verbindungen bilden einen basalen kontinuierlichen Adhäsionsgürtel aus, welcher die benachbarten Zellen miteinander verbindet [24]. Adherens-Verbindungen setzen sich zusammen aus transmembranären Glykoproteinen der Cadherin-Familie. Cadherine sind Ca^{2+} -abhängige Rezeptoren, welche homonyme adhesive Komplexe mit den Nachbarzellen bilden [25]. Intrazellulär sind die Cadherine über Ankerproteine an das Zytoskelett verknüpft.

Die Tight Junctions befinden sich überwiegend an der apikalen Seite und verhindern ebenfalls die parazelluläre Diffusion von Ionen [23]. Außerdem blockieren sie die parazelluläre Penetration von Makromolekülen und haben einen Einfluss auf intrazelluläre Signalkaskaden [23, 26]. Tight Junctions bestehen aus verschiedenen transmembranären Proteinen. Dazu gehören Occludine, Claudine und junctionale Adhesions – Moleküle (JAM) [26]. An das Zytoskelett werden sie unter anderem über Proteine der Zonula Occludens – Familie verbunden [15].

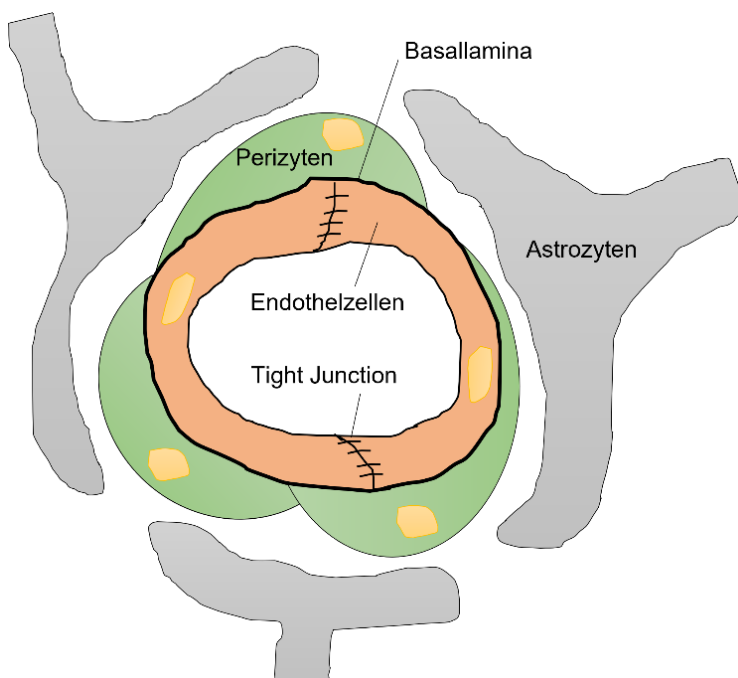


Abbildung 2: Die neurovaskuläre Einheit. Schematische Darstellung der neurovaskulären Einheit, welche sich aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten zusammensetzt. Zusätzlich gehören auch die Basallamina, eine kontrollierte Extrazellulärmatrix und Zell-Zell Verbindungen wie beispielsweise die Tight Junctions zu den Bestandteilen der Barriere (Abbildung modifiziert nach [20]).

2.2 Medikamententransport über die Blut-Hirn-Schranke

2.2.1 Problematik

Bei der Entwicklung neuer Pharmazeutika für Erkrankungen des ZNS stellt die BHS ein großes Hindernis da. Der überwiegende Teil von getesteten Medikamenten (>98 %) scheitert an der Überwindung der BHS. Von den in Deutschland zugelassenen Medikamenten ist nur ein geringer Prozentsatz ZNS-gängig. Dabei dient der Großteil zur Therapie von affektiven Erkrankungen, wie Schizophrenie, Insomnie oder Depressionen [27]. Bei Tumorerkrankungen, entzündlichen und neurodegenerativen Erkrankungen gibt es eine Vielzahl von Ansätzen zur Überwindung der BHS in der präklinischen und klinischen Forschung, welche im Folgenden ausschnittsweise vorgestellt werden.

2.2.2 Klassische Verfahren

Zu den klassischen therapeutischen Optionen, um die BHS zu umgehen, gehört einerseits die intranasale Applikation, sowie die direkte lokale Applikation in das ZNS.

Wenn Medikamente intranasal verabreicht werden, werden sie über die Schleimhaut resorbiert und in das Blut, sowie in olfaktorische Neurone aufgenommen. Von dort gelangen die Wirkstoffe in die Cerebrospinalflüssigkeit und können an neuronales Gewebe abgegeben werden. Dieses Verfahren bietet mehrere Vorteile: Auf der einen Seite kann die BHS umgangen werden und zeitgleich wird der hepatische First-Pass Effekt verhindert. Zusätzlich handelt es sich intranasal um eine große Schleimhautoberfläche, welche eine schnelle Absorption ermöglicht. Da es sich um eine non-invasive Methode handelt, kann der Patient sich das Medikament selbst verabreichen. Zu den Nachteilen gehören die hohe mukoziliäre Clearance, der niedrige pH-Wert der Schleimhaut, sowie niedrige Applikationsvolumina. Dazu kommt eine individuelle Variabilität, welche die Dosierung beeinflussen kann. Es ist wichtig, zu beachten, dass die Aufnahme abhängig von der Lipophilie und dem molekularen Gewicht der Wirkstoffe ist [28].

Eine andere Methode die BHS zu umgehen ist die lokale Applikation von Medikamenten. Dabei werden intraventrikuläre, intrathekal-lumbale und intracisternale Routen unterschieden. Um Medikamente in den lateralen Ventrikel zu applizieren, wird ein implantiertes Rickham-/Ommaya-Reservoir oder ein Katheter genutzt. Diese werden in einem neurochirurgischen Eingriff unter dem Skalp

implantiert und können im Verlauf einer Behandlung immer wieder angestochen werden. Bei diesem Verfahren besteht immer ein Verletzungsrisiko, die Gefahr von Liquorleckagen und ein dauerhaft erhöhtes Infektionsrisiko. Zusätzlich ist das Volumen, welches appliziert werden kann, aufgrund einer möglichen Hirndrucksteigerung limitiert. Größere und langsame kontinuierliche Gaben haben wiederum ein erhöhtes Infektionsrisiko zur Folge [29]. Da die Diffusion ins Parenchym lokal limitiert ist, kann mit dieser Methode der applizierte Wirkstoff nicht das gesamte ZNS erreichen. Dennoch handelt es sich aufgrund der großen Spannweite an zugelassenen Medikamenten und dem hohen therapeutischen Effekt im pädiatrischen und adulten Kontext, um ein wichtiges therapeutisches Mittel in der Therapie von ausgewählten ZNS-Erkrankungen.

Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten in der Therapie wird die Notwendigkeit alternativer Verfahren deutlich. In der Forschung werden dabei verschiedene Ansätze verfolgt. Diese werden unterschieden in Überwindung der BHS und eine passagere Öffnung der BHS.

2.2.3 Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Um mittels lipid-vermittelter freier Diffusion die BHS überwinden zu können, müssen potentielle Wirkstoffe einerseits ein molekulares Gewicht <400 Da haben, sowie andererseits von einer hohen Lipidlöslichkeit gekennzeichnet sein [30]. Dies trifft auf die wenigsten entwickelten Wirkstoffe zu, sodass versucht wird endogene Systeme (Transporter, Transzytose, etc.) für den Transport zu nutzen, die auch größere Moleküle transportieren können.

Um das Gehirn mit essentiellen hydrophilen Substanzen zu versorgen, gibt es eine Vielzahl an spezifischen Transportern. Dazu zählen zum Beispiel der GLUT1-Transporter [31] für Glucose, der LAT1-Transporter [32] für große neutrale Aminosäuren und der CAT1-Transporter [33] für kationische Aminosäuren. So bietet sich für Medikamente mit einer Affinität zu einem dieser Transportsysteme die Möglichkeit, die BHS zu überwinden. Ein bekanntes Beispiel dafür stellt die Therapie des Morbus Parkinson mit L-Dopa dar. Dabei handelt es sich um eine große neutrale Aminosäure, die entsprechend über den LAT1-Transporter in das ZNS gelangt [34]. Eine Alternative zu einer direkten Wirkstoffaffinität an einen endogenen Transporter stellt die Kopplung eines Wirkstoffes an ein Substrat, welches mit hoher Affinität einen Transporter bindet, dar. Dabei muss die ursprüngliche Struktur des Substrats beibehalten werden, um von dem Transporter erkannt zu werden [35].

Adsorptions-vermittelte Transzytose ist eine weitere Möglichkeit, die BHS zu überwinden. Dabei werden Moleküle in Vesikeln von luminal (Endozytose) nach abluminal (Exozytose) durch die Neuroendothelzellen transportiert. Neuroendothelzellen bieten zwei Arten von Vesikeln, die an der luminalen Seite gebildet werden können: Caveolae-vermittelte und Clathrin-bedeckte Vesikel. Der Transport mittels Caveolae spielt aufgrund des geringen Vorkommens an der BHS eine untergeordnete Rolle. Sehr viel häufiger sind hingegen die mit Clathrin-bedeckten Regionen. Diese sind negativ geladen und enthalten spezifische Rezeptoren, wie den Transferrin-Rezeptor, LDL-Rezeptor und Insulin-Rezeptor. Hier findet daher sowohl rezeptor-vermittelte Transzytose als auch adsorptions-vermittelte Transzytose von kationischen Proteinen statt. Zusätzlich verstärken auch die negativ geladenen Glykoproteine der Glykokalix den Effekt auf positiv geladene Proteine. Entsprechend bietet sich die Möglichkeit, Wirkstoffproteine über eine Kationisierung ZNS-gängig zu machen. Dies wird erreicht, indem Carboxyl-Seitengruppen mit positiv geladenen Aminen amidiert werden. Dabei werden die Proteine mit verschiedenen Di- und Polyaminen, natürlicher und synthetischer Natur versehen. Dabei auftretende Probleme sind einerseits die lange Dauer der Transzytose als auch, dass die Transzytose einer Sättigung unterliegt [36]. Zusätzlich kann es durch die Amidierung zu Veränderungen der Funktion, der Konformation und des Bindungsverhaltens kommen. Im gesamten menschlichen Körper gibt es weitere negativ geladene Oberflächen, sodass eine zielgerichtete Akkumulation im ZNS schwer zu erreichen ist [37].

Im Gegensatz zur adsorptiven Transzytose können spezifische Makromoleküle die BHS über rezeptor-vermittelte Transzytose passieren. Dabei binden luminal exprimierte Rezeptoren ihr Molekül, gefolgt von einem vesikulären intrazellulären Transport und der Exozytose auf der abluminalen Seite. Mittels Konjugation von Wirkstoffen (= Cargo) an Liganden (= Vektoren) zeigt sich die rezeptor-vermittelte Transzytose als weitere Möglichkeit die BHS zu überwinden [38]. Die Wirkstoffe können einerseits direkt oder andererseits in Form von Nanopartikeln an den Liganden konjugiert werden. Als Liganden für die Rezeptoren kommen u.a. zellpenetrierende Peptide, monoklonale Antikörper und Rezeptor-targeting Peptide in Frage. Werden monoklonale Antikörper als Liganden genutzt, wird auch vom sogenannten „molekularen trojanischen Pferd“ gesprochen [38]. Auch dieses Verfahren geht mit Nebenwirkungen und Gefahren einher; dazu gehören unter

anderem Immunreaktionen auf die Antikörper, eine Toxizität bei zu hoher Dosierung und eine mögliche Einschränkung der normalen Funktion des Rezeptors mit den entsprechenden Folgen [39]. Auf der Oberfläche der Neuroendothelzellen wird eine Reihe von Rezeptoren exprimiert; in den Fokus der Forschung geraten sind dabei bisher vor allem der Transferrin-Rezeptor (TfR) [40], der Insulin-Rezeptor (InsR) [39], der low-density-lipoprotein-Rezeptor (LDLR) und das low-density-lipoprotein receptor-related Protein 1 (LRP1) [39].

Wie bereits erwähnt, spielen auch Nanopartikel aufgrund ihrer Größe, typischerweise <100 nm, eine Rolle im Rahmen der verschiedenen Ansätze zur Überwindung der BHS. Allgemein werden Polymer-basierte Systeme unterschieden in polymerische Wirkstoffe, Polymer-Protein-Konjugate, Polymer-Wirkstoff-Konjugate und polymerische Micellen [41]. Zusätzlich können Polymere in nanometer-großen Partikeln emulgiert werden, in denen Wirkstoffe eingeschlossen werden. Davon unterschieden werden Liposomen, die durch Phospholipide einen flüssigen Kern ausbilden, in welchem Wirkstoffe transportiert werden können [42]. Um eine Targetierung der Nanopartikel zu erreichen, werden diese auf ihrer Oberfläche mit spezifischen Liganden, Proteinen und Antikörpern versehen [41]. In verschiedenen Versuchen wurden Nanopartikel mit verschiedenen Lösungsmitteln (u.a. Polysorbate-80) beschichtet, um die Diffusion über die BHS zu steigern [43]. Dabei wird diskutiert, ob die gesteigerte Aufnahme durch eine Bindung von Polysorbate-80 an ApoE und eine rezeptor-vermittelte Transzytose zu erklären ist [44]. In einem anderen Ansatz wurden Nanopartikel mit Polyethylenglycol (PEG) konjugiert, um über die gestiegene Wasser-Löslichkeit die Plasmahalbwertszeit und den therapeutischen Index zu erhöhen [45]. Vorteile der Nanopartikel sind zum Einen die kleine Größe, die ein Vordringen auch in die kleinen Kapillaren ermöglichen; zum Anderen ermöglicht die Nutzung von biologisch abbaubaren Materialien für die Herstellung der Nanopartikel eine anhaltende Freisetzung des enthaltenen Wirkstoffes bis hin zu mehreren Tagen nach Verabreichung [46].

Es besteht außerdem der Ansatz, mittels verschiedener Lösungsmittel und Tenside die Zellmembranen der Neuroendothelzellen in ihrer Funktion einzuschränken. Aktuell wird davon ausgegangen, dass so eine vermehrte transzelluläre Diffusion möglich wird [47]. Dimethylsulfoxid (DMSO) wird häufig für die Kryokonservierung von Zellen und in höheren Konzentrationen als Lösungsmittel für Medikamente genutzt. Die Effekte, die DMSO auf die Integrität und Permeabilität der BHS hat,

werden kontrovers diskutiert. So zeigten die Studien von Zyilan et al. und Neuwelt et al. nach Applikation von DMSO keine veränderten Transfer-Raten von Blut zu Gehirn, während sich in Studien von Broadwell et al. eine verstärkte Aufnahme der als Substrat verabreichten Meerrettich-Peroxidase durch Pinozytose zeigte [48, 49]. Positive Effekte zeigten sich auch in der Anwendung von kurzkettigen Alkylglycerolen, um kurzzeitig die Permeabilität der BHS zu erhöhen [50].

Wie bereits in Kapitel 2.1.2 beschrieben, gibt es an der BHS endogene Transportsysteme, die an dem Efflux von Medikamenten und anderweitigen lipophilen Molekülen beteiligt sind. Die Inhibierung eben dieser Transportsysteme stellt daher einen weiteren Forschungsansatz dar. Zu den ABC-Transportern an der luminalen Seite der Neuroendothelzellen gehört unter anderem das p-Glycoprotein (P-gp). Dabei handelt es sich um ein Transportprotein, welches unter ATP-Hydrolyse, lipophile Moleküle, welche die Zellmembran passiert haben, wieder exportiert [51]. P-gp ist für den Großteil des Exports von Medikamenten zuständig [52]. Bisher konnte allerdings kein chemisches Charakteristikum identifiziert werden, das die Substrate von P-gp definiert. Es ist notwendig den Einfluss eines jeden Medikamentes auf P-gp individuell zu untersuchen [51]. Ein Ansatz besteht nun darin, während der Applikation von Wirkstoffen, P-gp über verabreichte Co-Substrate zu inhibieren. Dabei werden inzwischen drei Generationen an klassischen Inhibitoren von natürlichen Inhibitoren unterschieden, die auf unterschiedliche Art und Weise die Funktion von P-gp hemmen. Zu der 1. Generation gehören u.a. Verapamil und Cyclosporin A [53]. Nachteile dieses Verfahrens sind einerseits die intrinsische pharmakologische Aktivität der Inhibitoren und andererseits die Hemmung des P-gp in anderem Gewebe des Körpers (bspw. Darmepithelien, Gallenkanälchen) [54]. Die P-gp Inhibition hat inzwischen auch in der Tumorthherapie einen wichtigen Forschungsansatz eingenommen, da durch Überexpression in vielen Tumoren eine Multi-Drug-Resistance gegen Chemotherapeutika induziert wird [55].

Letzlich wird deutlich, dass es eine Vielzahl an Möglichkeiten gibt, die BHS mittels verschiedener Wege zu überwinden (vgl. Abbildung 3), welche für sich genommen jeweils mit Vor- und Nachteilen einhergehen.

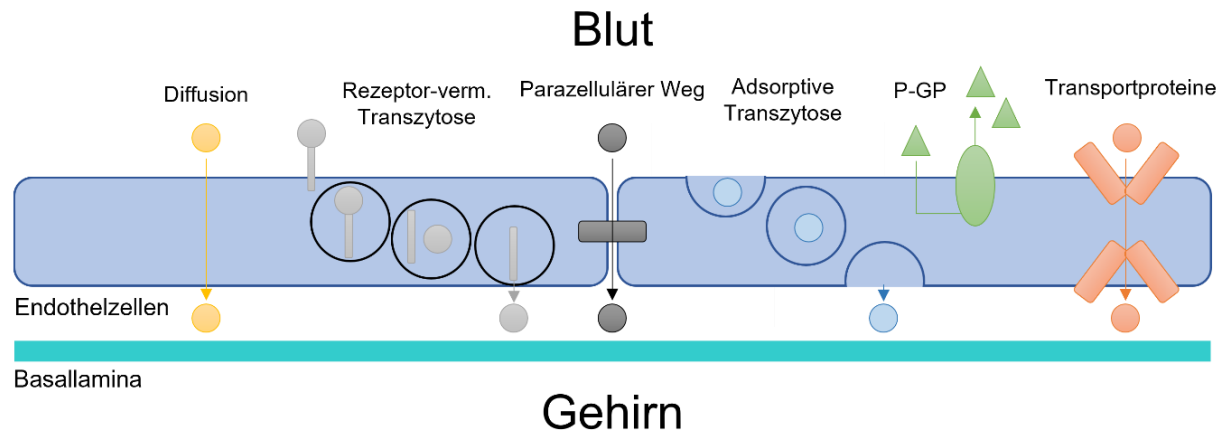


Abbildung 3: Wege über die Blut-Hirn-Schranke. Schematische Darstellung der einzelnen Wege über die BHS. Hierbei dargestellt von links nach rechts: die Diffusion von lipidlöslichen niedermolekularen Stoffen, die rezeptorvermittelte Transzytose mittels Konjugation von Wirkstoffen an Liganden, die parazelluläre Diffusion, die adsorptive Transzytose mittels Vesikeln, Inhibition von Efflux-Transporten (hier dargestellt P-gp) und der Transport mittels spezifischer Transportproteine (Abbildung modifiziert nach [56]).

2.2.4 Öffnung der Blut-Hirn-Schranke

Die Permeabilität der BHS ist kein statisches Konstrukt, sondern unterliegt der ständigen Anpassung an die Gegebenheiten in Blut und Gehirn. Unter den pathologischen Bedingungen einiger neurologischer Erkrankungen, wie M. Alzheimer, M. Parkinson und Schlaganfall kommt es zu Veränderungen an der BHS [30]. Zu diesen Zeitpunkten ist die BHS durch verschiedene Mechanismen (unter anderem Veränderungen der Adhärenz-Verbindungen) hyperpermeabel für Makromoleküle [30]. In verschiedenen Ansätzen wird versucht, eine reversible Öffnung der BHS für die Applikation von Medikamenten zu erreichen. Dabei ist die mechanische Öffnung immer mit dem Risiko des unkontrollierten Einströmens auch von Toxinen und unerwünschten Molekülen verbunden [57].

Ein Ansatzpunkt stellt die Modulation der Tight Junctions über endogene Liganden bzw. Analoga dieser dar. Die Neuroendothelzellen besitzen verschiedene Rezeptoren, mit denen sie über klassische Second Messenger Systeme die Permeabilität der Tight Junctions beeinflussen können [58]. Bradykinin ist zum Beispiel ein endogenes Nonapeptid mit einer kurzen Halbwertszeit und einem engen therapeutischen Index, welches an der endogenen Modulation der Tight Junctions beteiligt ist [59]. Borlongan et al. haben für ihre Experimente ein synthetisches Bradykinin-Analogon, Cereport (RMP-7), entwickelt und verwendet [60]. Bei intraarterieller Applikation wurde durch Aktivierung des Bradykinin B2 Rezeptors an

den Neuroendothelzellen ein zytosolischer Ca^{2+} Anstieg ausgelöst, der zur Öffnung der Tight Junctions führte [60]. Bereits nach wenigen Minuten ließ sich eine erhöhte Permeabilität der BHS nachweisen. Nach Beendigung der Infusion wurde die Barriere zügig wieder aufgebaut und nach 2-5 min zeigte sich kein Unterschied mehr [60].

Eine weitere Möglichkeit, wasserlösliche Wirkstoffe zu transportieren, stellt die osmotische Öffnung der BHS dar. Dabei wird bspw. eine hypertone Mannitol-Lösung (25 %) intraarteriell verabreicht. Das führt zu einem Schrumpfen der Neuroendothelzellen und einer zeitweiligen Öffnung der BHS. So können große Moleküle mittels passiver Diffusion über die BHS gelangen [61]. Klinisch wird Mannitol überwiegend genutzt, um Chemotherapeutika, wie Cyclophosphamid und Methotrexat, in Hirntumore zu applizieren [62]. Damit in Verbindung stehen viele Nebenwirkungen, wie neurologische Schäden, vermehrte Expression von Hitze-Schock-Proteinen (HSP), Mikroembolien, vermehrte Glucose-Aufnahme, eine veränderte neuronale Funktion und der vermehrte Eintritt von Plasmaproteinen [57]. Andere chemische Agentien, die ebenfalls eine osmotische Öffnung hervorrufen sind: Borneol, Polydixylitol, Lyophosphatsäure. Alle aufgezählten Wirkstoffe rücken aufgrund ihres hohen Nebenwirkungsprofils und unzureichender Effektivität immer weiter aus dem Fokus der Forschung [61].

Die Ultraschall-induzierte Öffnung der BHS stellt einen weiteren Ansatzpunkt in der Forschung für die Therapie von ZNS-Erkrankungen dar. Dabei wird niedrig-intenser pulsatiler fokussierter Ultraschall in Kombination mit der Injektion von Ultraschall-Resonatoren (gasförmige Mikrobubbles) genutzt [63]. Durch die Stimulation mittels Ultraschall dehnen sich die Mikrobubbles (1-10 μm) in den Gefäßen aus und kontrahieren wieder. Das führt zu einer mechanischen Reizung der Gefäßwände und daraus folgend zu einer Endothelzellveränderung. Die Transzytose-Aktivität wird gesteigert, eine Fenestrierung wird initiiert und die Tight junctions werden geöffnet [64]. Die therapeutischen Agentien (Chemotherapeutika, Antikörper, Immunzellen) können nun auf transzellulären und interzellulären Wegen ins Hirnparenchym gelangen. Die Öffnung ist transient und die Wiederherstellung der vollständigen Integrität beginnt direkt nach der Stimulation (Dauer 6-24 h) [65]. Auch auf funktioneller Ebene wird die BHS durch die Ultraschall-Stimulation modifiziert: die p-Glycoprotein Expression wird bis zu 48 h inhibiert und verhindert so den Medikamenten-Efflux [66]. Das Ausmaß und der Effekt der Öffnung ist dabei

abhängig von den Schall-Eigenschaften (Druck, Frequenz, Wellenlänge) [67, 68], sowie der Konzentration und Größe der Mikrobubbles [69]. Die größte Schwierigkeit stellt bei diesem Verfahren der knöcherne Schädel dar; dieser verzerrt und schwächt den Ultraschall ab und führt zu einer raschen Temperaturerhöhung innerhalb des Gehirns [63]. In klinischen Studien werden daher aktuell extrakranielle mit implantierten intrakraniellen Ultraschall-Geräten verglichen. Andere Schwierigkeiten stellen die Behandlungsdauer, die behandelten Volumina und die Durchführbarkeit in den Kliniken dar [63].

2.3 LRP1

Wie in dem vorausgehenden Kapitel dargelegt, gibt es inzwischen eine Vielzahl an Ansätzen die BHS zu überwinden oder passager zu öffnen. In Anbetracht der damit jeweils verbundenen Risiken, hat sich bisher jedoch kein Verfahren als in der täglichen klinischen Anwendung nutzbar herausgestellt. Die Möglichkeiten der rezeptorvermittelten Transzytose sollen im Folgenden anhand des Beispiels der LDL Rezeptor Familie und insbesondere LRP1 näher dargestellt werden.

2.3.1 LDL Rezeptor Familie

Die Low-Density-Lipoprotein Rezeptor (LDL-R) Familie besteht aus sieben strukturhomologen Mitgliedern. Dazu gehört auch der Low-Density Lipoprotein-Rezeptor (LDLR), welcher in Lunge, Leber und weiteren Geweben exprimiert wird. Eine Hauptaufgabe besteht in der Bindung von Low-Density Lipoprotein-Cholesterin (LDL-Cholesterin) und der Versorgung der Zelle mit Cholesterin. Der LDL-Rezeptor wird aufgrund seiner Expression an der BHS auch als Zielstruktur für rezeptorvermittelten Transport von Wirkstoffen gesehen. Zum Beispiel wurde durch Spencer et al. Mäusen ein Lentivector verabreicht, der ein rekombinantes Protein mit hinzugefügter LDLR-bindender Domäne von ApoB enthält. Dadurch war ein spezifischer Transport über den LDL-Rezeptor ins ZNS möglich [70]. Der LDL-Rezeptor bietet sich v.a. für die Therapie von lysosomalen Speichererkrankungen und intrazellulären Erkrankungen an, da die gebundenen Proteine durch die Endozytose primär ins Lysosom gelangen. Um hohe Wirkstoffkonzentrationen im Extrazellulärraum zu erreichen, sind deshalb andere Rezeptoren, wie LRP1, möglicherweise erfolgsversprechender.

2.3.2 LRP1 Aufbau

Das Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1) gehört als zellulärer Transmembranrezeptor der Familie der LDL-Rezeptoren an. Der Typ 1 Oberflächenrezeptor wird in Neuronen, der Leber, Neuroendothelzellen der BHS und anderen Geweben exprimiert.

Das 600 kDa große Vorläufermolekül wird am Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, bevor es am Golgiapparat durch Furin prozessiert wird. Es entsteht eine 85 kDa große transmembranäre β -Untereinheit und eine 515 kDa große extrazelluläre α -Untereinheit. Diese sind non-kovalent miteinander verknüpft. Auf dem Weg zur Zelloberfläche wird LRP1 durch das Chaperon Rezeptor-assoziierte Protein (RAP) bedeckt, um eine Ligandenbindung zu verhindern.

Die α -Untereinheit enthält vier cysteinreiche, ligandenbindende Domänen (s. Abbildung 4). Dazu kommen Wiederholungen des Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), sowie β -Propeller Domänen. Für die Domänen I-IV werden über 40 verschiedene Liganden beschrieben. Dazu gehören unter anderem Lipoproteine, Proteinasen, bakterielle Toxine, Viren, intrazelluläre Proteine so wie viele weitere. Einige der Liganden, wie das β -Amyloid Precursor Protein (APP), Amyloid β Protein ($A\beta$), Apolipoprotein E (ApoE) und α 2-Makroglobulin (α 2M) sind assoziiert mit M. Alzheimer. Die Mehrzahl der Liganden bindet an Domäne II und IV.

Die β -Untereinheit besteht aus einer kurzen extrazellulären Domäne, einer transmembranären Domäne, sowie einer zytoplasmatischen Domäne. Letztere enthält zwei intrazelluläre NPxY-Motive. Diese spielen eine wichtige Rolle in der Funktion, v.a. der Endozytose, von LRP1. Das proximale NPxY-Motiv ist zusätzlich relevant für die Regulation der LRP1 - Biosynthese. Das distale NPxY-Motiv zeigt eine Überlappung mit einem YxxL-Internalisierungsmotiv. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einer Knock-in Mutation in der distalen NPxYxxL Aminosäuresequenz eine verminderte Internalisierungsrate von LRP1 aufweisen. Außerdem spielt das NPxYxxL Motiv eine Rolle in der basolateralen Anordnung von LRP1 in polarisierten Endothelzellen. Im Kontext von M. Alzheimer spielt die intrazelluläre Domäne eine Rolle in der APP-Prozessierung und beeinflusst die Modulation der $A\beta$ -Generation. Durch Phosphorylierung und verschiedene intrazelluläre Adaptormoleküle ist die β -Untereinheit in der Lage die Differenzierung der Funktion von LRP1 zu beeinflussen [71].

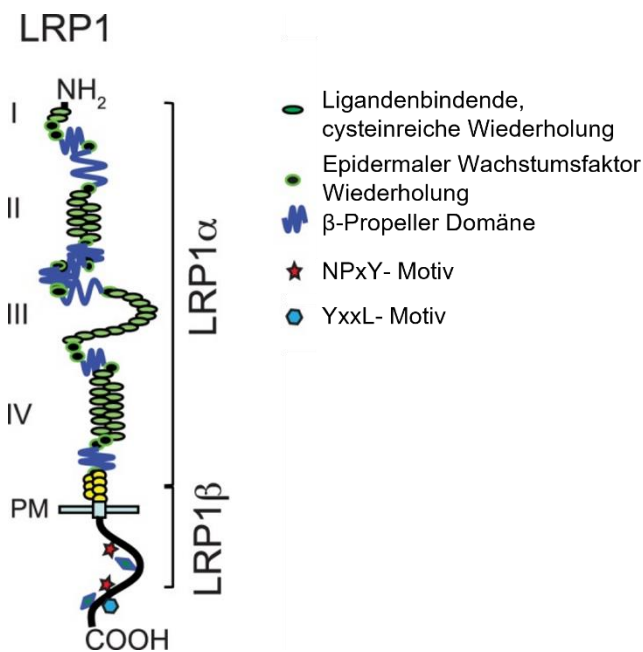


Abbildung 4: Aufbau LRP1 Rezeptor. Der LRP1 Rezeptor ist aus einer α - und β -Kette zusammengesetzt. Erstere besteht aus vier ligandenbindenden Domänen (I, II, III, IV), sowie EGF Wiederholungen und β -Propeller Domänen. Die β -Kette besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranären und einer intrazellulären Domäne, welche zwei NPxY- sowie ein YxxL-Motiv enthält (Abbildung modifiziert nach [72]).

2.3.3 Funktion

LRP1 ist verantwortlich für die rezeptorvermittelte Endozytose und Transzytose seiner Liganden. Anschließend wird LRP1 selbst recycelt und zurück an die Zelloberfläche gebracht oder im Lysosom abgebaut. Im Vergleich zu anderen Rezeptoren der LDL-R-Familie ($LDLR = t_{1/2} < 4.8 \text{ min}$; $LRP2 = t_{1/2} < 3.1 \text{ min}$) zeichnet sich LRP1 durch ein schnelle Transzytose aus ($t_{1/2} < 0.5 \text{ min}$) [73].

Besondere Aufmerksamkeit ist LRP1 in der Erforschung von M. Alzheimer zuteilgeworden. Im Rahmen der M. Alzheimer Erkrankung kommt es zu einer intrazerebralen Akkumulation von A β in Form von Plaques, welche damit unter anderem Teil der Pathogenese der Erkrankung sind. LRP1 ist nicht nur in der A β Endozytose und zerebralen Degradierung beteiligt, sondern auch an der A β Transzytose und der systemischen Eliminierung von A β aus dem Gehirn. Zum einen weisen die betroffenen PatientInnen reduzierte LRP1-Level auf, zum anderen sammeln sich in den senilen Plaques neben A β auch andere Liganden von LRP1. Daher liegt der neurovaskulären Hypothese zur Entstehung von M. Alzheimer eine Beeinträchtigung von A β Transportern – unter anderem LRP1 – zugrunde. Jedoch

gibt es widersprüchliche Studien hinsichtlich der Rolle LRP1 an der BHS bezüglich M. Alzheimer, weshalb es hier weiterer Forschung bedarf [5].

Zusätzlich ist LRP1 eingebunden in diverse Zellsignalwege; durch extrazelluläre Bindung von Liganden werden intrazelluläre Signalwege aktiviert. Desweiteren beeinflusst LRP1 die Verteilung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Aufgrund der Vielzahl an Liganden und Adaptermolekülen ist die Einbindung in multiple physiologische und pathophysiologische Prozesse hervorzuheben [71].

2.3.4 LRP1 als Zielstruktur für gerichteten Transport

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften wird LRP1 als Ansatzpunkt für rezeptor-vermittelte Transzytose über die BHS gesehen. Auch wenn bisher vorwiegend in Studien die basolaterale Expression von LRP1 in Neuroendothelzellen untersucht wurde und damit primär der Gehirn-zu-Blut Transport analysiert wurde, liegt durch die Transzytose der Liganden zeitweise auch ein luminales Auftreten von LRP1 vor, welches einen Transport von Blut-zu-Gehirn ermöglichen würde. Verschiedene Forschungsgruppen haben inzwischen mehrere potentielle Liganden für LRP1 entdeckt bzw. entwickelt, welche im Folgenden auszugsweise vorgestellt werden.

Demeule et al. konnten eine Gruppe an Proteinen identifizieren, die sie aus den Kunitz-Domänen von Aprotinin und anderen Proteinen erhielten, welche sie Angiopeps nannten. Diese Angiopeps, insbesondere Angiopep-2 (TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH), zeigten bei *in vitro* Transzytose-Experimenten an einem BHS-Modell und *in situ* Perfusionen bei Mäusen eine zerebrale Akkumulation sowie signifikant höhere Transzytoseraten als die Vergleichsgruppen mit Transferrin und Aprotinin [74]. In der folgenden molekularmechanistischen Untersuchung zeigte sich die rezeptor-vermittelte Transzytose über LRP1 als ursächlich für die gesteigerte Aufnahme. Die Transzytose von Angiopep-2 unterlag einer Sättigung und war durch andere LRP1-Liganden wie α 2-Makroglobulin partiell inhibierbar. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte eine Kollokalisierung der Angiopep-2 Peptide und LRP1 beobachtet werden. Durch die Hinzugabe von P-gp Inhibitoren zeigte sich keine zusätzliche Steigerung der Aufnahme, was indiziert, dass Angiopep-2 kein Substrat von P-gp ist [75].

Aufbauend auf diesen Ergebnissen folgten viele Studien, die Konjugate zwischen Angiopep-2 mit verschiedenen Zytostatika untersuchten [76]. Besonders Augenmerk lag dabei auf dem Paclitaxel-Angiopep-2 Konjugat (ANG1005), welches in Mäusen

und Ratten mit Glioblastom das Tumorwachstum reduzieren konnte [77]. Diese beobachteten positiven Effekte werden von der erhöhten LRP1 Expression von Tumorzellen zusätzlich begünstigt [78]. Aktuell läuft eine Phase-3 Studie zur Therapie mit ANG1005 bei leptomeningealen Metastasen bei Brustkrebspatientinnen (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03613181). In einer anderen Studie fusionierten Kim et. al einen β -Sekretase Inhibitor an Angiopep-2 mit dem Ziel, dass dieses Konjugat rezeptor-vermittelt über LRP1 in Neuronen aufgenommen wird, intrazellulär die β -Sekretase inhibiert und somit einen Einfluss auf die A β Produktion bei M. Alzheimer hat. Neben der unzureichenden Wirkung des Inhibitors beobachteten die Autoren keine signifikanten Unterschiede in der Aufnahme zwischen LRP1- Knock-out und Wildtyp -Zellen, sodass sie die Internalisation von Angiopep-2 über LRP1 in Frage stellten [79]. Die Spezifität von Angiopeps für LRP1 und der Einfluss der konjugierten Wirkstoffe auf das Transzytoseverhalten ist dementsprechend noch nicht ausreichend geklärt und bedarf weiterer Forschung.

Sakamoto et al. entwickelten im Jahr 2017 mit L57 (TWPKHFDKHTFYLSILKLGKH-OH) das erste artifizielle Peptid, welches an Domäne IV der α -Kette von LRP1 bindet. Dazu wurden mittels Phagen-Display-Technologie die Aminosäuresequenzen aus Domäne II und IV, welche die meisten endogenen Liganden binden, präsentiert und L57 als Ligand an Domäne IV identifiziert. Im Mausplasma war L57 für bis zu 20 min bei 37 °C stabil. Da L57 weniger basisch ist als andere zellpenetrierende Peptide, sinkt auch das Risiko für unspezifische Bindungen und adsorptive Transzytose [80]. Bei *in situ* Gehirn - Perfusionen von Mäusen und *intravenösen* Injektionen bei Mäusen zeigte sich jeweils eine Überlegenheit hinsichtlich der Bindung an LRP1 und der Permeabilität über die BHS von L57 gegenüber dem verglichenen Angiopep-7 (TFFYGGSRGRRNNFRTEEY-OH). Dieser Vorteil war bei der *intravenösen* Gabe bei Mäusen deutlich geringer ausgeprägt, sodass von ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften von L57 auszugehen ist und für weitere Experimente zunächst eine Optimierung notwendig wäre [81].

Rodrigues et al. testeten die Aufnahme von L57, TAT und Angiopep-7 in verschiedenen *in vitro* Zelllinien und konnten einen Zusammenhang zwischen der LRP1-Expression und der intrazellulären Aufnahme von L57 und Angiopep-7 zeigen. Desweiteren untersuchten sie die Zellviabilität nach Applikation von L57 und konnten keine Toxizität nachweisen [81, 82].

In 2022 veröffentlichte Sakamoto et al. Ergebnisse zu einem weiteren artifiziellen Peptid, welches an Domäne IV der α -Kette von LRP1 bindet: das zyklische KS-487. Daraufhin wurden die Eigenschaften von Angiopep-2, L57 und KS-487 hinsichtlich LRP1-Affinität, Stabilität im Mausplasma und BHS-Permeabilität verglichen. Im Mausplasma zeigte KS-487 mit 24 h eine deutliche längere Stabilität als L57. Ein weiterer Unterschied liegt in der höheren Affinität zu LRP1 von KS-487 ($EC_{50} = 10$ nM) im Vergleich zu L57 ($EC_{50} = 45$ nM). Die *in vitro* gemessene BHS-Permeabilität von KS-487 war nach 6-24h Inkubationszeit sowohl im Ratten- als auch im Affen-BHS-Modell relevant höher als bei L57 und Angiopep-2. Um *in vivo* eine entsprechend lange Inkubationszeit von 24h zu realisieren, bedarf es weiterer Forschung da aktuell durch renale Elimination die Halbwertszeit bei <1 h liegt [83].

Desweiteren gibt es mehrere Versuche, LRP1 in der BHS mittels Nanopartikeln anzusprechen. Dazu wurde bisher in den meisten Studien ApoE als endogener Ligand von LRP1 genutzt. Es erfolgte entweder die kovalente Bindung von ApoE an Humane-Serumalbumin-Nanopartikel [84], die Bindung an Lipid-Nanopartikel [85] oder die spontane Bindung im Blutplasma an endogenes ApoE. Zum Beispiel konnten Polylactide-Nanopartikel mit eingebettetem Flurbiprofen im Blutplasma spontan an ApoE binden. Diese konnten anschließend in einem *in vitro* Modell über die BHS transportiert werden und die Menge an A β senken [86]. Doch auch hier fand kein gezieltes Targeting von LRP1 statt, sondern es kam nur durch die Bindung im Plasma an ApoE zu der rezeptor-vermittelten Transzytose.

Die bisher beschriebenen Studienergebnisse verdeutlichen, dass LRP1 aufgrund seiner Eigenschaften einen relevanten Ansatzpunkt für zielgerichteten Transport über die BHS darstellt. Es ist jedoch auch erkennbar, dass weitere Studien und eine nähere Charakterisierung des Rezeptors folgen müssen, um einen Einsatz von LRP1 in der Therapeutik zu ermöglichen.

3 Material

3.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Material	Hersteller
40 % Acrylamid/ Bis Solution 29:1	Bio-Rad Laboratories
6x Gel Loading Dye, Blau	New England Biolabs
Aceton	Carl Roth
Agar	Carl Roth
Agarose	Merck
Ampicillin	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem
BioWhittaker ® Alpha MEM	Lonza
BCA 200 Protein Assay Kit	Pierce
Blasticidin	InvivoGen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Pierce
CaCl ₂	Carl Roth
Chlorwasserstoff (HCl)	Carl Roth
Coomassie Brilliant Blau	Merck
Dublecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific
Dublecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
DEPC H ₂ O	Carl Roth
DNA Puffer (6x)	New England Biolabs
dNTPs	New England Biolabs
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich
EDTA	Merck
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific
EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin	Thermo Fisher Scientific
Glutathion-Agarose-Beads	Sigma Aldrich
Glycin	Merck
Immobilon Western HRP Substrate Luminol Reagent	Millipore
Immobilon Western HRP Substrate Peroxide Solution	Millipore
Isopropanol	Carl Roth
KCL	Carl Roth
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific
Milchpulver, fettarm	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
MgCl ₂	GIBCO
NaHCO ₃	Merck
NaN ₃	Merck
NaCl	B.Braun
NaH ₂ PO ₄	Merck
NaOH	Carl Roth
Natriumpyruvat	Thermo Fisher Scientific

NeutraAvidin Agarose Resin	Thermo Fisher Scientific
Nitrocellulosemembran	Healthcare Life Science
Nonidet P40 (NP40)	Merck
Penicillin-Streptomycin (P/S)	Sigma
Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Fisher Scientific
Pierce™ BCA Protein Assay Reagent B	Thermo Fisher Scientific
Plasmocin	InvivoGen
Proteaseinhibitor	Roche
Ponceau S	Sigma Aldrich
Polyethylamine (PEI)	Sigma-Aldrich
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich
Roti®-load 1 (4 x konz.) reduzierend	Carl Roth
Roti®-load 1 (4 x konz.) nicht- reduzierend	Carl Roth
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	BioRad Laboratories
SuperSignal West Pico Luminol/Enhancer Solution	Pierce
SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution	Pierce
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Carl Roth
Tris-Acetat	Carl Roth
Tris-Base	Carl Roth
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth
Tryptanblau (0,4 %)	Merck
Trypton	BD
Tween20	Carl Roth
TCA (Trichloressigsäure)	Carl Roth

3.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Puffer, Lösungen und deren Zusammensetzung

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Blockierungslösung	TBS-T 5% (w/v) fettarmes Milchpulver
Blottingpuffer	Aqua dest. 192 mM Glycin 25 mM Tris Base 20 % Methanol
Coomassie-Entfärbe-Lösung I	20 % (v/v) Ethanol (99,9 %) 7 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärbe-Lösung II	10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbe-Lösung	5 % (w/v) Aluminiumsulfat-Hydrat 10 % (v/v) Ethanol (99,9 %) 0.02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G 250 2 % (v/v) σ – Phosphorsäure
DMEM komplett	DMEM 10 % (v/v) FKS 1 % Penicillin-Streptomycin (P/S)
DMEM serumfrei	DMEM

	1 % Penicillin-Streptomycin (P/S)
Elutionspuffer	20 mM GSH 50 mM TRIS-HCl ddH ₂ O pH 8,0
LB-Medium	Aqua dest. 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Trypton 0,5 -10 g/l Natriumchlorid
LB-Agar-Platten	Aqua dest. 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Trypton 0,5 -10 g/l Natriumchlorid 1,5 g/l Agar
NP40 Lysepuffer	50 mM Tris Base pH 8.0 150 mM NaCl 0.02 % NaN ₃ 1 % NP40
PBS (pH 7,4)	13,7 mM NaCl 0,27 mM KCl 1,0 mM NaH ₂ PO ₄ 0,18 mM KH ₂ PO ₄ ddH ₂ O
Ponceau S	Aqua dest. 5 % Ethansäure 0.1 % Ponceau S
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	Aqua dest. 0.6 M Tris-HCl 0.4 % (w/v) SDS
SDS Laufpuffer	Aqua dest. 192 mM Glycine 25 mM Tris base 0.1 % SDS
Tris-Acetat-EDTA Puffer	Aqua dest. 40 mM Tris base 50 mM Acetat 1 mM EDTA
Trenngelpuffer (pH 8,8)	Aqua dest. 1.5 M Tris base 0.4 % (w/v) SDS
Tris-gepufferte Saline (TBS)	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 25 mM Tris base pH 7.4
Tris-gepufferte Saline mit Tween20 (TBS-T)	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 25 mM Tris base pH 7.4 0.1 % Tween20
Waschpuffer	140 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2.7 mM KCl 1.8 mM KH ₂ PO ₄ PBS pH 7.4
Western-Blot Puffer	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol

3.3 Kits

Tabelle 3: Kits

Name	Funktion	Hersteller
<i>NucleoSpin-Gel and PCR-Clean-Up</i>	Aufreinigung von DNA nach PCR und Agarose-Gel	Machery-Nagel
<i>Monarch Plasmid Miniprep Kit</i>	Mini-Präparation	New England Biolabs
<i>NucleoBond Xtra Midi EF</i>	Midi-Präparation	Machery-Nagel
<i>BCA™ Protein Assay Kit</i>	Konzentrationsbestimmung Proben	ThermoFisher Scientific

3.4 Zelllinien und Bakterien

Tabelle 4: Zelllinien

Zelllinie	Name	Medium	Referenz
HEK-293T	Human embryonic kidney cells	DMEM	[87]
HEK-GP2-293	Human embryonic kidney cells	DMEM	Clontech, Mountain View, USA
bEnd.3	Murine brain endothelial cells	DMEM	[88]
CHO-K1	Chinese hamster ovary cells	Alpha-MEM	Puck et al. 1957

Tabelle 5: Bakterien

Bakterienstamm	Hersteller
E.coli DH 5 Alpha	Invitrogen, Karlsruhe

3.5 Marker

Als Marker für die aufgetrennten Proteine wurde für die SDS-PAGE der Prism Ultra Prestained Protein Ladder oder der Pageruler Prestained Protein Ladder verwendet. Für die Größenauftrennung in der Agarose-Gelelektrophorese wurde der 1kb DNA Ladder verwendet.

Tabelle 6: Marker

Name	Beschreibung	Hersteller
1 kb DNA ladder	0,5-10 kB	New England Biolabs
PageRuler Prestained Protein Ladder	10-180 kDa	ThermoFisher Scientific
Prism Ultra Prestained Protein Ladder	11-245 kDa	Abcam

3.6 Antikörper

Die monoklonalen Primärantikörper wurden in 10 ml TBS-T verdünnt, polyklonale in TBS-T mit 5% fettarmen Milchpulver. Zusätzlich wurde allen Primärantikörpern 0,02% NaN₃ zugesetzt. Die verwendeten Sekundärantikörper wurden in 10 ml TBS-T angesetzt.

Tabelle 7: Primärantikörper

Name	Antigen	Wirt	Verdünnung	Hersteller
1704	β-Kette LRP1	Kaninchen	1:10.000 in TBS-T	Hergestellt von der AG Pietrzik [89]
9E10	c-myc	Maus	1:500 in TBS-T + 5% Milchpulver	Hergestellt von der AG Pietrzik
M2	Flag	Maus	1:2.000 in TBS-T + 5% Milchpulver	Sigma A F3165
Aktin	Aktin	Kaninchen	1:10.000 in TBS-T + 5% Milchpulver	Sigma A 5060
Tubulin	Tubulin	Maus	1:10.000 in TBS-T + 5% Milchpulver	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 8: Sekundärantikörper

Name	Antigen	Wirt	Verdünnung	Hersteller
HRP-konjugierter anti-Kaninchen-IgG	Kaninchen IgG	Ziege	1:10.000 in TBS-T	Sigma A9169
HRP-konjugierter anti-Maus-IgG	Maus IgG	Esel	1:5.000 in TBS-T + 5% Milchpulver	Jackson Immuno Research 715-035-151

3.7 Enzyme

Tabelle 9: Enzyme

Name	Puffer	Hersteller
Antarctic Phosphatase	CutSmart Buffer	New England Biolabs
Phusion HF DNA Polymerase	Phusion HF bzw GC Buffer	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	T4 Buffer	New England Biolabs
Trypsin	EDTA	GIBCO

Tabelle 10: Restriktionsenzyme

Name	Schnittstelle	Puffer	Hersteller
BamHI HF	GGATCC (sticky end)	NEB CutSmart Buffer	New England Biolabs
EcoRI-HF	GAATTC (sticky end)	NEB CutSmart Buffer	New England Biolabs
NotI	GCGGCCGC (sticky end)	NEB CutSmart Buffer	New England Biolabs
XhoI	CTCGAG (sticky end)	NEB CutSmart Buffer	New England Biolabs
XbaI	TCTAGA (sticky end)	NEB CutSmart Buffer	New England Biolabs
XmaI	CCCGGG (sticky end)	NEB CutSmart Buffer	New England Biolabs

3.8 Geräte

Tabelle 11: Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose Gel Elektrophorese System	Biorad, München
Anthos 2010 Mikrotiterplatten-Photometer	Anthos Mikrosysteme, Friesoythe
CO2-Brutschrank	New Brunswick, Edison, USA
Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf ThermoMixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Flachbettschüttler Rocky	Fröbel Labortechnik, Lindau
Folienschweißgerät	Krupps, Solingen
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Kirchdorf
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Hanau
Glaspipetten 5 mL, 10 mL, 25 mL	VWR Int. GmbH, Darmstadt
Inkubationsschüttler	Infors AG, Buttmingen, Schweiz
Inkubator WON 105	Witeg, Wertheim
Intas Gel Imager Agarose Geldokumentation	INTAS, Göttingen
Kühlschrank +4 °C	Liebherr, Kirchdorf
LAS3000 mini Imager	Fujifilm, Japan
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Magnetrührer MR 3000D	Heidolph, Schwabach
Mikrowelle	Medison, Essen
Mini Trans-Blot Cell Western Blot System	BioRad, München
Mini-PROTEAN 3 Cell Elektrophorese System	BioRad, München
NanoDrop One C	ThermoScientific, Waltham, USA
pH-Meter	Inolab, Weilheim
Pipetboy 2	Integra Biosciences, Biebertal
Rotator mit Drehteller	Baacklab Armin Baack, Schwerin
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Sterilbank Safemate 1.2 Vision	Euroclone, Pero, Italien
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Vacunsafe Comfort Absaugsystem	Integra Biosciences, Biebertal
Vortexer MS 2 Mini Shaker	IKA Labortechnik, Staufen
Waage AE160	Mettler-Toledo, Göttingen
Waage Kern PCB	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Wasserbad GFL 1092	GFL, Burgwedel
Wasserbad SUB6	Grant Instruments, Cambridgeshire, UK
Zentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Biofuge stratos	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Hettich Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Hettich Universal 320R	Hettich, Tuttlingen

3.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien

Artikel	Herstellfirma
Aluminiumfolie Aro	Aro, Metro
Einmalküvetten Kunststoff	Roth, Karlsruhe
Einweghandschuhe Nitril	STARLAB GmbH, Hamburg
Eppendorfgefäße 1,5 ml, 2 ml, 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Gefäße 15 mL, 50 mL	VWR, Darmstadt
Glaspipetten 1 ml - 20 ml	VWR, Darmstadt
Glaspipetten 5 ml- 25 ml	VWR, Darmstadt
Kryoröhrchen	Apogent, Wiesbaden
Mikrotest Platten 96-well	Sarstedt, Nümbrecht
Multiwell Platten 6-, 12-, 24-, 48-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulose-Membran	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen 0,1 µl-1000 µl	Starlab, Ahrensburg
Serologische Pipette, steril 1-50 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
X-Tracta Gelausstanzer	Biozym, Hess Oldendorf
Zellschaber	TPP, Trasadingen Schweiz

3.10 Programme

Tabelle 13: Programme

Programm	Hersteller
Citavi 6	Swiss Academic Software
ADAP	Anthos
Excel 2013	Microsoft
Word 2013	Microsoft
Powerpoint 2013	Microsoft
ImageJ	Open Source
Image Reader LAS 3000 Mini	FujiFilm
SnapGene	Insightful Science
ClustalX	EMBL/UCD
NEB Calculator	https://nebiocalculator.neb.com

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Werkbänken und SII-Bedingungen durchgeführt. Das Material wurde vor Benutzung mit 70 % Ethanol desinfiziert und/oder autoklaviert.

4.1.1 Kultivieren und Passagieren

Alle Zelllinien wurden, falls nicht anders erwähnt, in 10 cm Petrischalen kultiviert und in Inkubatoren mit 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit gelagert. Das Medium und seine Zusammensetzung unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Zelllinien (s. Tabelle 4). Es enthält jedoch immer 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin. Alle Lösungen wurden vor Benutzung in einem 37 °C Wasserbad vorgewärmt. Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig unter einem Lichtmikroskop kontrolliert. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen auf Mycoplasmen getestet und im Fall einer Infektion für 14 Tage mit Plasmocin 25 µg/ml behandelt.

Ein Wechsel des Mediums um die Zellen mit neuen Nährstoffen zu versorgen und die metabolischen Abfallprodukte zu entfernen erfolgte jeden zweiten Tag. Mit einer Vakuum-Pumpe wurde das alte Medium abgenommen. Die Zellen wurden mit 2 ml kaltem PBS gewaschen, um tote Zellen zu lösen. Nach dem Entfernen des PBS wurden 10 ml frisches Medium hinzugefügt.

In Abhängigkeit von der Zelllinie und dem Wachstumsverhalten, wurden die Zellen in regelmäßigen Zeitabständen passagiert. Dies ist bei einer Konfluenz von 70-80% notwendig. Bei zu hoher Zelldichte kommt es sonst durch Kontaktinhibition zu einem Wachstumsstopp und Zelltod.

Zunächst wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. 2 ml einer Trypsin/EDTA Lösung wurden hinzugefügt und die Petrischalen wurden für 2 – 15 min unter Normalbedingungen inkubiert. Trypsin, eine Serin-Protease, löst die Oberflächenproteine und Zell-Zell/Zell-Matrix Kontakte. Der Prozess wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Reaktion wurde gestoppt durch Auffüllen mit 8 ml Medium. Die Zellen in der Lösung wurden einige Male resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung auf neue Petrischalen ausgesät. Dort wurde mit Medium auf 10 ml aufgefüllt.

Tabelle 14: Trypsinierung der Zelllinien

Zelllinie	Häufigkeit	Trypsinierung	Splitting-Verhältnis
HEK-293 T	2-3 Tage	2 min	1:10 – 1:20
HEK-GP 2	2-3 Tage	2 min	1:10 – 1:20
bEnd.3	5-6 Tage	15 min	1:5 – 1:10
CHO-K1	2-3 Tage	2 min	1:10 – 1:20

4.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen

Um einen Vorrat einer Zelllinie anzulegen, können die Zellen in einem spezialisierten Medium in einem *MrFrosty*-Behältnis für eine kurze Zeit bei - 80 °C gelagert werden. Für eine längerfristige Aufbewahrung wurde ein Transfer in flüssigen Stickstoff (- 196 °C) durchgeführt. Das Gefriermedium enthält normales Wachstums-Medium, sowie 10 % DMSO, um einer Kristallisierung vorzubeugen.

Bei einer Konfluenz von 70-80 % wurde eine 10 cm-Schale auf die in Kap. 4.1.1 beschriebene Art und Weise trypsiniert und für 4 min bei 160 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml Gefriermedium gelöst. Jeweils 1 ml wurde in Kryo-Gefäße überführt und anschließend bei - 196 °C gelagert.

Das Revitalisieren der Zellen wurde zügig in einem Wasserbad bei 37 °C durchgeführt. Die Zellsuspension wurde in 10 ml Medium gelöst und für 4 min bei 160 rpm zentrifugiert, um das toxische DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert und anschließend in einer 10 cm Schale kultiviert.

4.1.3 Zellzahlbestimmung

Für einige Experimente wurde eine spezifische Anzahl an Zellen benötigt. Dazu wurde bei einer Konfluenz von 70-80 % von einer 10 cm-Schale das Medium entfernt, die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA gelöst. Nach Stoppen der Enzymfunktion des Trypsins durch Hinzufügen von 8 ml Medium wurde die Zellsuspension für 4 min bei 160 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Medium aufgelöst und 20 µl Zelllösung wurden zu 20 µl Tryptan-Blau (1:16) gegeben. 10 µl davon wurden in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt und diese unter einem Lichtmikroskop nach Herstellerprotokoll

ausgezählt. Die Konzentration wurde anschließend mit der nachfolgenden Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{gezählte Zellen} * 10^4 * \text{Verdünnung}}{\text{Anzahl der gezählten Quadrate}}$$

In Abhängigkeit von der Petrischalen-Größe und der verwendeten Zelllinie, wurde die benötigte Anzahl Zellen einen Tag vor den Experimenten in die entsprechenden Petrischalen ausgesät.

4.2 Biochemische und analytische Methoden

4.2.1 Transfektionen

Bei einer Transfektion wird fremde DNA oder RNA in eukaryotische Zellen eingebracht. Es wird zwischen transienten und stabilen Transfektionen unterschieden. Bei einer transienten Transfektion wird die eingebrachte Fremd-DNA nach wenigen Tagen wieder abgebaut. Bei einer stabilen Transfektion soll eine langfristige Expression mittels Integration in das Genom der Zellen erreicht werden.

4.2.1.1 Transiente Transfektion

Die transienten Transfektionen der HEK 293T Zellen und der CHO K1 Zellen wurden mit Hilfe von Polyethylenimine (PEI) durchgeführt. Dazu wurden am Vortag je 200.000 Zellen in einer 6-Well Platte in 2 ml Medium ausgesät. 1 h vor der Transfektion wurde zu serumfreiem Medium gewechselt. Anschließend wurden 1 µg DNA und 4 µg PEI in je 30 µl serumfreies Medium gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die beiden Lösungen wurden gründlich vermischt und für 15 min bei RT inkubiert, bevor sie auf die Zellen gegeben wurden. 4 - 6 h nach der Transfektion wurde das Medium erneut gewechselt. Nach 48 h wurden die Zellen für weitere Experimente verwendet oder lysiert.

Für die Transfektion der bEnd.3 Zellen wurden diese zu je 1.500.000 Zellen in 6 cm Schalen in 5 ml Medium ausgesät. Aufgrund des Transfektionsverhalten der Zellen wurden diese in verschiedenen Konzentrationen und Verhältnissen mit Lipofectamine 2000 transfiziert (s. Tabelle 15). Die DNA und das Lipofectamine wurden dazu in jeweils 60 µl serumfreies Medium gegeben, die beiden Ansätze vermischt und nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT auf die Zielzellen gegeben. 24 h nach der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Tabelle 15: bEnd.3 Transfektion mit Lipofectamine

Plasmid	DNA	Lipofectamine	Verhältnis	Lyse nach
pcDNA (Kontrolle)	4 µg	4 µl	1:1	48 h
pcDNA- Leader-myc- LRPCT	4 µg	8 µl	1:2	48 h
				72 h
pcDNA- Leader-myc- LRPCT	2 µg	8 µl	1:4	48 h
				72 h
pcDNA- Leader-myc- LRPCT	3 µg	9 µl	1:3	48 h
				72 h

4.2.1.2 Stabile Transfektion

Die stabile Transfektion von bEnd.3 Zellen mit dem myc-LRPCT Konstrukt wurde mit Hilfe von Retroviren umgesetzt. Dazu wurden an Tag 1 HEK-GP2 Zellen, als virusproduzierendes System, in einer mit Polyornithin beschichteten 10 cm Schale kultiviert. An Tag 2 (60 – 80 % Konfluenz) wurden diese Zellen mit 25 µM Chloroquine behandelt und anschließend mit der Ziel-DNA und einem pVSVG Plasmid transfiziert. Dazu wurden 10 µg DNA und 40 µl PEI mit je 300 µl serumfreiem DMEM gemischt, für 10 min bei RT inkubiert und dann gut gemischt. Nach weiteren 15 min Inkubation wurde die Lösung auf die HEK-GP2 Zellen gegeben. Nach 6 h wurde das Medium gewechselt. Ab diesem Zeitpunkt wurde unter SII Bedingungen gearbeitet. An Tag 3 wurde das Medium erneut gewechselt, diesmal auf 5 ml DMEM. Die bEnd.3 Zellen (Zielzellen) wurden in einer 6 cm Schale ausgesät (50 % Konfluenz). An Tag 4 wurde das Medium der HEK-GP2 Zellen abgenommen, zentrifugiert (4 min, 1200 RPM) und 2 ml des Viren-Überstandes mit 1 ml frischem Medium und 20 µg/ml Polybrene auf die bEnd.3 Zellen (Zielzellen) gegeben. Nach weiteren 24 h wurde bei diesen erstmalig das Medium gewechselt und die Zellen wurden in eine 10 cm Schale transferiert. 2 Tage nach der Transfektion wurde die Behandlung mit der Selektionsantibiose (Blasticidin) begonnen.

4.2.1.2.1 Antibiotische Tötungskurve

Um die benötigte Blastocidin-Konzentration zu bestimmen, bei welcher nach 14 Tagen Behandlung alle nicht transfizierten Zellen verstorben sind, wurde eine antibiotische Tötungskurve durchgeführt. Dazu wurden je 100.000 native bEnd.3 Zellen in 1 ml Medium in eine 12-Well Platte ausgesät und 14 Tage lang alle 2 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen Blastocidin (0 µg/ml – 20 µg/ml) behandelt. Unter dem Mikroskop wurde der Fortschritt kontrolliert und nach 14 Tagen die Selektionskonzentration abgelesen. Es ergab sich eine Konzentration von 6 µg/ml Blastocidin.

4.2.1.2.2 Einzelklon Selektion

Nachdem die stabil transfizierten Zellen 14 Tage lang mit Blastocidin selektioniert wurden, wurde eine Einzelzellselektion durchgeführt, um die Stabilität der Expression weiter zu erhöhen. Dazu wurden die Zellen einer 10 cm Platte gezählt, auf 1 Zelle/100 µl verdünnt und in einem Volumen von je 100 µl auf einer 96-Mikrowell Platte ausgesät. Unter regelmäßigem Wechsel des Mediums und der Selektionsantibiose wurde beobachtet, in welchen Wells sich ein einzelner stabil transfizierter Zellklon teilt. Diese wurden dann in 6 cm- und 10 cm Schalen transferiert und mittels Western Blotting auf die Expression des Konstrukts hin untersucht und verglichen. Bei positivem Ergebnis wurde der Klon weiter kultiviert und für die nachfolgenden Experimente verwendet.

4.2.2 Aufnahme von Antikörpern

Bei den Experimenten zur Aufnahme der Antikörper wurde stets der anti-Myc-Antikörper 9E10 aus der Maus verwendet, der sich spezifisch gegen den myc-tag richtet. Die zu untersuchenden Zellen wurden einen Tag vorher in 6 cm Schalen ausgesät (bEnd.3 -1,5 Mio Zellen; CHO K1 - 1 Mio Zellen) und 1 h vor dem Hinzufügen der Antikörper wurde zu serumfreiem Medium gewechselt. Anschließend wurden definierte Mengen des Antikörpers und evtl. zusätzlich NH₄CL, als lysosomaler Inhibitor, hinzugegeben und die Zellen nach einer vorgegebenen Zeit lysiert. Unter verschiedenen Modalitäten, s. Tabelle 16, wurde die Internalisierung der Antikörper und das Binden der Antikörper an die Zelloberfläche untersucht und verglichen.

Tabelle 16: Aufnahme von Antikörpern

Zelllinie	Transfektion	Richtung	Dauer	Antikörper	NH ₄ Cl	Auswertung
CHO K1	Transient	apikal	30 min 37 °C	50 µg	0 mM	Oberflächlich- gebunden + internalisiert
				75 µg		
				100 µg		
				125 µg		
				150 µg		
bEnd.3	Transient	apikal	60 min 37 °C	10 µg	0 mM	internalisiert
				20 µg		
bEnd.3	Stabil	apikal	60 min 37 °C	50 µg	0 mM	internalisiert
				75 µg		
				100 µg		
bEnd.3	Stabil	apikal	15 min 37 °C	50 µg	0 mM	Oberflächlich- gebunden + internalisiert
			60 min 37 °C			
			14 h 37 °C			
bEnd.3	Stabil Klon G7	apikal	60 min 37 °C	100 µg	0 mM	Oberflächlich- gebunden + internalisiert
					10 mM	
					20 mM	
bEnd.3	Stabil	Basolateral (10 cm Inserts mit 0,4 µm Porengröße)	60 min 37 °C	200 µg	0 mM	internalisiert

4.2.3 Zelloberflächenbiotinylierung und Immunpräzipitation

Um zu unterscheiden, ob die an der Zelloberfläche exprimierten myc-LRPCT Rezeptoren apikal und/oder basolateral in den bEnd.3 Zellen vorzufinden sind, wurde eine Oberflächenbiotinylierung mit EZ-LinkTM Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin durchgeführt. Für den apikalen Nachweis wurde eine 10 cm Schale auf Eis drei Mal mit 1 ml PBS (pH=8) gewaschen, bevor 600 µl Biotinlösung (3 mg) in 1 ml PBS in die Petrischale gegeben und für 1 h bei 4 °C inkubiert wurde. Im Anschluss wurde das überschüssige Biotin durch dreimaliges Waschen mit 1 ml PBS + 100 mM Glycin gequenchet. Für den basolateralen Nachweis wurden die Zellen in 6 cm Transwells

kultiviert, diese für die Biotinylierung umgekehrt gelagert und mit 2 mg Biotin behandelt. In beiden Fällen folgte die Lyse nach dem Protokoll in Kapitel 4.2.4. Um die biotinylierten Proteine aus den Lysaten zu isolieren wurde eine Immunpräzipitation mit Streptavidin Sepharose Beads durchgeführt. Auf 200 µg Protein wurden 50 µl Beads gegeben, mit NP40 Lysepuffer + Proteaseinhibitor auf 500 µl aufgefüllt und über Nacht bei 4 °C auf dem Rotationsrad inkubiert. Durch kurze Zentrifugation wurden die Beads gesammelt, der Überstand vorsichtig abgenommen und die Beads drei Mal mit 500 µl NP40 + PI gewaschen. Der Überstand wurde als Kontrolle aufbewahrt. Durch Zugabe von 20 µl Rotiload + 5 µl H₂O und Aufkochen bei 95 °C für 5 min wurden die Proteine von den Beads eluiert.

4.2.4 Lyse der Zellen

Die Zelllyse wurde auf Eis durchgeführt. Nach dem Entfernen des Mediums, wurden die Zellen zwei Mal mit 1 ml PBS (pH=7.4) gewaschen. Bei den Internalisierungs-Experimenten mit Antikörpern folgten zwei Waschschriffe mit PBS (pH=2), um an der Oberfläche gebundene Antikörper zu lösen. Dieses PBS wurde für eine spätere TCA-Fällung in einem Eppendorfgefäß gesammelt. In der Schale wurden die Zellen in 1 ml PBS (pH=7.4) durch Abschaben vom Boden gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zentrifugation (4 min, 4000 RCF, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Gewicht der Pellets in mg bestimmt. Pro mg Pellet wurden 4 µl NP-40 Lysepuffer, welcher 50X Proteaseinhibitor enthält, hinzugefügt. Nach einer Inkubation für 20 min auf Eis, wurden die Proben zentrifugiert (20 min, 18620 RCF, 4 °C). Die Lysate wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20 °C gelagert, das Pellet wurde verworfen.

4.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration – Bradford assay

Um die Konzentration der Proben zu bestimmen wurde das *BCA™ Protein Assay Kit* genutzt. Das Prinzip dieser Methode ist die Biuret Reaktion, welche die Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch Proteinbindungen in einem alkalischen Milieu meint. Das reduzierte Cu⁺ formt einen lila-farbigen Komplex mit Bichinolin-4-Carbonacid (BCA), welcher durch Photometrie bei einer Wellenlänge von 562 nm nachgewiesen werden kann.

5 µl der zu bestimmenden Probe wurden mit 45 µl *ddH₂O* gemischt. Als Referenz wurde eine Standardkurve mit BSA verwendet. Die BCA Reagenzien wurden im Verhältnis 50:1 gemischt und je 1 ml zu den Proben und dem BSA-Standard hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben für 30 min 65°C auf einem Thermo-

Rüttler inkubiert. Für die anschließende photometrische Messung wurden Duplikate von je 200 µl auf eine 96-Mikrowell-Platte aufgetragen und anhand der Messwerte und der Standardkurve die Probenkonzentrationen berechnet.

Tabelle 17: Pipettierschema BSA Standard

Konzentration (µg/µl)	ddH ₂ O (µl)	BSA Standard (1 mg/ml)
0	50	0
100	45	5
200	40	10
300	35	15
400	30	20
500	25	25

4.2.6 TCA Fällung

Mit Trichloressig-Säure (TCA) ist die Fällung von Proteinen in niedrigen Konzentrationen oder in großen Volumina möglich. Eine Volumeneinheit TCA wurde zu drei Volumeneinheiten der Probe hinzugefügt. Nach 10 min Inkubation auf Eis, wurden die Eppendorfgefäße zentrifugiert (5 min, 14 000 RCF). Der Überstand wurde entfernt. Das Pellet wurde mit 200 µl kaltem Aceton gewaschen und zentrifugiert (5 min, 14 000 RCF). Dieser Waschschrift wurde zwei Mal wiederholt. Das Pellet wurde bei 95 °C getrocknet. Um die Probe auf ein SDS-Gel zu laden, wurde das Pellet in 20 µl 4x Roti-Load (reduzierend oder nicht-reduzierend) resuspendiert.

4.2.7 SDS PAGE

Das Ziel der Natriumdodecylsulfat - Polyacrylamid Gelelektrophorese ist es, Proteine anhand ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufzutrennen, welches an ein Polyacrylamid-Gel angelegt wird. Natriumdodecylsulfat verdeckt die initiale Eigenladung der Proteine und erlaubt so die Auftrennung nach der Größe. Die Konzentration an Polyacrylamid beeinflusst die Größe der Poren. Eine hohe Konzentration führt zu einer verstärkten Quervernetzung, welche zur Auftrennung von kleinen Proteinen benötigt wird. Die Gele enthalten zwei verschiedene Kompartimente. Der obere Bereich wird Sammelgel genannt, enthält 4 % Polyacrylamid und sorgt dafür, dass alle geladenen Proben eine gemeinsame Lauffront bilden. Der untere Bereich ist das Trenngel, in dem die Proteine in Abhängigkeit der Quervernetzung und ihrer Größe aufgetrennt werden.

Die Gele wurden in vorgefertigte Kassetten von Invitrogen mit einem Plattenabstand von 1,5 mm gegossen. Zuerst wurde das Trenngel in die Kassette gefüllt und mit

70 % - Isopropanol geglättet. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen und ein Kamm in der Mitte platziert. Nach der vollständigen Polymerisation des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in einer Laufkammer platziert.

Tabelle 18: SDS-PAGE Sammelgel 1.5 mm

Sammelgel	4%
Sammelgelpuffer pH 6.8 0.6 M Tris-HCl, 0.4% (w/v) SDS	625 µl
Wasser	1.563 ml
40% Acrylamid 29:1	312 µl
10% (w/v) APS	25 µl
TEMED	2.5 µl

Tabelle 19: SDS-PAGE Trenngel 1.5 mm

Trenngel	6%	8%	10%
Trenngelpuffer pH 8.8 1.5 M Tris-OH, 0.4% (w/v) SDS	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Wasser	6 ml	5.5 ml	5 ml
40% Acrylamid 29:1	1.5 ml	2 ml	2.5 ml
10% (w/v) APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

4.2.8 Elektrophorese

Im Normalfall wurden zwischen 20 – 40 µg Protein in die Probenaschen geladen. Davor wurden die Proben mit 4x RotiLoad (reduzierend oder nicht-reduzierend) für 5 min bei 95 °C inkubiert. Dies führte zu einer Denaturierung der Proteine und bei vorhandenem β-Mercaptoethanol zu einer Reduktion von Disulfidbrücken.

Die Laufkammer wurde mit SDS-Running Puffer (pH=8.3) gefüllt und an ein Netzteil angeschlossen. In dem eingesetzten Gel wurden die Taschen mit den Proben beladen. Auf jedes Gel wurde zusätzlich 4 µl eines Proteinmarkers aufgetragen. Während der Einlaufphase, bis sich eine Lauffront gebildet hatte, wurde für ~20 min eine Spannung von 80 V eingestellt. Anschließend wurde diese für weitere 70 min auf 120 V erhöht.

4.2.9 Western Blot

Western Blotting beschreibt den Transfer von Proteinen von einem Gel auf eine Membran, um die aufgetrennten Proteine anschließend sichtbar zu machen. In den meisten Fällen wurde eine Nitrocellulose Membran genutzt, in einigen Fällen wurde stattdessen eine PVDF (Polyvinylidendifluorid) Membran benutzt. Dazu wurden Gel und Membran nach der Sandwichmethode zusammengesetzt und in einer

Blottingkammer platziert. Diese wurde mit Blotting Puffer aufgefüllt und der Transfer erfolgte für 90 min bei 90 V auf Eis oder für 14 h bei 30 V bei RT. Eine Kontrolle des Transfers fand mittels reversibler Ponceau S-Färbung statt.

4.2.10 Coomassie- Färbung

Um Proteine direkt auf dem Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel 1 h in einer Coomassie-Brilliant-Blau Lösung gefärbt., welche an die basischen Anteile der Aminosäuren bindet. Überschüssige Farbe wurde anschließend mit zwei verschiedenen Entfärbelösungen, welche Ethanol-Essigsäure enthalten, entfernt. Diese wurden für 12 h bzw. 1 h auf das Gel gegeben. Zur Auswertung wurde das Gel eingescannt und visuell mit Hilfe von ImageJ ausgewertet.

4.2.11 Immuno-Staining

Nach dem Western Blotting sind die Proteine auf der Membran frei zugänglich. Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern, wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in einer Blockierungslösung gelagert. Diese enthält TBS-T und 5 % fettfreie Trockenmilch.

Anschließend wurde die Membran drei Mal für 10 min mit TBS-T gewaschen, bevor sie über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert wurde. Nach weiteren drei Waschschritten mit TBS-T für 10 min wurde für 1 h bei Raumtemperatur der sekundäre Antikörper in Milch auf die Membran gegeben. Wieder wurden die unspezifisch verbliebenen Antikörper in drei Waschschritten mit TBS-T entfernt.

Der primäre Antikörper dient der spezifischen Proteinbindung, wohingegen der sekundäre Antikörper sich gegen den Wirt des ersten Antikörpers richtet.

Zusätzlich ist an den sekundären Antikörper eine Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Diese katalysiert die Oxidation von Luminol mit H_2O_2 . Dieser Prozess erzeugt Lichtquanten, welche durch den Fujifilm LAS-3000 Imager detektiert wurden. Eine Signalverstärkung findet durch die zahlreiche Bindung von sekundären Antikörpern an einen primären Antikörper statt. Für die Chemiluminescence Reaktion wurden die Lösungen von *Millipore Immobilon Western (Billerica, USA)* genutzt.

4.3 DNA-Analyse und DNA-Klonierung

Bei der Klonierung wird DNA in einen Vektor eingebracht. In der vorliegenden Arbeit wurden Klonierungen durchgeführt um den artifiziellen myc-LRPCT-Rezeptor herzustellen um ihn anschließend in Zelllinien exprimieren zu können. Als Expressionsvektoren wurden pcDNA, pAAV und pLBCX Vektoren verwendet. Als

Template wurde ein pcDNA Vektor von Sebastian Jäger (AG Pietrzik) verwendet, welcher bereits den vollständigen LRP1 Rezeptor enthielt. Für die entsprechenden Vektorkarten siehe Anhang. Mittels selbst designter Primer (s. Tabelle 20,

Tabelle 21 und Tabelle 22) wurde das myc-LRPCT Konstrukt generiert und mittels Restriktionsverdau und anschließender Ligation in die Zielvektoren eingebracht. Zur Vervielfältigung wurde im Anschluss eine bakterielle Transformation durchgeführt.

Die Klonierung besteht aus folgenden Schritten:

- Herstellung des Inserts und Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion
- Restriktion der Inserts und der Vektoren, somit Herstellung von kompatiblen Enden
- Ligation der Inserts und Vektoren
- Transformation in *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämmen und Vervielfältigung der Plasmide
- Aufreinigung der Plasmide und Kontrollverdau
- Vervielfältigung der Plasmide durch Maxi-Präparation
- Abschließende Sequenzierung

4.3.1 Polymerase Ketten Reaktion

Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung einer definierten DNA-Sequenz mithilfe einer DNA Polymerase. Der Prozess besteht aus drei einzelnen Schritten: 1. Thermale Denaturierung 2. Annealing der Primer 3. Elongation. Diese Schritte wurden in 25 - 40 Zyklen wiederholt und führen zu einer hohen Konzentration der gewünschten DNA Sequenz. Temperatur und Dauer der einzelnen Schritte sind abhängig von Primer-Design, Templategröße und Eigenschaften der Polymerase. Alle PCRs wurden mit der NEB's Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase und den dazugehörigen Puffern durchgeführt. Durch die Polymerase Aktivität entstehen stumpfe Enden. Um das myc-LRPCT Konstrukt in die unterschiedlichen Vektoren zu klonieren, wurden verschiedene Primer mit Schnittstellen von Restriktionsenzymen sowie der myc-Tag-Sequenz verwendet. Die PCR-Produkte stellen das Insert für die Ligationen in den Leervektor (pcDNA bzw. pLBCX bzw. pAAV) dar. Im Anschluss an die PCR erfolgte die Aufreinigung über das *NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel)*, dem Protokoll des Herstellers folgend.

Tabelle 20: Primer Klonierung pcDNA

Primer	Sequenz	Restriktions enzym	Schnittstelle
Primer_Fwd_LRPCT_Bam HI Tm: 77°C	5'- <i>ttcgggatccaagcggctggacaac</i> -3'	BamHI	GGATCC CCTAGG
Primer_Rev_LRPCT_XBal Tm: 79°C	5'- <i>gggctctagactatgccaaggggt-</i> 3'	Xbal	TCTAGA AGATCT

Tabelle 21: Primer Klonierung pLBCX

Primer	Sequenz	Restriktions enzym	Schnittstelle
Primer_Fwd_LRPCT_Xhol Tm: 83°C	5'- <i>ccgctcgagcggatgctgacccccgc</i> <i>cgttgct</i> -3'	Xhol	CTCGAG GAGCTC
Primer_Rev_LRPCT_NotI Tm: 82°C	5'- <i>gccgagcgggccgctatgccaag</i> <i>gggtccccta</i> -3'	NotI	GCGGCCGC CGCCGGCG

Tabelle 22: Primer Klonierung pAAV

Primer	Sequenz	Restriktions enzym	Schnittstelle
Primer_Fwd_LRPCT_EcoRI Tm: 85°C	5'- <i>atattggaattcggggccaccatgct</i> <i>gacccccg</i> -3'	EcoRI	GAATTC CTTAAG
Primer_Rev_LRPCT_Xhol Tm: 74°C	5'- <i>ccgctcgagctatgccaaggg-</i> 3'	Xhol	CTCGAG GAGCTC

Tabelle 23: Ansatz PCR

PCR Ansatz 20 µl	Konzentration/ Menge
DNA Template	1 µg – 10 ng
dNTP	10 mM
Fwd Primer	10 µM
Rev Primer	10 µM
Phusion DNA Polymerase	0,2 µl
5x Phusion HF oder GC Puffer	4 µl
DMSO	2-10% bei Bedarf
MgCl	25 mM bei Bedarf

Tabelle 24: PCR Amplifikation

PCR	Heizdeckel	Denaturierung	Annealing	Elongation	Finale Extension
Template Vektor bzw. Insert	104°C	Initial: 30 Sek. bei 98°C Anschließend: 10 Sek. bei 98°C	30 Sek. bei 70°C	45 Sek. bei 72°C	5 Min. bei 72°C

4.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden Agarosegele mit einem Agaroseanteil von 0,8 - 1,5 % genutzt. Dazu wurde die benötigte Menge Agarose abgewogen und in 50 bzw. 150 ml TAE Puffer aufgekocht. Anschließend wurde das Gel in die Kammer gegossen, mit 10 µl Ethidiumbromid gemischt und ein Kamm eingehängt. Nach 15 min wurde der Kamm entfernt und das Becken mit TAE Puffer aufgefüllt.

Mithilfe der Gelelektrophorese können DNA Proben, nach einer PCR oder einem Verdau mit Restriktionsenzymen, auf einem Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Dazu wurden die Proben (mind. 0,2 - 1 µg) mit dem 6x DNA Puffer versetzt, in die Taschen des Gels geladen und es wurde für 20 Minuten eine Spannung von 120 V angelegt. Als Größenmarker wurden 4 µl der 1 kb DNA Ladder auf das Gel aufgetragen. Die Auswertung wurde unter einer UV-Lichtkamera durchgeführt.

4.3.3 Verdau mit Restriktionsenzymen

Der Verdau mit Restriktionsenzymen wurde mit dem Onlinetool von *New England BioLabs* geplant (<https://nebcloner.neb.com>). Für den Verdau der Proben wurde ein 20 µl Ansatz gewählt und mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Im Anschluss an den Verdau wurden die Proben mit 4 µl 6x DNA Laufpuffer gemischt und auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen. Unter einer UV-Lampe (256 nm) wurden der geschnittene Vektor und das geschnittene Insert ausgestochen. Mit dem *NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel)* wurde die DNA in 20 µl Puffer eluiert und die Konzentration bestimmt.

Tabelle 25: Verdau mit Restriktionsenzymen

DNA	Enzyme	Puffer	Dauer	Tem.	Hitzeinaktivierung	Ziel
PCR-Produkt (=Insert) für pcDNA	1 µl BamHI 1 µl XbaI	2 µl 10x CutSmart	24 h	37°C	Nein	Vorbereitung Ligation
Leervektor pcDNA						Vorbereitung Ligation
pcDNA-Leader- myc-LRPCT						Kontrolle Mini Prep
PCR-Produkt (=Insert) für pLBCX	1 µl XhoI 1 µl NotI	2 µl 10x CutSmart	6 h	37°C	20 Min. 65°C	Vorbereitung Ligation
Leervektor pLBCX						Vorbereitung Ligation
pLBCX-Leader- Myc-LRPCT						Kontrolle Mini Prep
PCR-Produkt (=Insert) für pAAV	1 µl EcoRI 1 µl XhoI	2 µl 10x CutSmart	24 h	37°C	Nein	Vorbereitung Ligation
Leervektor pAAV	1 µl EcoRI 1 µl XhoI 2 µl Antarctic Phosphatase					Vorbereitung Ligation
pAAV-GFP- Leader-Myc- LRPCT	1 µl EcoRI 1 µl XhoI					Kontrolle Mini Prep

4.3.4 DNA Ligation

Die anschließende Ligation wurde mit dem Onlinetool von *New England BioLabs* (<https://nebcloner.neb.com>) geplant. Für die Ligationen wurde ein 20 µl Ansatz gewählt und verschiedene Ligasen, Ratios und Temperaturen getestet. Es wurden immer 50 ng des Vektors in die Ligation gegeben und davon abhängig die Menge an Insert berechnet. Im Anschluss an die Ligation wurde eine Hitzeinaktivierung der Ligase bei 65 °C durchgeführt.

Tabelle 26: DNA Ligation

Zielprodukt	Ligase	Dauer	Temperatur	Puffer	Ratio Insert:Vektor	Hitzeinaktivierung
pcDNA- Leader- myc- LRPCT	1 µl T4 DNA Ligase	16 h	20 °C	2 µl 10x T4 Puffer	1:3	10 Min. 65°C
pLBCX- Leader- Myc- LRPCT					1:3	
pAAV- GFP- Leader- Myc- LRPCT					1:5	

4.3.5 Transformation chemisch kompetenter E.coli

Für die Transformation wurden 7 µl des ligierten Plasmids zu E.coli-Bakterien des Stammes DH5α gegeben, vorsichtig vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Transformation durch einen Hitzeimpuls im Wasserbad (42 °C) für 60 sek. Nach einer weiteren zweiminütigen Inkubation auf Eis, wurden 400 µl LB-Medium hinzugefügt. Nach einer Inkubation für 60 min bei 37 °C und 200 rpm, wurden die Bakterien pelletiert (1 min, 6000 rpm), 300 µl des Überstands verworfen und in den verbliebenen 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die Bakterienlösung wurde gleichmäßig auf LB-Ampicillin Agarplatten gegeben und für 12 - 16 h bei 37 °C im Inkubator gelagert.

4.3.6 Plasmid Präparation in Bakterien

Von gewachsenen Kolonien wurden Vorkulturen in 2 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin angesetzt. Dazu wurde mit einer Pipettenspitze eine Kolonie ausgestochen und für 5 h bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde nach Anleitung des *Monarch Plasmid Miniprep Kit (New England BioLabs)* durchgeführt. Für die Herstellung von größeren Mengen der Plasmid-DNA wurde eine Kolonie in 150 ml LB-Medium mit 50 µg/ml über Nacht bei 37 °C kultiviert. Für die Aufreinigung wurde das *Nucleo Bond® Xtra Midi EF Kit (Macherey-Nagel)* verwendet. Um die Ligation und das Plasmid zu kontrollieren, wurde ein Kontrollverdau durchgeführt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Probe zur Sequenzierung versendet. Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung wurde ein 1 µl in den *NanoDrop One (Thermo Scientific)* gegeben. Bei Bedarf wurden die Proben mit DEPC-H₂O auf eine durchschnittliche Konzentration von 800 - 1000 ng/µl verdünnt. Die Lagerung bis zur Verwendung fand bei -20 °C statt.

4.3.7 DNA Sequenzierung

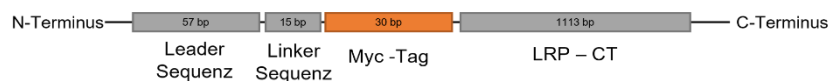
Zur Sequenzierung wurden Proben zur StarSeq GmbH gesendet. Ein 7 µl Gefäß enthält ca. 700 ng DNA und 10 pmol eines Sequenzierprimers. Die Ergebnisse wurden mit SnapGene und ClustalX ausgewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Klonierung in pcDNA

Um die zelluläre Aufnahme des anti-Myc-Antikörpers mittels des artifiziellen myc-LRPCT Rezeptors zu untersuchen, musste dieser zunächst mittels Klonierung in einem Plasmid hergestellt werden. Dazu wurden die einzelnen benötigten Sequenzen in einen pcDNA-Vektor kloniert. Das klonierte Produkt ist wie folgt aufgebaut: N-terminal ist eine Leader Sequenz und Linker Sequenz, wobei die Leadersequenz als Steuersequenz unter anderem dazu dient, das anschließend translatierte Produkt zur Zellmembran zu transportieren. Darauf folgt der eigentliche Rezeptor, der aus dem Myc-Tag und den c-terminalen 1113 bp des LRP1 - Rezeptors besteht. Der c-terminale Abschnitt des LRP1 - Rezeptors enthält die zur Internalisierung relevanten Abschnitte (s. Abbildung 5) [89]. Der so entstandene artifizielle Rezeptor besteht aus der physiologischen intra- und transzellulären LRP1 - Domäne, sowie aus einer stark verkürzten extrazellulären Domäne, die keine ligandenbindenden Domänen mehr enthält, sondern stattdessen den myc-Tag präsentiert.

A



B

GAA – CAA – AAA – CTT – ATT – TCT – GAA – GAA – GAT – CTG
 GLU – GLN – LYS – LEU – ILE – SER – GLU – GLU – ASP – LEU

C

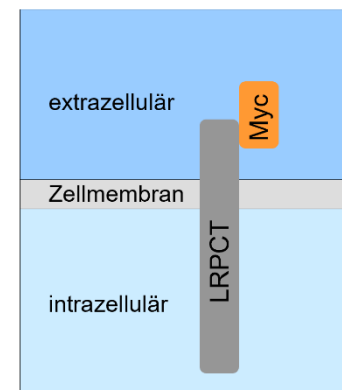


Abbildung 5: Aufbau myc-LRPCT Rezeptor.

- A. Sequenzabschnitte des Rezeptors
- B. Basen- und Aminosäuresequenz des myc-Tags
- C. Schematische Anordnung des Rezeptors in der Zellmembran

Im Anschluss an die Klonierung wurde das fertige Plasmid mittels Restriktionsenzymen geschnitten und auf ein Agarosegel aufgetragen (s. Abbildung 6). Anhand der Größe der Banden lässt sich auf die korrekte Länge der insertierten DNA schließen. Als Kontrolle wurde der ungeschnittene Vektor in der ersten Reihe aufgetragen. In der zweiten Reihe stellt, entsprechend den Schnittstellen, die

entstandene obere Bande den linearisierten pcDNA-Vektor (~5 kb) dar und die untere Bande das herausgeschnittene myc-LRPCT Konstrukt (~1,1 kb).

In einer anschließenden Sequenzierung des Vektors konnten Mutationen in der Sequenz ausgeschlossen werden, sodass im Folgenden mit diesem Vektor die Transfektionen durchgeführt wurden.

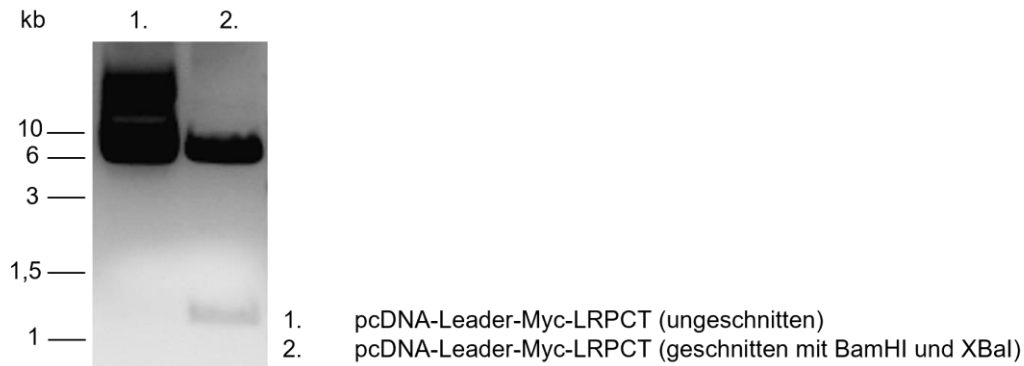


Abbildung 6: Restriktionsverdau pcDNA-Leader-myc-LRPCT. Restriktionsverdau des pcDNA-Leader-myc-LRPCT zur Kontrolle mit BamHI und XbaI, Auftrennung auf einem 1 %-Agarose Gel. Bei 1. ist der ungeschnittene Vektor als Kontrolle zu sehen. Bei 2. ist der gewählte Klon zu sehen. Die obere Bande stellt den linearisierten pcDNA-Vektor (~5 kb) dar und die untere Bande das herausgeschnittene LRPCT Konstrukt (~1,1 kb).

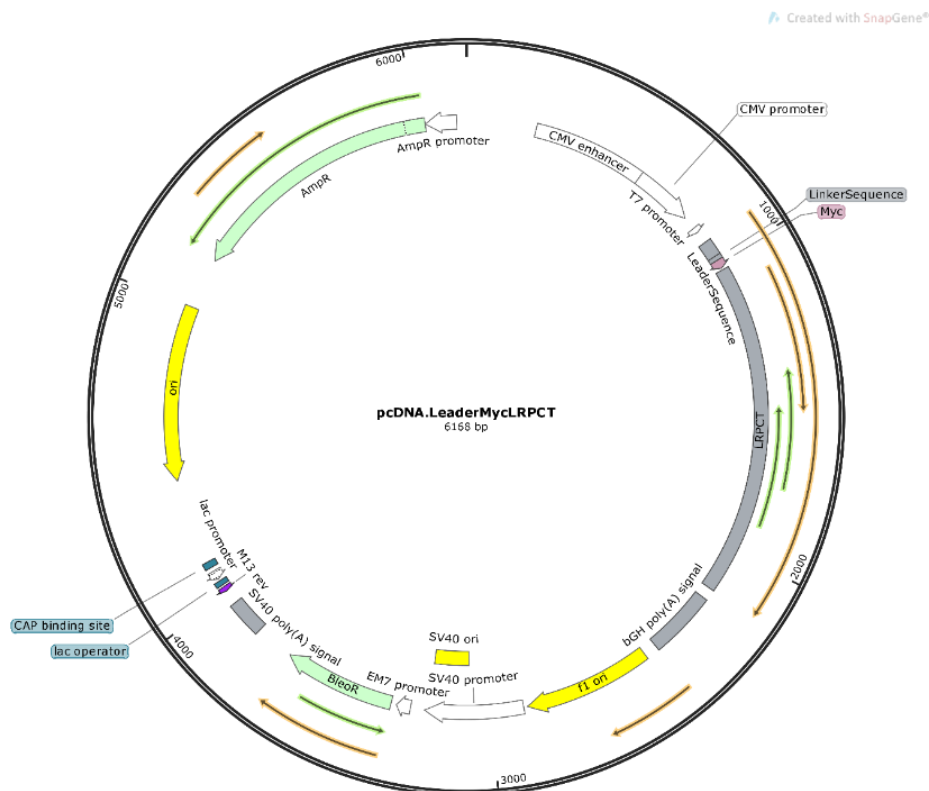


Abbildung 7: Vektorkarte pcDNA-Leader-Myc-LRPCT. Vektorkarte des klonierten Rezeptors (myc-LRPCT) in einen pcDNA Vektor. Das gesamte Plasmid ist ca. 6,1 kb groß.

5.2 Klonierung in pAAV

In 2016 hat die Arbeitsgruppe um Jakob Körbelin durch Screening einer zufälligen AAV Oberflächen Peptid-Bibliothek einen neurovaskulären endothelzellspezifischen viralen Vektor entwickelt [90]. Dank einer Kollaboration ergab sich die Möglichkeit ebenfalls mit diesem Vektor zu arbeiten. Der Vektor basiert auf einem adeno-assoziierten Virus, welches sich durch die effiziente Transduktion von neuronalen Zellen auszeichnet. Im Ausblick könnte dieser Vektor Grundlage für weitere *in vitro* und *in vivo* Forschungen des modifizierten Rezeptors darstellen. Aus diesen Gründen erfolgte die Klonierung des myc-LRPCT auch in diesen Vektor (vgl. Abbildung 9).

Bei dem anschließenden Kontrollverdau mittels Restriktionsenzymen, wurde das Plasmid pAAV-GFP-Leader-Myc-LRPCT mit XmaI und mit EcoRI + XhoI geschnitten (s. Abbildung 8). In der ersten Reihe zeigten sich Banden von je 3 und 4 kb Größe, passend zu den Schnittstellen von XmaI. In der zweiten Reihe sieht man, passend zu den Schnittstellen von EcoRI und XhoI, bei einer Höhe von 6 kb den linearisierten pAAV-Vektor und bei 1,1 kb das linearisierte LRPCT Konstrukt.

Auch dieser Vektor wurde im Anschluss sequenziert und für weiterführende Experimente bei -20 °C gelagert.

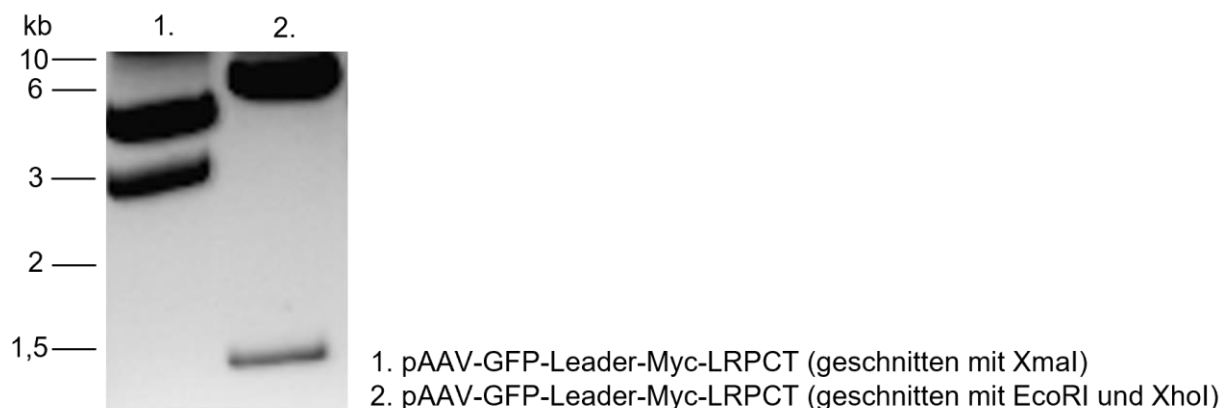


Abbildung 8: Restriktionsverdau pAAV-GFP-Leader-Myc-LRPCT. Restriktionsverdau des pAAV-GFP-Leader-Myc-LRPCT mit XmaI und mit EcoRI + XhoI, Auftrennung auf einem 1 %-Agarose Gel. In der Abbildung ist bei 1. der geschnittene Vektor in zwei Banden von ~3 kb und ~4 kb Größe zu sehen. Bei 2. stellt die obere Bande den linearisierten pAAV-Vektor (~6 kb) dar und die untere Bande das herausgeschnittene LRP-CT Konstrukt (~1,1 kb).

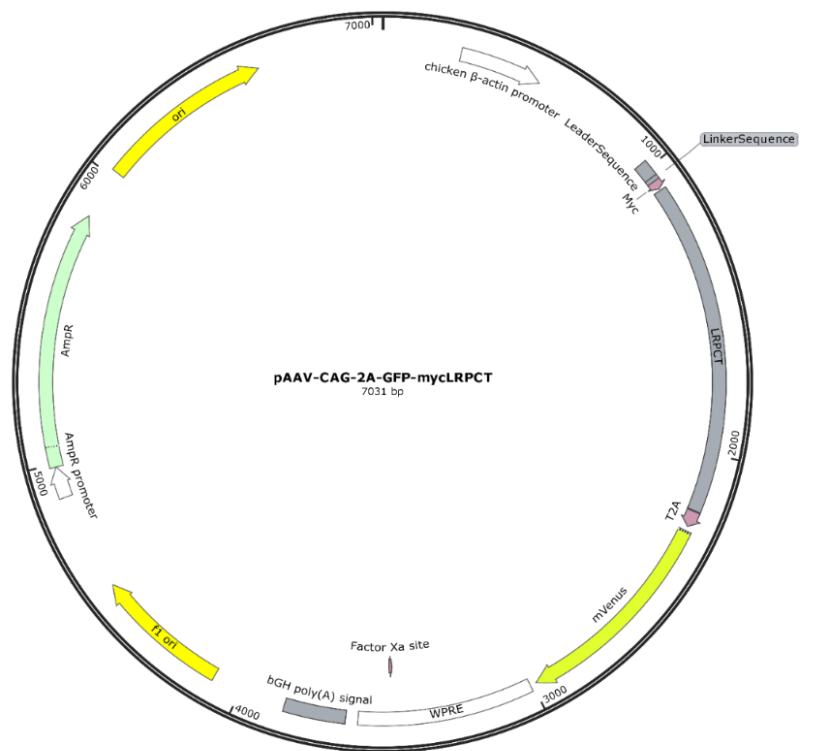


Abbildung 9: Vektorkarte pAAV-GFP-Leader-Myc-LRPCT. Vektorkarte des klonierten Rezeptors (myc-LRP-CT) in einen pAAV Vektor mit einem GFP-Element (myVenus). Das gesamte Plasmid ist ~7 kb groß.

5.3 Transfektionen

Im Anschluss an die Klonierung wurden verschiedene Zelllinien (HEK 293T, CHO K1 und bEnd.3) mit den Vektoren transfiziert und die Expression des myc-LRPCT Rezeptors mittels des anti-Myc-Antikörpers (9E10) nachgewiesen. Die HEK 293T und CHO K1 Zellen wurden mittels PEI transfiziert, für die bEnd.3 Zellen wurde Lipofectamine 2000 verwendet.

Rechnerisch ergibt sich bei 1113 bp eine Proteingröße von ca. 42 kDa. Jedoch ist in der Literatur bereits aufgezeigt worden, dass das LRPCT Konstrukt auf einer Höhe zwischen 55 und 70 kDa nachzuweisen ist [89].

Der Western Blot in Abbildung 10 zeigt die Untersuchung der transient transfizierten HEK 293T (A) und CHO K1 Zellen (B) auf die Expression des myc-LRPCT Rezeptors. In Reihe 1 sieht man jeweils zwischen 55 und 70 kDa Banden, welche das myc-LRPCT Konstrukt darstellen. Die Proben aus Reihe 2 wurden als Negativkontrolle mit einem Leervektor transfiziert. Daher zeigte sich keine Expression des Rezeptors. Als Positivkontrolle wurden die Proben aus Reihe 3 mit MT-MMP transfiziert, welches sicher durch den anti-Myc-Antikörper detektiert wird.

Es ließ sich in beiden Zelllinien die Expression von myc-LRPCT mittels des anti-Myc-

Antikörpers (9E10) nachweisen.

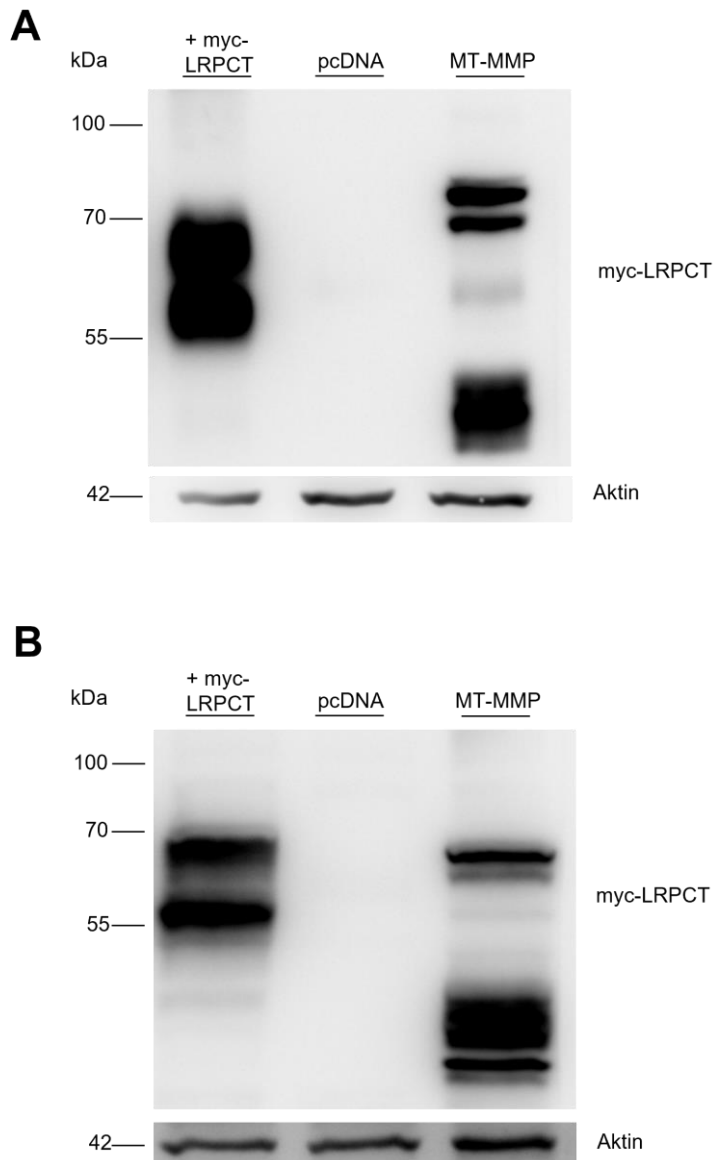


Abbildung 10: Transfektion mit myc-LRPCT. A. HEK 293T Zellen B. CHO K1 Zellen

Western Blot der transfizierten Zellen, um die Expression des Myc-LRPCT – Rezeptors nachzuweisen. Unter A. wurden HEK 293T Zellen und unter B. CHO K1 Zellen transient mit myc-LRPCT, MT-MMP (Positiv-Kontrolle) oder pcDNA (Negativ-Kontrolle) transfiziert. Die Expression in 20 µg Lysat wurde mittels SDS-PAGE (10 %iges Gel; 1,5mm) und anschließend Western Blot analysiert. Die Blots wurden mit dem anti-Myc-Antikörper (9E10) inkubiert. Aktin diente als Ladekontrolle. Zwischen 55 und 70 kDa sind die Banden zu sehen, die dem transfizierten myc-LRPCT Konstrukt entsprechen.

Um möglichst präzise die *in vivo* Situation zu simulieren und somit die klinische Aussagekraft dieser Untersuchung zu erhöhen, wurden im Verlauf bEnd.3 Zellen transfiziert. Diese sind murine Neuroendothelzellen, die durch ihre Polarisierung in eine apikale und eine basolaterale Seite, am ehesten die Verhältnisse der BHS im ZNS widerspiegeln.

Um die Effektivität der Transfektion zu optimieren wurden verschiedene Konzentrationsverhältnisse von DNA zu Lipofectamine, sowie verschiedene Inkubationszeiten untersucht (s. Tabelle 15). In allen getesteten Konzentrationspektren zeigte sich eine erfolgreiche Transfektion der Zellen (vgl. Abbildung 11 **A**). In allen Reihen konnte das myc-LRPCT Konstrukt im Bereich von 55 und 70 kDa detektiert werden. Um die Effizienz der Transfektion quantitativ zu beurteilen, wurden die relativen Proteinlevel im Vergleich zur Negativkontrolle berechnet (vgl. Abbildung 11 **B**). Die höchste Effizienz der Transfektion ist bei 3 μg DNA in 9 μl Lipofectamine nach 48 h (Reihe 5) zu sehen, sodass auf diese Art und Weise die folgenden Transfektionen durchgeführt wurden.

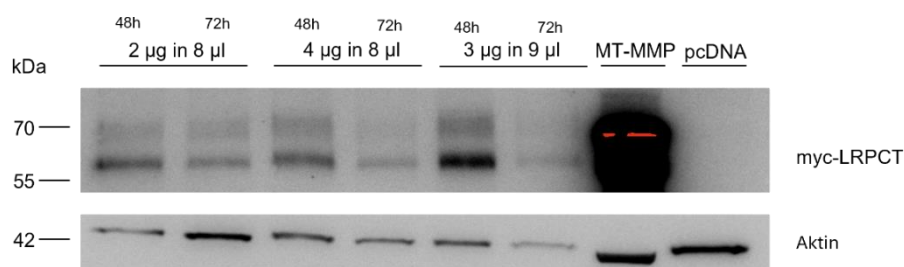
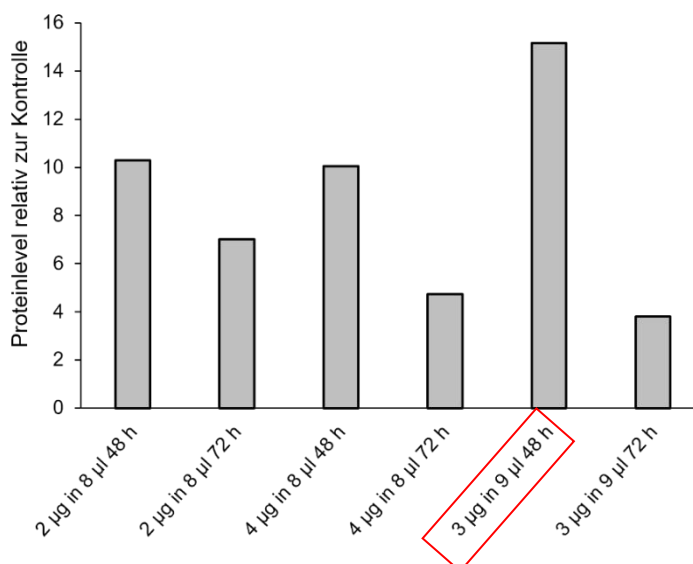
A**B**

Abbildung 11: Transiente Transfektion des myc-LRPCT Konstruktes in bEnd.3 – Zellen. **A.** Die Zellen wurden in verschiedenen Konzentrationen und Zeitdauern transient mit myc-LRPCT, MT-MMP (Positiv-Kontrolle) oder pcDNA (Negativ-Kontrolle) transfiziert. Die Expression in 20 μg Lysat wurde mittels SDS-PAGE (10 %iges Gel; 1,5 mm) und anschließendem Western Blot analysiert. Die Blots wurden mit dem anti-Myc-Antikörper (9E10) inkubiert. Aktin diente als Ladekontrolle. **B.** Zur quantitativen Beurteilung der Effizienz der Transfektion wurden die relativen Proteinlevel im Vergleich zur Negativkontrolle berechnet und miteinander verglichen.

5.4 Stabile Transfektion bEnd.3

Nach den erfolgreichen transienten Transfektionen der verschiedenen Zelllinien, war das nächste Ziel, eine Zelllinie zu etablieren, die dauerhaft das myc-LRPCT Konstrukt in einer hohen Dichte exprimiert. Dies ermöglichte die Etablierung systematischer Untersuchungen in hohem Umfang zur Antikörper-Aufnahme und Oberflächen-Biotinylierung des Rezeptors. Als Zielzellen wurden dabei die bEnd.3 Zellen genutzt. Entscheidend für die stabile Transfektion mittels viralen Vektors war zunächst die Klonierung des Rezeptors in einen pLBCX Vektor.

Bei dem anschließenden Kontrollverdau mittels Restriktionsenzymen, wurde das Plasmid pLBCX-Leader-Myc-LRPCT einmal mit NotI und XhoI geschnitten sowie ungeschnitten auf ein Agarosegel aufgetragen, s. Abbildung 12. In Reihe 1 stellt die obere Bande den linearisierten pLBCX-Vektor (~ 6 kb) dar und die untere Bande das herausgeschnittene LRPCT Konstrukt (~ 1,1 kb). Bei 2. ist der ungeschnittene Vektor als Kontrolle zu sehen. Abbildung 13 zeigt die Vektorkarte des klonierten pLBCX-Leader-Myc-LRPCT Vektors. Mutationen konnten in der anschließenden Sequenzierung des Vektors ausgeschlossen werden.

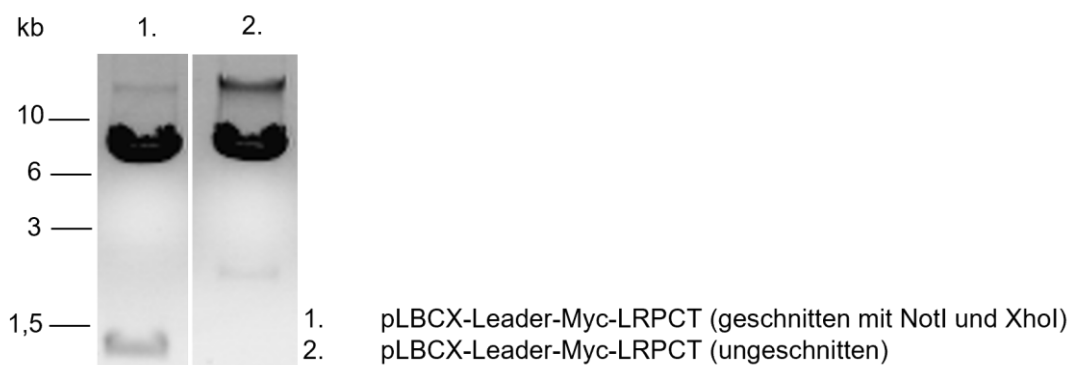


Abbildung 12: Restriktionsverdau pLBCX-Leader-Myc-LRPCT. Agarosegel eines Restriktionsverdau mit NotI und XhoI, aufgetrennt auf einem 1 %-Agarose Gel. In Reihe 1 stellt die obere Bande den linearisierten pLBCX-Vektor (~6 kb) dar und die untere Bande das herausgeschnittene LRPCT Konstrukt (~1,1 kb). Bei 2. ist der ungeschnittene Vektor als Kontrolle zu sehen.

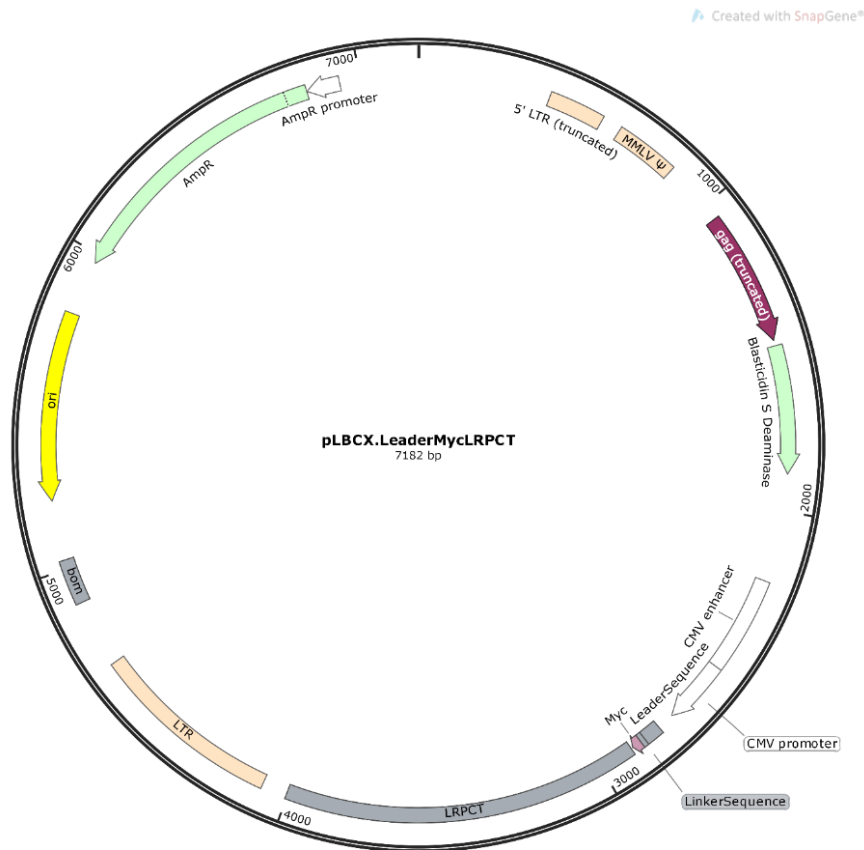


Abbildung 13: Vektorkarte pLBCX-Leader-Myc-LRPCT. Vektorkarte des klonierten Rezeptors (myc-LRPCT) in einen pLBCX Vektor. Das gesamte Plasmid ist ca. 7,1 kb groß.

5.5 Vergleich der anti-Myc-Antikörper

Im Anschluss an die Klonierung erfolgte die stabile Transfektion nach dem unter 4.2.1.1 beschriebenen Protokoll. Die Zellen wurden für 14 Tage mit 6 µg/ml Blastidicin selektioniert und anschließend auf die Expression des Rezeptors hin untersucht.

Die Bindungsaffinität spezifischer anti-Myc-Antikörper (Epitop 9E10) aus verschiedenen Produktionen in der AG Pietrzik wurde untersucht, um für die folgenden Experimente den Antikörper mit der höchsten Signalstärke zu verwenden.

In Abbildung 14 zeigt sich, dass in allen Proben das myc-LRPCT Konstrukt von unterschiedlicher Intensität durch die verschiedenen getesteten Antikörper detektiert wird. Alle Western Blots wurden in 10 sek Schritten für insgesamt 100 sek belichtet und in derselben Kontraststufe verglichen.

Die relativ höchste Detektionseffizienz des myc LRPCT Rezeptors zwischen 55 und 70 kDa im Vergleich zur Kontrolle ist bei Abbildung 14 **C** (anti-Myc-Antikörper 3) zu sehen. Im relativen quantitativen Vergleich zeigte sich eine 1,5 fache Steigerung der

Expression. Alle weiteren Experimente wurden mit Antikörpern aus dieser Produktion durchgeführt.

Zusätzlich wurde eine Inkubation mit dem anti-LRP-Antikörper (1704) durchgeführt (vgl. Abbildung 14 **D**), welcher spezifisch die β -Kette von LRP1 erkennt. Auch hier zeigte sich, dass in der Probe das LRPCT Konstrukt exprimiert wird. Zusätzlich ist in beiden Proben als obere Bande die β -Kette von LRP1 (85 kDa) zu sehen.

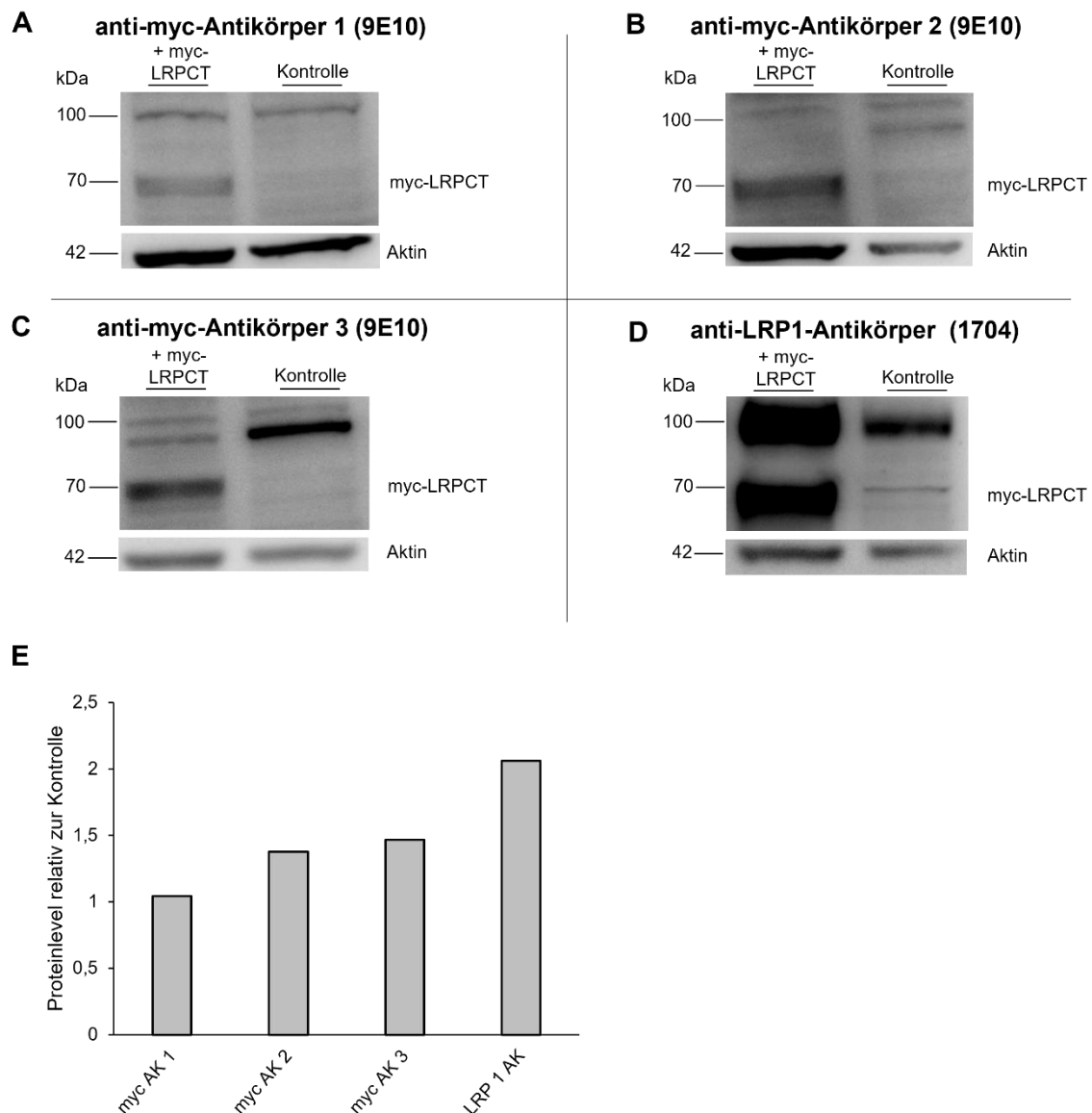


Abbildung 14: Vergleich anti-Myc-Antikörper in stabil transfizierten myc-LRPCT bEnd.3 Zellen. **A.-D.** Western Blot der stabil transfizierten bEnd.3 Zellen, um die Expression des myc-LRPCT – Rezeptors nachzuweisen und die möglichen Antikörper zu vergleichen. Aufgetragen ist jeweils eine Probe der transfizierten Zellen und nicht transfizierten Zellen als Negativkontrolle. Es wurden jeweils 20 μ g Lysat über ein 10 %iges SDS-Gel aufgetrennt. Die Inkubation erfolgte mit drei verschiedenen Anti-Myc-Antikörpern (9E10) (**A.-C.**) und einem LRP1–Antikörper (1704) (**D.**). Aktin diente als Ladekontrolle. **E.** Zur quantitativen Beurteilung der Effizienz der Antikörper wurden die relativen Proteinlevel im Vergleich zur Negativkontrolle berechnet und miteinander verglichen.

5.5.1 Einzelklonselektion

Um die Stabilität der Expression zusätzlich zu erhöhen und eine gesteigerte Dichte an exprimierten Rezeptoren zu erreichen, wurden im Anschluss aus der stabil transfizierten bEnd.3 Mischkolonie Einzelzellklone selektioniert. Auch diese wurden mit Blasticidin behandelt und die Expression des myc-LRPCT-Rezeptors untersucht.

Verglichen wurden zwei Einzelzellklone (G7 und H6) mit der stabil myc-LRPCT transfizierten Mischkolonie und mit transient transfizierten bEnd.3 Zellen (vgl. Abbildung 15). In der quantitativen Auswertung zeigte sich bereits eine Steigerung der Rezeptordichte um +214 % in der Mischkolonie im Vergleich zu den transient transfizierten Zellen. Der Klon G7 (+373%) zeigte die stärkste Expression im Vergleich zu den transient transfizierten Zellen, weshalb die weiteren Experimente mit dieser Zellreihe durchgeführt wurden.

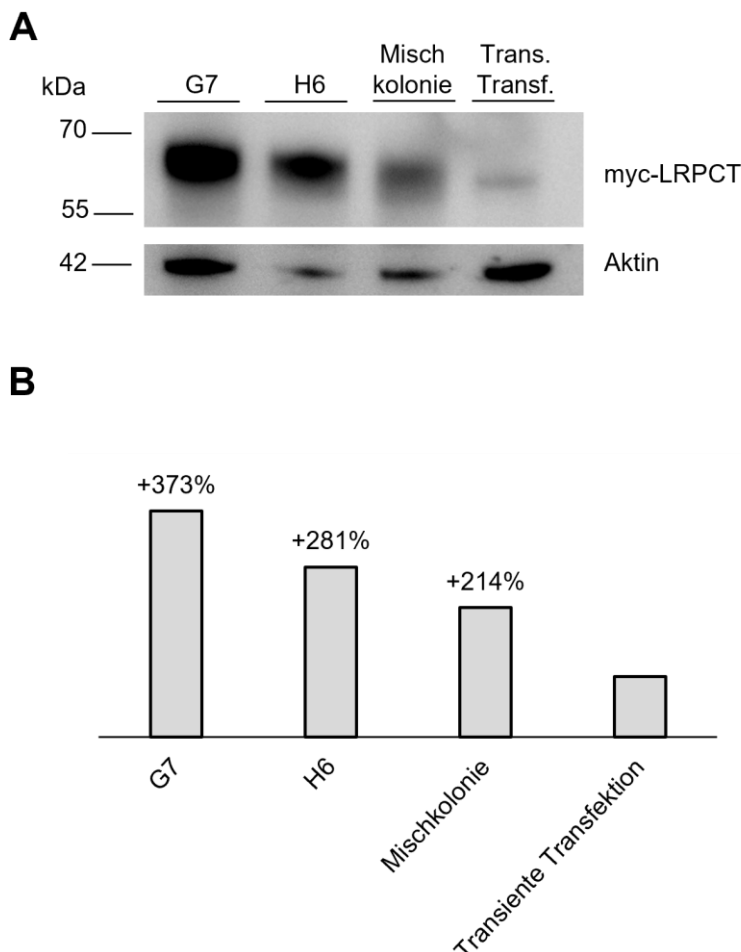


Abbildung 15: Einzel-Zell-Selektion nach der stabilen Transfektion (myc-LRPCT bEnd.3)

A. Western Blot der stabil transfizierten Einzelzellklone, um die gesteigerte Expression des myc-LRPCT – Rezeptors nachzuweisen. Es sind Lysate der Klone G7 und H6 zu sehen. Im Vergleich dazu ist eine stabil transfizierte Mischkolonie zu sehen sowie transient transfizierte bEnd.3-Zellen. Die Auftrennung von jeweils 30 µg Probe erfolgte auf einem 4-12 %igen NuPage-Gel. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran und die Inkubation mit anti-Myc-Antikörper (9E10). Aktin dient als Ladekontrolle. **B.** Quantitative Darstellung der prozentualen Rezeptordichtesteigerung der Einzelzellklone und Mischkolonie im Vergleich zu der transienten Transfektion.

5.6 Oberflächliche Bindung und Internalisierung von Antikörpern

5.6.1 CHO K1 Zellen

Um zu untersuchen, ob der exprimierte myc-LRPCT-Rezeptor in Hinblick auf die Endozytose-Funktion funktionsfähig ist und , wurden definierte Mengen (50 – 150 µg) an spezifischen anti-Myc-Antikörpern (gegen das Epitop 9E10 gerichtet) für 30 min bei 37 °C in das Medium der vorher transient transfizierten CHO K1 Zellen gegeben. Die an der Zelloberfläche gebundenen Antikörper wurden vor der Zellyse mit PBS (pH=2) gelöst und in einer TCA-Fällung für ein SDS-Gel vorbereitet. Als Negativkontrolle wurde zu nativen Zellen ebenfalls Antikörper gegeben. Als Positivkontrolle wurde verdünnter Antikörper direkt auf das Gel aufgetragen. Die anschließende Inkubation erfolgte direkt mit dem Sekundärantikörper (anti-Maus-Antikörper).

In der Auswertung hinsichtlich der oberflächlich gebundenen Antikörper zeigten sich in allen Proben Banden bei 25 und 50 kDa (s. Abbildung 16). Diese entsprechen der leichten und der schweren Kette der IgG Antikörper. Die Intensität der Banden ist unterschiedlich und lässt auf die Menge der oberflächlich gebundenen Antikörper rückschließen: bei +150 µg hat am meisten Antikörper (+675 % im Vergleich zur Negativkontrolle) oberflächlich gebunden. Bei der Negativkontrolle, +50 µg und +75 µg waren die Banden ähnlich stark ausgeprägt. Da es sich bei der ersten Probe um die Negativkontrolle handelt, ist davon auszugehen, dass es sich hier um unspezifische Bindungen des Antikörpers an der Zelloberfläche handelt (sogenannter Hintergrund). Bei 2.-3. (+50 µg und +75 µg) wurden in dieser Annahme alle Antikörper internalisiert und nur der Hintergrund blieb sichtbar. Ab einer Konzentration von 100 µg Antikörper hat eine zunehmend stärkere Bindung an der Oberfläche stattgefunden. Es ist davon auszugehen, dass die exprimierten Rezeptoren bei diesen Konzentrationen voll gesättigt waren und es deshalb zu einer Akkumulation auf der Oberfläche kam.

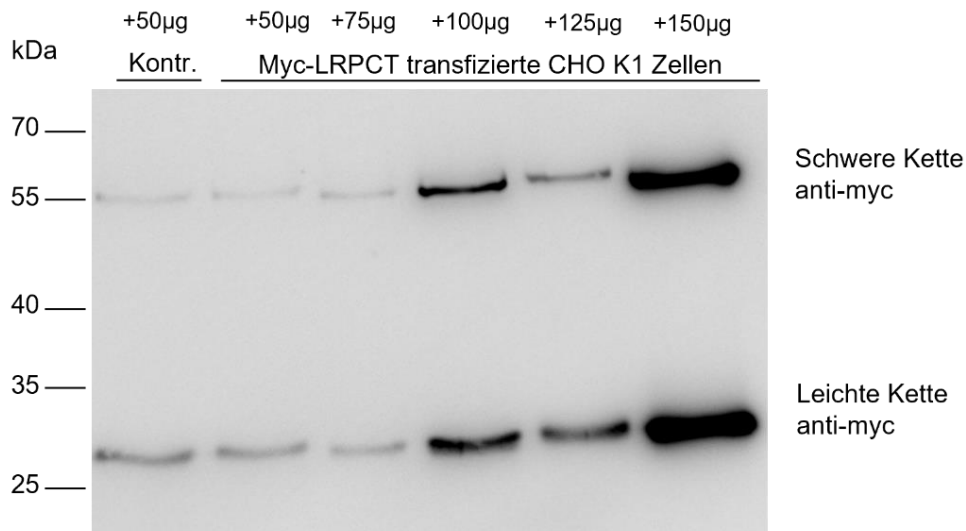
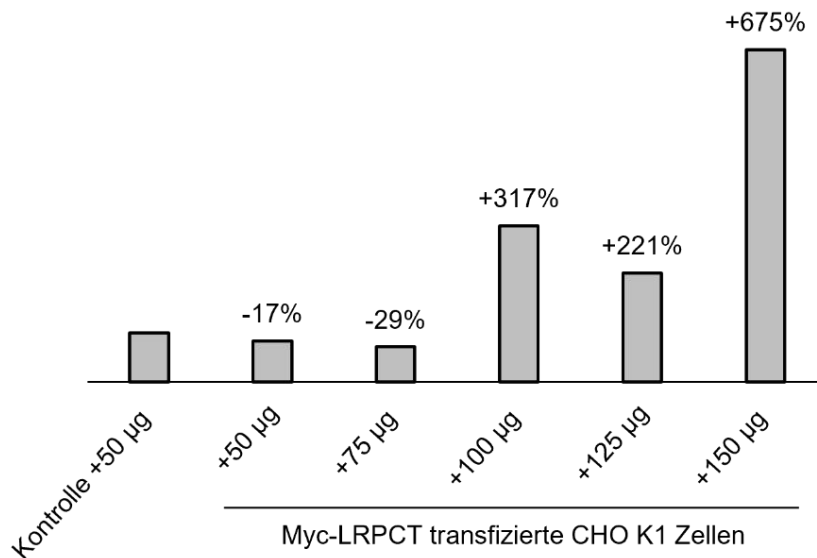
A**B**

Abbildung 16: Oberflächlich gebundene Antikörper bei CHO K1 Zellen. **A.** Western Blot der oberflächlich gebundenen Antikörper auf transient transfizierten myc-LRPCT CHO K1 Zellen. 48 h nach der Transfektion wurde auf die Zellen der anti-myc-Antikörper (9E10) in unterschiedlichen Konzentrationen gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Lösen der oberflächlich gebundenen Proteine erfolgte mit PBS pH=2. Die Auftrennung erfolgte jeweils über ein 10 %iges SDS-Gel. Die sichtbaren Banden bei 25 und 50 kDa stellen die leichten und schweren Ketten der Antikörper dar. Es erfolgte die direkte Inkubation mit dem Sekundärantikörper. **B.** Quantitative Darstellung der prozentualen Steigerung der oberflächlich gebundenen Antikörper im Vergleich zu der Negativkontrolle.

Abbildung 17 zeigt die Analyse internalisierter Antikörper. Die leichte und schwere Kette wurden hier bei 25 und 50 kDa sichtbar. Es zeigte sich eine Steigerung um +1.504 % im Vergleich der Negativ-Kontrolle zur Zugabe von +50 µg Antikörper zu den transfizierten Zellen.

Bei zunehmender Menge der zugefügten Antikörper kam es zunächst zu keiner relevanten Steigerung der Aufnahme. Erst bei +150 µg kam es zu einem Sprung auf +2.483 %.

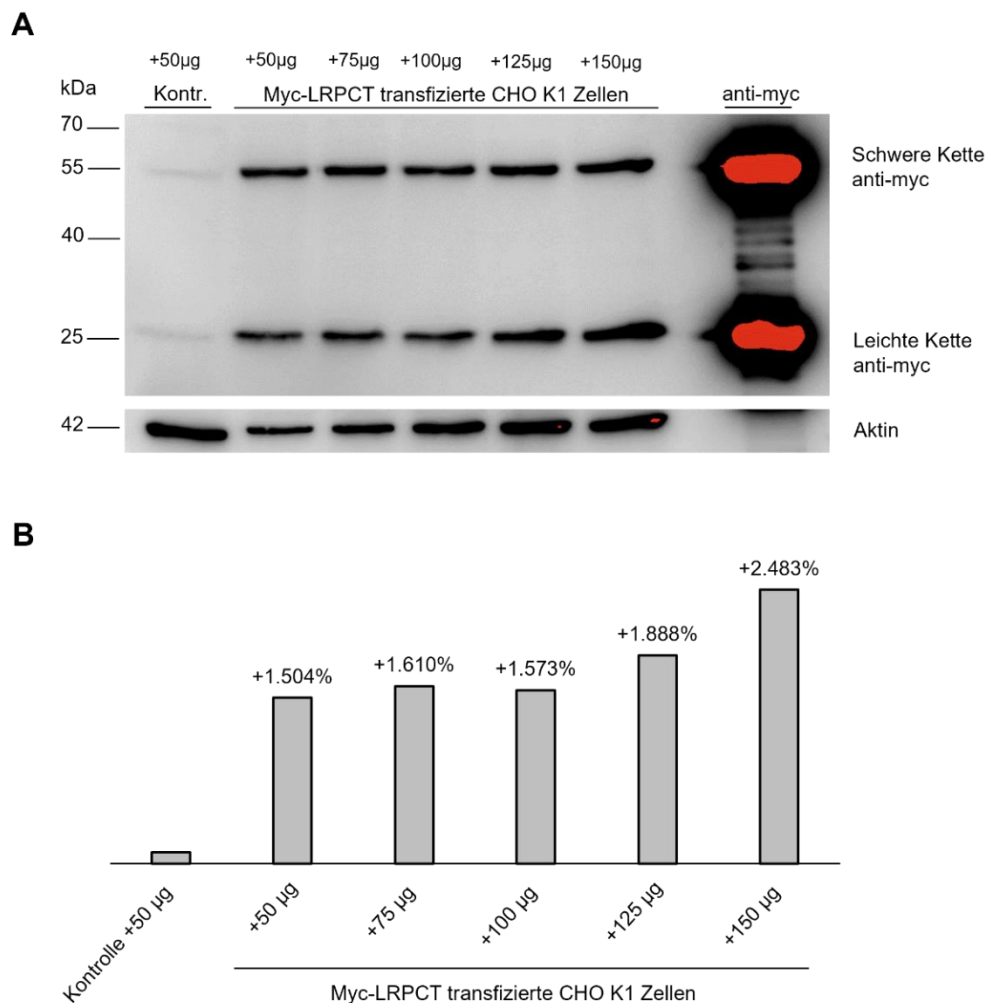


Abbildung 17: Internalisierte Antikörper bei CHO K1 Zellen. A. Western Blot der internalisierten Antikörper in transient transfizierte myc-LRPCT CHO K1 Zellen. 48 h nach der Transfektion wurde auf die Zellen der anti-Myc-Antikörper (9E10) in unterschiedlichen Konzentrationen gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Auftrennung erfolgte jeweils über ein 10 %iges SDS-Gel. Die sichtbaren Banden bei 25 und 50 kDa stellen die leichten und schweren Ketten der Antikörper dar. Es erfolgte die direkte Inkubation mit dem Sekundärintikörper. Aktin diente als Ladekontrolle. **B.** Quantitative Darstellung der prozentualen Steigerung der internalisierten Antikörper im Vergleich zu der Negativkontrolle.

5.6.2 bEnd.3 Zellen

Im Anschluss an die positiven Ergebnisse aus den Versuchen an den CHO K1 Zellen, wurden bEnd.3 Zellen analog dazu behandelt. Zunächst wurden die Zellen transient mit dem myc-LRPCT Konstrukt transfiziert und dann für 1 h 10 µg bzw. 20 µg des anti-Myc-Antikörpers (9E10) in das Medium hinzugegeben. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte Zellen verwendet.

In keiner der Proben wurden Banden sichtbar (vgl. Abbildung 18 **A**). Es ist deshalb davon auszugehen, dass kein Antikörper aufgenommen wurde. Als Kontrolle wurde verdünnter Antikörper direkt auf das Gel aufgetragen.

Da womöglich die Transfektionseffizienz bei den transienten Transfektionen zu gering war und zu wenig des Rezeptors exprimiert wurde, wurde der Versuch mit stabil transfizierten Zellen (Mischkolonie) wiederholt (Abbildung 18 **B**). Es wurden außerdem höhere Konzentrationen an Antikörpern (50 – 100 μg) verwendet. Auch hier zeigte sich kein internalisierter Antikörper im Western Blot (vgl. Abbildung 18 **B**).

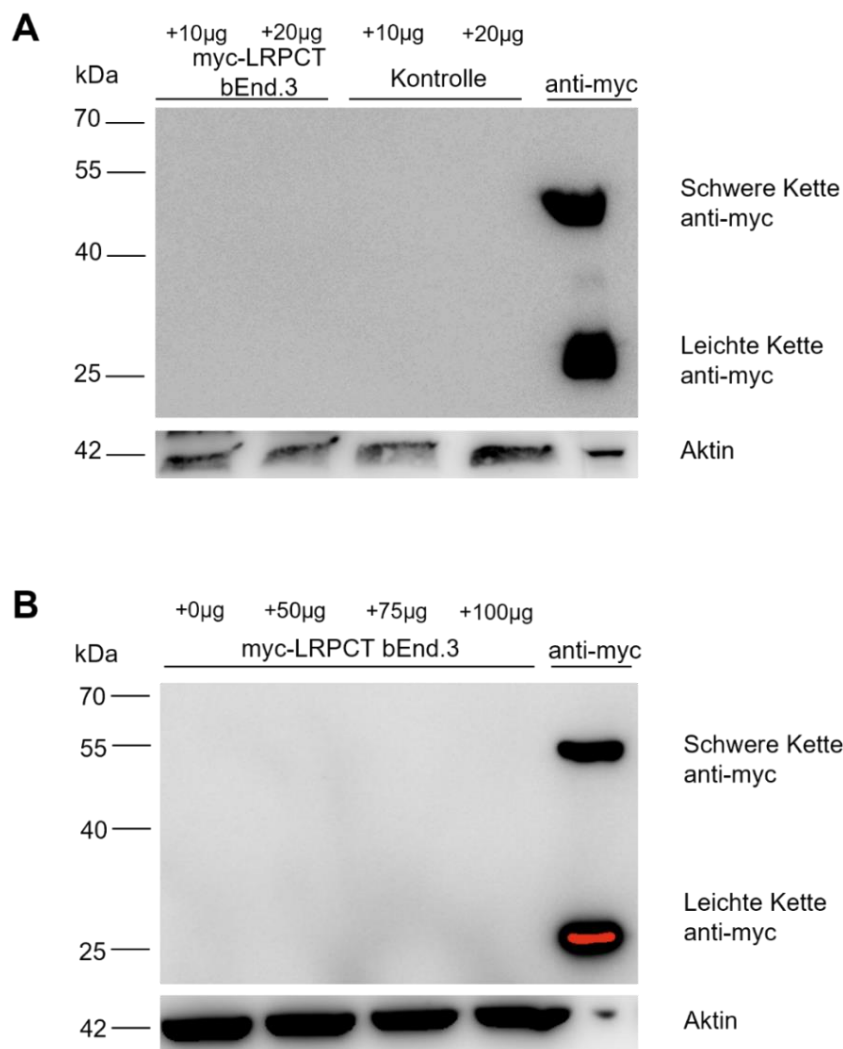


Abbildung 18: Aufgenommene Antikörper bei myc-LRPCT bEnd.3 Zellen. A. transient transfiziert. **B.** stabil transfiziert (Mischkolonie). Western Blot der internalisierten Antikörper in myc-LRPCT bEnd.3 Zellen. Auf die Zellen wurde der anti-Myc-Antikörper (9E10) in unterschiedlichen Konzentrationen gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Auftrennung von 30 μg jedes Lysats erfolgte jeweils über ein 10 %iges SDS-Gel. Es erfolgte die direkte Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Aktin diente als Ladekontrolle.

Es wurden Anpassungen im Versuchsaufbau vorgenommen und verschiedene Zeitperioden für die Aufnahme der Antikörper getestet. Dazu wurden die stabil transfizierten Zellen für 15 min, 60 min und 14 h mit 50 µg des Antikörpers bei 37 °C inkubiert. Es wurden sowohl die Veränderung der oberflächlich gebundenen Antikörper im Laufe der Zeit als auch die internalisierten Antikörper untersucht.

In der Auswertung hinsichtlich der oberflächlich gebundenen Antikörper zeigte sich, dass mit zunehmender Zeit größere Mengen an Antikörper (Banden bei 25 und 50 kDa) auf der Oberfläche der transfizierten Zellen gebunden hatten (s. Abbildung 19 **A**). Jedoch haben auch auf den Kontroll bEnd.3 Zellen nach 14 h weitaus mehr Antikörper als nach 60 min gebunden. In Abbildung 19 **B** ist die relative Zunahme der oberflächlich gebundenen Antikörper im Vergleich zur Kontrolle aufgezeigt. Es ist anhand dieses Ergebnisses nicht möglich zu unterscheiden, ob es sich um eine spezifische oder unspezifische Bindung des Antikörpers an der Zelloberfläche handelt. Abbildung 19 **C** zeigt den Western Blot der Zelllysate der transfizierten und der nativen Zellen nach Hinzugabe der anti-Myc-Antikörper. Es ist in allen Proben erneut kein aufgenommener Antikörper detektiert worden.

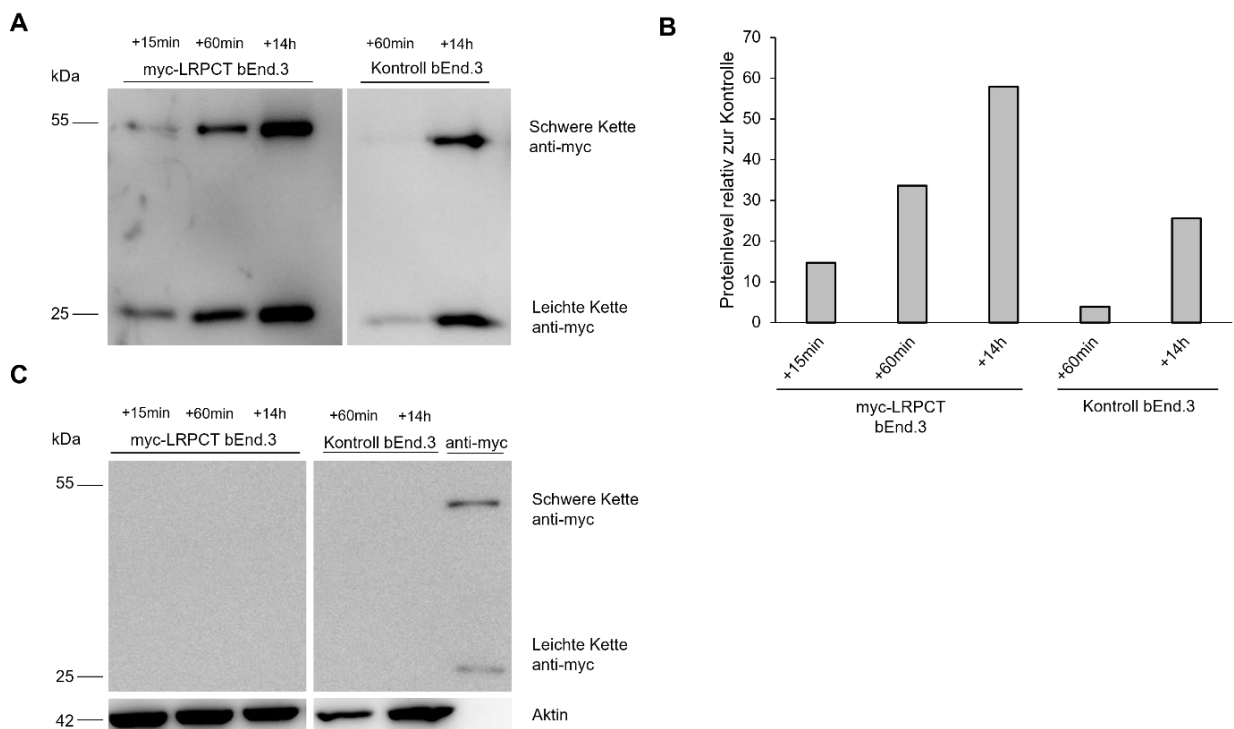


Abbildung 19: Gebundene und aufgenommene Antikörper bei myc-LRPCT bEnd.3 Zellen nach unterschiedlichen Zeiträumen. A. oberflächlich-gebundene AK. **C.** aufgenommene AK.

Western Blot der oberflächlich-gebundenen (**A.**) und der internalisierten (**C.**) Antikörper in stabil transfizierten myc-LRPCT bEnd.3 Zellen. Auf die Zellen wurden 50 µg des anti-Myc-Antikörper (9E10) gegeben und anschließend für 15 min, 60 min und 14 h bei 37 °C inkubiert. Die Auftrennung von 30 µg jedes Lysats erfolgte jeweils über ein 10 %iges SDS-Gel. Es erfolgte die direkte Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Aktin diente als Ladekontrolle.

Im weiteren Verlauf wurden verschiedene Anpassungen im Versuchsaufbau durchgeführt, um die Aufnahme von Antikörpern in die Zellen zu erhöhen und nachzuweisen. Unter anderem wurde der G7 Einzelzellklon verwendet, welcher dauerhaft und in einer höheren Dichte das myc-LRPCT Konstrukt exprimiert. Eine Hypothese, weshalb kein internalisierter Antikörper nachgewiesen werden kann, war, dass durch zu schnellen lysosomalen Abbau zu keinem Zeitpunkt eine detektierbare Menge Antikörper gleichzeitig in den Zellen vorhanden ist. Deshalb wurde im Folgenden Ammoniumchlorid (NH_4Cl) als lysosomaler Inhibitor eingesetzt. NH_4Cl verhindert innerhalb der Zellen die Fusion von Phagosom und Lysosom [91]. Auf diese Art und Weise wird der Abbau von Proteinen verzögert bzw. die aufgenommenen Antikörper können akkumulieren.

Dazu wurden die Zellen 1 h vor Zugabe der Antikörper mit verschiedenen Konzentrationen (10 - 20 mM) NH_4Cl behandelt. Anschließend wurden für 1 h 100 μg anti-Myc-Antikörper (9E10) in das Medium hinzugegeben. Im Vergleich wurden native bEnd.3 Zellen auf dieselbe Art und Weise behandelt. Es erfolgte erneut die Auswertung hinsichtlich der auf der Zelloberfläche gebundenen und der aufgenommenen Antikörper.

Auf dem Western Blot in Abbildung 20 **A**, auf welchem die oberflächlich-gebundenen Antikörper aufgetragen wurden, sind bei 25 und 50 kDa Banden zu sehen, die den leichten und schweren Ketten der Antikörper entsprechen. In den myc-LRPCT exprimierenden Proben sind diese, insbesondere die leichte Kette, deutlich stärker ausgeprägt als in den Kontroll-bEnd.3 Zellen, woraus sich schließen lässt, dass dort mehr Antikörper auf der Oberfläche gebunden haben.

In der Auswertung hinsichtlich der aufgenommenen Antikörper lassen sich in dem vorliegenden Western Blot in Abbildung 20 **B** nur Banden auf einer Höhe von 25 kDa ausmachen, welche der leichten Antikörperkette entsprechen. Diese sind insgesamt nur sehr schwach sichtbar. Es fällt auf, dass die Banden auch in der Kontrolle zu sehen sind, in welcher native bEnd.3 Zellen mit NH_4Cl und Antikörpern behandelt wurden. Es lässt sich anhand des vorliegenden Ergebnisses keine Aussage darüber ableiten, ob NH_4Cl bei der Detektion einer Aufnahme von anti-Myc-Antikörpern in myc-LRPCT bEnd.3 Zellen eine Rolle spielt.

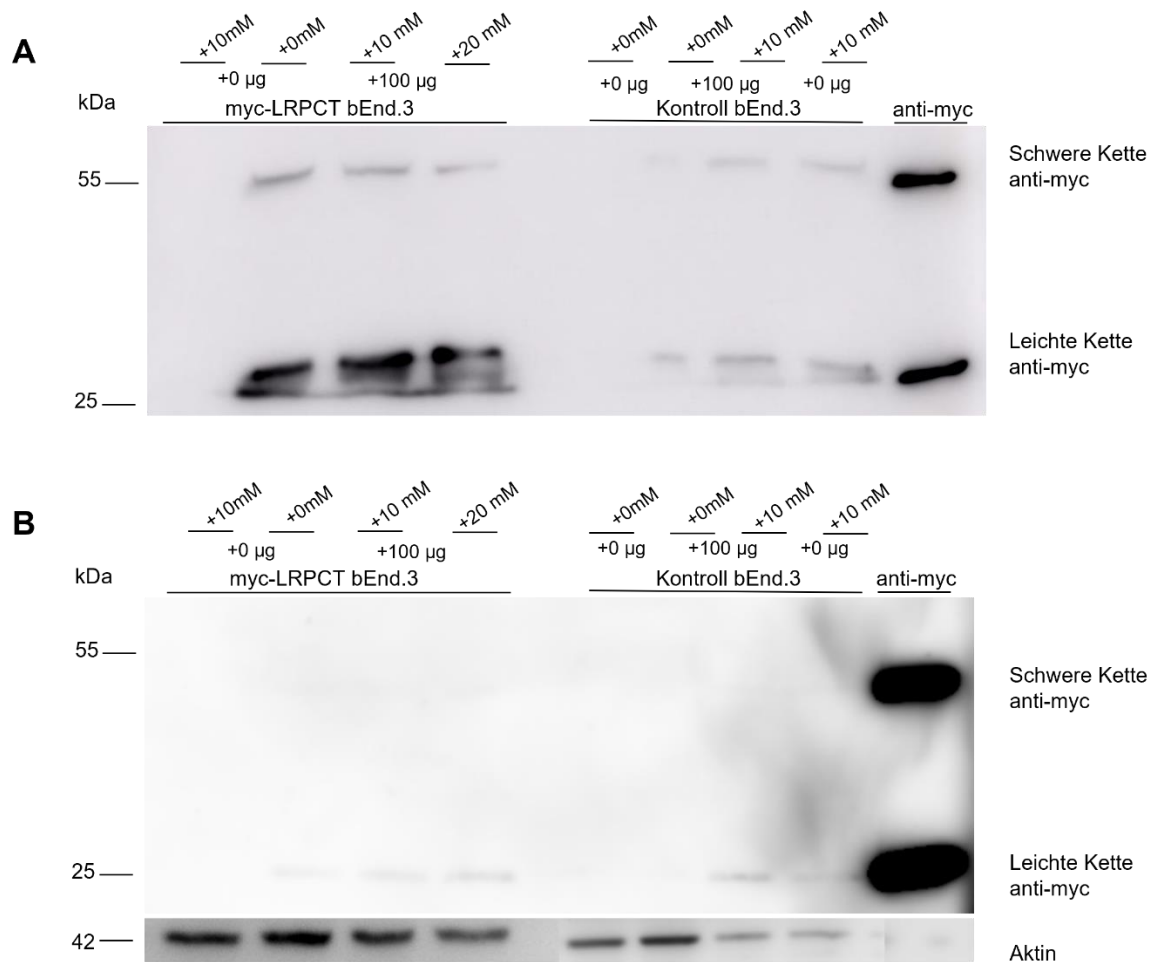


Abbildung 20: Gebundene und aufgenommene Antikörper bei G7- myc-LRPCT bEnd.3 Zellen, inkubiert mit verschiedenen Mengen NH_4Cl . **A.** oberflächlich-gebundene AK **B.** aufgenommene AK. Western Blot der oberflächlich-gebundenen (**A.**) und der aufgenommenen (**B.**) Antikörper in Zellen des Klons G7 der stabil transfizierten myc-LRPCT bEnd.3 Zellen. Auf die Zellen wurden 100 µg des anti-Myc-Antikörper (9E10) gegeben und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich erfolgte die Behandlung 1 h vor Antikörperzugabe mit unterschiedlichen Konzentrationen (0-20 mM) NH_4Cl . Die Auftrennung von 30 µg jedes Lysats erfolgte jeweils über ein 10 %iges SDS-Gel. Es erfolgte die direkte Inkubation mit dem Sekundärintikörper. Aktin diente als Ladekontrolle.

Ein weiterer Ansatz bestand in der Überlegung, ob die bEnd.3 Zellen durch die Polarisierung, die sie als Endothelzellen aufweisen, das myc-LRPCT Konstrukt sowohl apikal als auch basolateral exprimieren. In den bisherigen Versuchen wurde nur die apikale Seite betrachtet. Um die basolaterale Seite zu untersuchen, wurden die stabil transfizierten bEnd.3 Zellen in Inserts mit 10 cm Durchmesser und einer Porengröße von 0,4 µm kultiviert. Aufgrund der Zellzahl und Insertgröße wurden für 30 min 200 µg Antikörper in das Medium des basolateralen Kompartiments gegeben.

In dem anschließend durchgeführten Western Blot ist zu sehen, dass weder in den transfizierten noch in den nativen Zellen Antikörper (Negativkontrolle) über die basolaterale Seite der Zellmembran aufgenommen wurden (s. Abbildung 21).

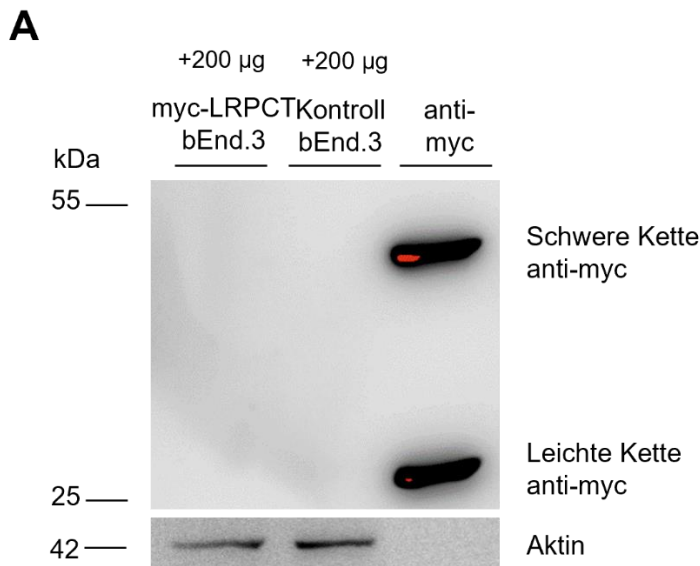


Abbildung 21: Basolateral aufgenommene Antikörper bei myc-LRPCT bEnd.3 Zellen. Western Blot der von basolateral aufgenommenen Antikörpern in stabil transfizierten myc-LRPCT bEnd.3 Zellen und Kontroll-bEnd.3 Zellen. Dazu wurden die Zellen in 10 cm Inserts mit einer Porengröße von 0,4 µm kultiviert und anschließend 200 µg des anti-Myc-Antikörper (9E10) für 30 min bei 37 °C in das basolaterale Kompartiment gegeben. Die Auftrennung von jeweils 20 µg Probe erfolgte auf einem 10 %igen SDS-Gel. Als Kontrolle wurde verdünnter Antikörper direkt aufgetragen. Es erfolgte die direkte Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Aktin diente als Ladekontrolle.

5.7 Oberflächenbiotinylierung der bEnd.3 Zellen

Um zu untersuchen, ob das myc-LRPCT Konstrukt sowohl apikal als auch basolateral exprimiert wird, wurden die Oberflächenproteine der stabil transfizierten bEnd.3 Zellen mittels einer Biotinylierung isoliert. Als Kontrolle wurden jeweils native bEnd.3 Zellen ebenfalls mit Biotin behandelt. Zur Bestimmung der apikalen Expression wurden die Zellen in 10 cm Schalen kultiviert und die Biotinlösung wurde anschließend in diese gegeben. Für die basolaterale Biotinylierung wurden Zellen in vier 6-Well Transwells kultiviert. Diese wurden im Folgenden umgedreht und die Biotinlösung wurde auf der basolateralen Seite der Inserts durch die Oberflächenspannung gehalten. Um eine genügend große Proteinmenge zu erhalten, wurden die Lysate der vier Inserts anschließend gepoolt. Neben den isolierten Oberflächenproteinen, wurde auch jeweils der Überstand der Beads aus der Immunpräzipitation aufgetragen. Dieser enthielt die nicht oberflächlichen Proteine (= intrazelluläre Proteine), welche nicht biotinyliert wurden, und gilt als Kontrolle.

Abbildung 22 A zeigt den Western Blot der apikalen Oberflächenproteine. Es ist zu sehen, dass bei den transfizierten Proben bei ~70 kDa eine Bande ist, die dem myc-LRPCT Konstrukt entspricht und damit zeigt, dass dieses auf der apikalen Oberfläche vorzufinden ist. Aktin als intrazelluläres Protein ist kaum nachweisbar und

zeigt damit an, dass es sich in der Probe tatsächlich um Oberflächenproteine handelt. Da die Inkubation mit dem anti-LRP1-Antikörper (1704) erfolgt ist, ist in allen Proben zusätzlich bei ~100 kDa die β -Kette von LRP1 zu sehen. In der Negativkontrolle mit nicht transfizierten bEnd.3 Zellen ist kein myc-LRPCT bei den apikalen Oberflächenproteinen zu sehen.

Der Western Blot in Abbildung 22 **B** zeigt die Analyse der basolateralen Rezeptorexpression. Es ist in den transfizierten Zellen eine dezente Bande bei ~70 kDa zu sehen, welche dem myc-LRPCT Konstrukt entspricht. Diese ist weit schwächer ausgeprägt, was vermutlich auf den Versuchsaufbau in den Transwells und das Poolen mehrerer Proben zurückzuführen ist. Auch in dem Überstand der Beads ist kein Aktinnachweis möglich, sodass hier nicht sicher zwischen Oberflächen- und intrazellulären Proteinen unterschieden werden kann. Bei ~100 kDa ist erneut in allen Proben die β -Kette von LRP1 nachweisbar.

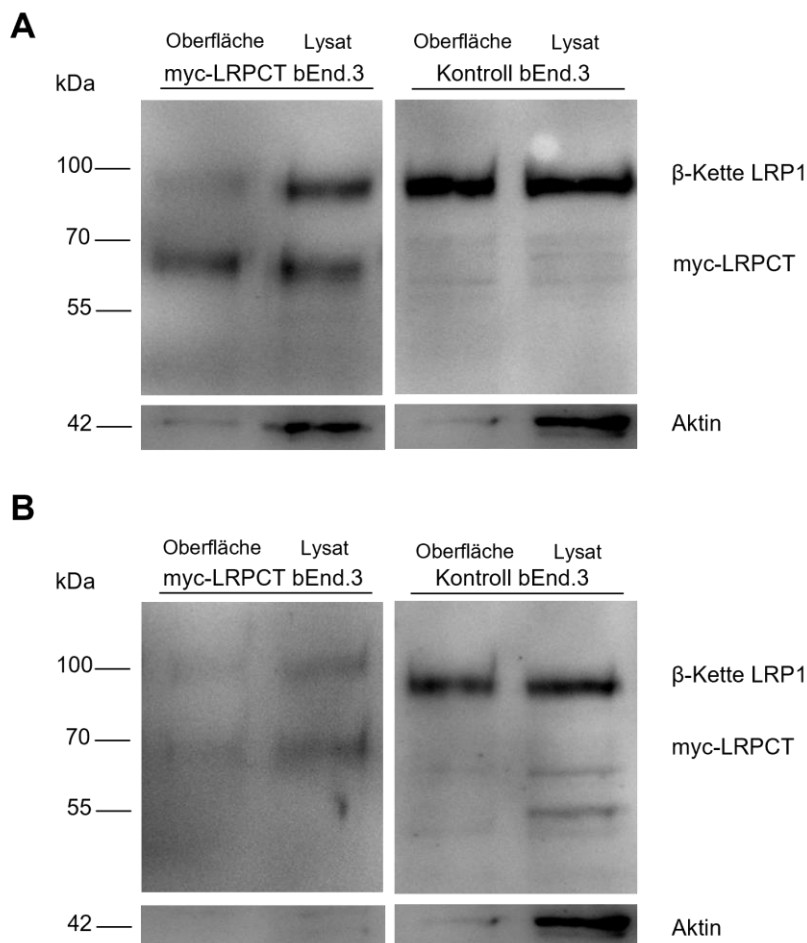


Abbildung 22: Oberflächenbiotinylierung myc-LRPCT bEnd.3 – Zellen. A. Apikal. **B.** Basolateral. Western Blot nach Biotinylierung der Zellen mit 3 mg LC-LC-Biotin für 1 h bei 4 °C und anschließender Lyse. Über Nacht wurden 500 μ g Lysat mit 20 μ l Beads auf dem Drehrad gelagert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proben getrennt voneinander über ein 10 %iges SDS-Gel aufgetrennt. Die Inkubation erfolgte mit dem anti-LRP1-AK (1704). Aktin diente als Ladekontrolle bzw. der fehlende Nachweis von Aktin als Zeichen, dass es sich um isolierte Oberflächenproteine handelt.

6 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen modifizierten LRP1 Rezeptor herzustellen und den potenziellen Transport eines Myc-Antikörpers über die BHS zu untersuchen. Dazu erfolgte in einem ersten Arbeitsschritt die Klonierung des Zielrezeptors in einen pcDNA-Vektor (vgl. Kap. 5.1.). Zunächst wurde die Expression des Konstrukts in HEK 293T Zellen und CHO K1 Zellen untersucht (Abbildung 10). Bei den HEK 293T handelt es sich um Nierenzellen, die sich aufgrund ihrer Eigenschaften, wie schnelles Wachstum, einfache Transfektion und Robustheit, gut als Modellorganismus eignen, um ein neues Verfahren zu etablieren und zu optimieren. Die CHO K1 Zellen sind chinesische Hamster-Ovarialzellen und wurden genutzt, um zusätzlich die Bindung der Antikörper an der Zelloberfläche zu untersuchen. Anschließend wurde in einem weiteren Schritt getestet, ob das Zielmolekül über das exprimierte Konstrukt in die Zielzellen aufgenommen wird.

Um zu testen, ob eine Aufnahme von Antikörpern mittels des an LRP1 gekoppelten myc-Tags in die CHO K1 Zellen möglich ist, wurden diese anschließend mit pcDNA-Leader-myc-LRPCT transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für 30 min mit 50-150 µg des anti-myc-Antikörpers (9E10) inkubiert. In allen transfizierten Zellen konnte eine Aufnahme der Antikörper (leichte und schwere Kette) nachgewiesen werden (Abbildung 17). Es zeigte sich zwischen der Negativkontrolle und den transfizierten Zellen eine Steigerung um +1.504 %. Zusätzlich wurde eine TCA-Fällung der oberflächlich gebundenen Proteine durchgeführt, um zu untersuchen, wie viel Antikörper auf der Zelloberfläche gebunden hat (Abbildung 16). Zwischen den untransfizierten Zellen (Negativkontrolle) und den transfizierten Zellen bei 50-75 µg ist eine annähernd gleichbleibende Intensität sichtbar. Diese kann als unspezifische Bindung der Antikörper auf der Zelloberfläche interpretiert werden. Anschließend ist bei höherer Konzentration (ab 100 µg) eine Zunahme der Bandenintensität zu beobachten. Es ist davon auszugehen, dass die Kapazität der Rezeptoren gesättigt war und die weiteren Antikörper deshalb auf der Oberfläche akkumuliert sind.

Um die positiven Ergebnisse aus den Versuchen an den CHO K1 Zellen in den neurovaskulären Kontext zu übertragen, wurden die Versuche im Folgenden mit bEnd.3 Zellen wiederholt. Dabei handelt es sich um murine Neuroendothelzellen, welche aufgrund ihrer Polarisierung in eine apikale und eine basolaterale Seite gut als Modellorganismus geeignet sind. 24 h nach der transienten Transfektion mit

pcDNA-Leader-myc-LRPCT konnte nach einer 60-minütigen Inkubation kein aufgenommener anti-Myc-Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 18).

Da bEnd.3 Zellen generell schwer zu transfizieren sind und meistens nur eine geringe Transfektionseffizienz aufweisen, wurden im Verlauf stabil transfizierte bEnd.3 Zellen (Mischkolonie) hergestellt. Diese exprimierten dauerhaft den artifiziellen myc-LRPCT Rezeptor. Auch diese Zellen wurden für 60 min mit anti-Myc-Antikörper inkubiert. Erneut konnte keine Aufnahme in die Zellen nachgewiesen werden und die avisierte Funktion des myc-LRPCT Rezeptors somit nicht erfüllt werden (Abbildung 19). Im Folgenden wurden verschiedene Zeitperioden (15 min, 60 min, 14 h) getestet. In den Zelllysaten ist wiederum kein aufgenommener Antikörper zu sehen (Abbildung 19). Zusätzlich wurden die an der Zelloberfläche gebundenen Proteine über ein SDS-Gel aufgetrennt. Hierbei war deutlich zu sehen, dass mit zunehmender Zeit mehr myc-Antikörper auf der Oberfläche der transfizierten Zellen gebunden hatten. Nach 14 h hatte am meisten Antikörper auf der Oberfläche gebunden. Es stellt sich die Frage, ob die Antikörper spezifisch an den myc-LRPCT-Rezeptor auf der Oberfläche gebunden haben und aufgrund fehlender Funktionalität nicht internalisiert wurden oder ob es sich um eine unspezifische Akkumulation handelt. Jedoch hat auch auf den untransfizierten Zellen nach 14 h deutlich mehr Antikörper an der Oberfläche gebunden als nach 60 min. Es ist dementsprechend davon auszugehen, dass es sich vorwiegend um unspezifische Bindungen handelt.

Im nächsten Schritt wurde eine Einzelzellselektion der stabil transfizierten Mischkolonie durchgeführt, um eine noch höhere Expression des myc-LRPCT Rezeptors zu erreichen. Der Klon G7 zeigte sich mit der höchsten Expression (+373 %) und wurde deshalb für die folgenden Versuche verwendet (Abbildung 15).

Ein möglicher Erklärungsansatz dafür, dass kein Antikörper in die bEnd.3 Zellen aufgenommen wurde, ist, dass zwar eine Aufnahme stattgefunden hat, aber die Antikörper zu schnell im Lysosom wieder abgebaut wurden und damit nicht nachweisbar waren. Um dies zu prüfen wurden im Folgenden die Experimente unter dem Einsatz von Ammoniumchlorid (NH_4Cl) wiederholt. Bei NH_4Cl handelt es sich um eine schwache Base, die durch Anhebung des intralysosomalen pH-Wertes die lysosomalen Proteasen inhibiert und zusätzlich die Autophagie der Zelle inhibiert. Somit führt die Verwendung von NH_4Cl zu einer Akkumulation der lysosomalen Proteine und dementsprechend auch von möglichen intrazellulären anti-Myc-

Antikörpern [91]. Aufgrund der generellen Zytotoxizität von NH_4Cl wurde dieses erst 1 h vor der Antikörper-Zugabe in einer Konzentration von 10 mM und 20 mM dem Medium zugefügt, anschließend wurden 100 μg anti-Myc-Antikörper dazugegeben. Bei Auswertung der oberflächlich gebundenen Antikörper zeigte sich eine verstärkte Bandenintensität bei den transfizierten Zellen unabhängig der NH_4Cl -Konzentration. Bei der Negativkontrolle ließ sich weitaus weniger gebundener Antikörper detektieren. Jedoch war jeweils die leichte Kette (25 kDa) sehr viel stärker ausgeprägt als die schwere Kette (50 kDa) (Abbildung 20). Bei Betrachtung des Western Blots der internalisierten Antikörper wurden nur die leichten Ketten schwach sichtbar. Jedoch waren diese auch in den als Negativkontrolle mit NH_4Cl behandelten nativen bEnd.3 Zellen zu sehen. Entsprechend ist davon auszugehen, dass es durch das Ammoniumchlorid trotz der geringen Konzentration zu einem zytotoxischen Effekt mit Verlust der Stabilität der Zellmembran gekommen ist und deshalb in allen Proben die leichten Antikörperketten nachgewiesen werden konnten. Eine receptorspezifische Aufnahme konnte somit nicht nachgewiesen werden.

Eine andere Ursache für die unspezifische Aufnahme (leichte Kette) in der Negativkontrolle, könnte neben der Zytotoxizität durch NH_4Cl auch eine Kontamination mit Mykoplasmen sein. Diese können verschiedene Einflüsse auf die Zellen ausüben und unter anderem zu einer Veränderung der Zusammensetzung der Zellmembran führen [92]. Da die Zellkulturen jedoch in regelmäßigen Abständen auf eine Kontamination getestet und, falls notwendig, behandelt wurden, ist ein zytotoxischer Effekt durch eine Mykoplasmeninfektion im vorliegenden Fall eher unwahrscheinlich.

Zhao et al. konnten zeigen, dass die Expression von LRP1 in humanen Kapillaren überwiegend an der Gehirn-zugewandten Seite stattfindet [93]. In der Kultivierung von primären Endothelzellen zeigte sich LRP1 ebenfalls vorwiegend auf der basolateralen Seite, was den überwiegenden Transport von Molekülen aus dem ZNS ins Blut erklärt. Dennoch hat die Transzytose von bspw. A β und der anderen multiplen Liganden immer ein kurzzeitiges Auftreten des Rezeptors auf der apikalen/luminalen Zelloberfläche (Blut-zugewandte Seite) zur Folge und kann entsprechend dort als Angriffspunkt für den Transport in das ZNS dienen. Dies bedeutet, dass auch der artifizielle myc-LRPCT Rezeptor eventuell überwiegend basolateral in den Neuroendothelzellen exprimiert wird und nur durch Transzytose temporär an der apikalen Zellseite erscheint.

Um zu untersuchen, ob der artifizielle myc-LRPCT Rezeptor in den polarisierten bEnd.3 Zellen ebenfalls überwiegend basolateral exprimiert wird, wurde eine Zelloberflächenbiotinylierung der stabil transfizierten Zellen durchgeführt. Es zeigte sich auf der apikalen Seite eine deutliche Bande auf der Höhe des myc-LRPCT Rezeptors (Abbildung 22). Der Nachweis der basolateralen Expression gestaltete sich methodisch aufwändiger, da die Zellen in Transwells kultiviert und für die Biotinylierung verkehrt herum gelagert werden mussten. Um eine ausreichende Proteinmenge zu generieren, wurden anschließend mehrere Proben gepoolt. Es war nur eine sehr schwache Bande zu erkennen, die dem myc-LRPCT Rezeptor entspricht. Der wichtigere Nachweis der apikalen Expression war jedoch möglich und es lässt sich somit die ausgebliebene Antikörper-Aufnahme nicht mit der fehlenden apikalen Expression des Rezeptors erklären.

Um zu untersuchen, ob ebenfalls basolateral keine Antikörper-Aufnahme in den Zellen stattfindet, wurden die stabil transfizierten bEnd.3 Zellen in 10 cm-Transwells kultiviert und 200 µg anti-myc-Antikörper für 60 min in das untere Kompartiment gegeben. Auch hier konnte keine Aufnahme nachgewiesen werden (Abbildung 21).

Auch wenn in den bEnd.3 Zellen bisher keine positiven Ergebnisse bezüglich der anti-Myc-Antikörper Aufnahme erzielt werden konnten, spricht einiges dafür, dass es sich um eine methodische Problematik handelt. Diese Punkte werden im Folgenden näher beleuchtet und mögliche Lösungsansätze diskutiert.

Falls es sich tatsächlich um einen zu schnellen intrazellulären Abbau der Antikörper handelt, könnte man durch eine Konzentrationsreihe mit Ammoniumchlorid, die zytotoxische Konzentration bestimmen und somit diese potenzielle Fehlerquelle ausschließen. Alternativ gibt es die Möglichkeit, einen anderen lysosomalen Inhibitor, wie zum Beispiel Chloroquin, zu verwenden. Chloroquin ist eine schwache Base und kann durch seine relative Lipophilie im unprotonierten Zustand in die Zellen eindringen. In sauren Endosomen und Lysosomen kommt es zu einer Protonierung und pH-Wert Anhebung. Diese führt dann zu einer Inhibition lysosomaler Enzyme, vor allem der Proteasen und Nukleasen [94]. So konnte zum Beispiel in einem anderen Projekt der AG Pietrzik ein, ebenfalls myc-markierter, Transferrin-Rezeptor in bEnd.3 Zellen exprimiert werden und nach Chloroquin-Behandlung eine Aufnahme von anti-Myc-Antikörpern nachgewiesen werden [95]. Jedoch kam es im Rahmen dieser Experimente mit weiter steigender Chloroquin-Konzentration im Verlauf wiederum zu einer Abnahme der Antikörper-Aufnahme, was durch Spaltung von

Antikörper-Antigen Bindungen durch Chloroquin erklärt wird. Zusätzlich kann es bei der Anwendung von Chloroquin zu anderweitigen zytotoxischen Effekten kommen und entsprechend ist eine vorherige Konzentrationsreihe notwendig.

Ein anderer wichtiger Faktor bei der Betrachtung von Optimierungsmöglichkeiten ist die Sensitivität des Nachweisverfahrens. In der hier vorliegenden Arbeit wurden alle Zellproben nach einer potenziellen Antikörper-Aufnahme lysiert, über ein SDS-Gel aufgetrennt, anschließend mittels Western Blotting auf eine Membran übertragen und über eine immunhistochemische Antikörper-Reaktion sichtbar gemacht (vgl. Kapitel 4.2.7). Dabei hängt die Intensität der Banden von verschiedenen Faktoren ab. Zum Einen ist die Lysatmenge und die darin enthaltene Menge des gewünschten Proteins für den Nachweis relevant. Geht man davon aus, dass nur sehr wenig Antikörper internalisiert wurden, wird die Menge durch das Auftragen von einer definierten Menge Lysat (in der Regel 20 - 40 μg) auf das Gel noch weiter reduziert. Das Probenvolumen ist dabei durch die Taschengröße des Gels limitiert. Für die Detektion in einem Western Blot ist durchschnittlich eine Proteinmenge im unteren Nanogramm-Bereich notwendig. Weiterhin sind die gewählten primären und sekundären Antikörper mit ihren Eigenschaften (Affinität, Verstärkung, etc.) von Bedeutung. Normalerweise ist der primäre Antikörper gegen ein spezifisches Protein gerichtet, während der sekundäre Antikörper gegen den Wirt des primären Antikörpers gerichtet ist. Da zahlreiche sekundäre Antikörper an einen primären Antikörper binden können, und der primäre Antikörper zahlreich an das Zielprotein binden kann, kommt es an dieser Stelle zu einer mehrfachen Signalverstärkung. In den durchgeführten Experimenten sollte der anti-Myc-Antikörper (9E10) aus der Maus aufgenommen werden. Das heißt, die Membran wurde im Anschluss direkt mit einem anti-Maus-Sekundärantikörper inkubiert, der an die aufgetrennten Antikörper (jeweils leichte und schwere Kette) binden konnte. Eine zusätzliche Signalverstärkung findet somit nicht statt. Ein Lösungsansatz hierfür wäre die Verwendung von anderen Antikörpern, die gegen andere Epitope gerichtet sind und eine höhere Affinität aufweisen. Dies sind mögliche Gründe dafür, weshalb eine Aufnahme des anti-myc-Antikörpers in bEnd.3 Zellen nicht nachweisbar gewesen sein könnte.

Eine alternative, sehr viel sensitivere Methode um in Zellen internalisierte Antikörper zu detektieren, wäre die Verwendung von radioaktiv markierten Antikörpern. Dazu werden diese mit Iod-125 markiert und anschließend für eine definierte Zeitdauer auf

die Zielzellen gegeben. In verschiedenen Arbeitsschritten kann die Menge an oberflächlich-gebundenen, an internalisierten und im Medium verbliebenen Antikörpern bestimmt werden. Dabei wird die Konzentration mittels eines Gamma-Zählers, welcher die entsendete Strahlung misst, bestimmt. Durch die Genauigkeit dieses Verfahrens ergibt sich zusätzlich die Möglichkeit die Zellen in Transwells zu kultivieren und Transzytose-Assays durchzuführen. Dabei werden die markierten Antikörper entweder in das apikale oder in das basolaterale Kompartiment gegeben und nach einer festgelegten Zeit im jeweils anderen Kompartiment die Menge an transportierten Antikörpern bestimmt. Als zusätzlicher Marker für die parazelluläre Diffusion eignet sich hierbei C-14 Inulin.

Weiterhin gilt es, neben den methodischen Überlegungen, die Frage zu beantworten, ob die potentiell aufgenommenen Antikörper sich von dem Myc-Tag dissoziieren und in der Zelle verbleiben oder mittels Transzytose auf der anderen Seite wieder entlassen werden. Betrachtet man dazu die klassische LRP1 vermittelte Transzytose in Endothelzellen, unterscheidet sich diese deutlich von der Transzytose in Astrozyten. Tian et al. zeigten, dass in Neuroendothelzellen mit Angiopep-2 markierte, pH-sensitive Polymerosome mit geladenen IgG Antikörpern während des Transports intakt bleiben und es zu keiner Azidifikation kommt. In Astrozyten wiederum findet eine lysosomale Degradation statt und die geladenen Antikörper werden freigesetzt [96]. Somit eignet sich LRP1 sowohl für den Transport über die BHS als auch für den anschließenden Transport zur Zielzelle und Freisetzung der Ladung ebendort. Jedoch gilt zusätzlich zu beachten, dass die Dissoziation auch von der Affinität des verwendeten Antikörpers (9E10) gegenüber des Myc-Tags abhängig ist.

Yu et al. untersuchten in dem Zusammenhang, welchen Einfluss die Affinität eines gegen den Transferrin-Rezeptor der Maus gerichteten Antikörpers auf die Transzytose in das Hirnparenchym hat. Entgegen der Vermutung, dass eine niedrige Affinität mit niedriger Konzentration zu einer geringeren Aufnahme führt, konnten sie in einem Mausmodell zeigen, dass ein niedrig-affiner anti-TfR Antikörper im Vergleich zu einer IgG Kontrolle eine fünfmal so hohe Konzentration im Hirnparenchym erreichte [97]. Der hoch-affine Antikörper erzielte eine vergleichbar hohe Aufnahme in die Endothelzellen, wurde jedoch in einer niedrigeren Konzentration im Hirnparenchym nachgewiesen. Durch die niedrige Affinität kommt es vermutlich zu einer erhöhten Dissoziation und einer Umgehung des Abbaus im Lysosom [40].

Dennoch ist eine höhere Dosierung des niedrig-affinen Antikörpers notwendig, um eine therapeutisch relevante Konzentration zu erreichen, da es aufgrund der verminderten Affinität auch vermehrt zu unspezifischen off-target Bindungen kommt.

Das Anhängen der Sequenz des Myc-Tags wird meistens dafür verwendet die Expression von rekombinanten Proteinen zu detektieren. Die Lokalisation am N- oder C-Terminus des Proteins ist gut geeignet, während das direkte Anhängen hinter ein Signalpeptid eines Sekretionsproteins mit der Sekretion interferieren kann. Zum Nachweis gibt es verschiedene monoklonale Antikörper mit unterschiedlichen Eigenschaften. Der für die dargelegten Experimente genutzte monoklonale anti-Myc-Antikörper 9E10 bindet monovalent und mit hoher Affinität an den c-Myc-Tag [7]. Schüchner et al. zeigten, dass 9E10 eine hohe kontext-abhängige Detektionsvariabilität aufweist. Die Erkennung und Bindung ist unter anderem von der Position des Myc-Tags und den Nachbarsequenzen abhängig [98]. Eine fehlende Detektion des Rezeptortags lässt sich in den vorliegenden Versuchen als Grund ausschließen, da in den CHO K1 Zellen eine Bindung von Antikörper an Rezeptor und die anschließende Aufnahme möglich war. In den bEnd.3 Zellen wurde derselbe Rezeptor verwendet und die Position und Nachbarsequenzen waren identisch. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass es in den bEnd.3 Zellen zu einer Modifikation des Rezeptors auf seinem Weg zur Zelloberfläche gekommen ist, die das Erkennungsverhalten des Antikörpers erschwerte bzw. verhinderte. Dagegen spricht jedoch, dass auch in den bEnd.3 Zellen die Expression des myc-LRPCT Rezeptors mit dem Antikörper 9E10 im Western Blot nachgewiesen wurde, jedoch in einer weitaus höheren Konzentration. Eine Möglichkeit, den Antikörper 9E10 als Problemquelle auszuschließen, besteht also erneut darin, auch andere anti-Myc-Antikörper zu testen, wie zum Beispiel 4A6 und 9B11.

Um den myc-LRPCT Rezeptor auch in Zukunft für weitere *in vivo* Experimente spezifisch nur in Neuroendothelzellen zu exprimieren, ist ein weiterer Schritt notwendig. In 2016 hat die Arbeitsgruppe um Jakob Körbelin durch Screening einer zufälligen AAV Oberflächen Peptid-Bibliothek einen neurovaskulären endothelzellspezifischen viralen Vektor entwickelt [90]. Dank einer Kollaboration ergab sich die Möglichkeit ebenfalls mit diesem Vektor zu arbeiten. Der Vektor basiert auf einem adeno-assoziierten Virus, welches bekannt ist für die effiziente Transduktion von neuronalen Zellen und ein sicheres Risikoprofil. Durch Klonierung

des Rezeptors in diesen Vektor kann auf diese Weise die Expression in Endothelzellen der BHS stattfinden (Abbildung 9).

Letztendlich gibt es bisher noch kein ausreichendes Verfahren, Medikamente in das ZNS zu transportieren und die Notwendigkeit der Investigation anderer Optionen ist nach wie vor gegeben.

Auch wenn bisher nicht alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit positiv sind, bietet der Ansatz, mit dem artifiziellen myc-LRPCT Rezeptor zu arbeiten, Vorteile. Dazu gehört jedenfalls die Tatsache, dass Antikörper durch ihre Spezifität und Affinität zu sehr geringen unspezifischen off-target Effekten führen. Außerdem würde ein spezifischer Rezeptor, der durch einen Virus nur in Neuroendothelzellen exprimiert wird, zu keiner Konkurrenz von natürlichen Liganden um die Bindung führen.

Deshalb ist es weiterhin sinnvoll, die Aufnahme von anti-Myc-Antikörpern in die bEnd.3 Zellen zu untersuchen und dabei die beschriebenen Änderungen, im Wesentlichen Chloroquin als lysosomaler Inhibitor, ein anderes Antikörper-Epitop, sowie der Nachweis mittels radioaktiv markierter Antikörper, vorzunehmen. Zusätzlich sind Transzytose-Assays notwendig, um auch das Transzytose-Verhalten näher zu untersuchen.

Nach Abschluss meiner experimentellen Arbeiten wurde das Thema des LRP1-vermittelten Transports über die Blut Hirn Schranke in der AG Pietrzik weiter verfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass ein verkürztes LRP1-Konstrukt in der Lage ist Nanopartikel über eine *in vitro* BHS Modell zu transportieren [99].

7 Zusammenfassung

Die Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen ist und bleibt aufgrund der BHS eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin. Auch wenn es inzwischen viele verschiedene Ansätze gibt, eben diese zu überwinden, ist bisher kein Mechanismus als Goldstandard etabliert.

Ein Ansatz, der dabei seit vielen Jahren verfolgt wird, ist die Nutzung bereits vorhandener Transportsysteme an der BHS. In diesem Zusammenhang ist den letzten Jahren intensiv der *low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)* Rezeptor untersucht worden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine artifiziell modifizierte Variante von LRP1, der myc-LRPCT Rezeptor hinsichtlich seiner Fähigkeit gegen den Myc-Tag gerichtete Antikörper zu binden und aufzunehmen getestet. Dazu wurde mittels Klonierung der Myc-Tag an die c-terminalen 1113 Basenpaare von LRP1 gekoppelt und das so entstandene Konstrukt in verschiedenen Zelllinien getestet.

Die vorgestellten Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der artifizielle myc-LRPCT-Rezeptor sowohl in CHO K1, HEK 293T als auch bEnd.3 Zellen exprimiert werden kann und eine Detektion mittels des anti-Myc-Antikörpers (9E10) möglich ist. Die Aufnahme des anti-Myc-Antikörpers in CHO K1 Zellen zeigte sich erfolgreich, während in bEnd.3 Zellen keine Aufnahme von der apikalen oder basolateralen Zellseite nachweisbar war. Im Weiteren wurde mittels lysosomaler Inhibitoren und verschiedenen Modifikationen versucht, eine Antikörper-Aufnahme in die bEnd.3 Zellen nachzuweisen. Im Ausschluss wurde ebenfalls die Expression des Rezeptors sowohl an der apikalen als auch an der basolateralen Zelloberfläche untersucht. Die möglichen Gründe für die fehlende Aufnahme können sowohl methodischer als auch zellspezifischer Natur sein und ließen sich nicht abschließend klären.

Die Frage, ob myc-LRPCT exprimierende bEnd.3 Zellen tatsächlich anti-Myc-Antikörper aufnehmen oder sogar transportieren können, bietet daher Raum für weiterführende Forschungsarbeiten.

8 Referenzen

1. Masserini M. Nanoparticles for brain drug delivery. *ISRN Biochemistry*. 2013;2013:238428. doi:10.1155/2013/238428.
2. World Health Statistics 2021: Monitoring Health for the SDGs, Sustainable Development Goals. 1st ed. Geneva: World Health Organization; 2021.
3. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med*. 2013;19:1584–96. doi:10.1038/nm.3407.
4. 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;34:2637–51. doi:10.1007/s11095-017-2267-3.
5. 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;126:123–36. doi:10.1172/JCI81108.
6. Swartling FJ. Myc proteins in brain tumor development and maintenance. *Ups J Med Sci*. 2012;117:122–31. doi:10.3109/03009734.2012.658975.
7. Zhao X, Li G, Liang S. Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2013;2013:581093. doi:10.1155/2013/581093.
8. Blanchette M, Daneman R. Formation and maintenance of the BBB. *Mech Dev*. 2015;138 Pt 1:8–16. doi:10.1016/j.mod.2015.07.007.
9. Béduneau A, Saulnier P, Benoit J-P. Active targeting of brain tumors using nanocarriers. *Biomaterials*. 2007;28:4947–67. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.06.011.
10. Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, Friedman A. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;38:2–6. doi:10.1016/j.semcdb.2015.01.002.
11. Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J*. 2015;282:4067–79. doi:10.1111/febs.13412.
12. Begley DJ. The Blood-brain Barrier: Principles for Targeting Peptides and Drugs to the Central Nervous System. *J Pharm Pharmacol*. 1996;48:136–46. doi:10.1111/j.2042-7158.1996.tb07112.x.
13. Nag S, Begley D. Blood-brain barrier, exchange of metabolites and gases. *Pathology and Genetics. Cerebrovascular Diseases*. 2005:22–9.
14. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7:a020412. doi:10.1101/cshperspect.a020412.
15. Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol*. 2012;72:648–72. doi:10.1002/ana.23648.
16. Chow BW, Gu C. The molecular constituents of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci*. 2015;38:598–608. doi:10.1016/j.tins.2015.08.003.
17. Lécuyer M-A, Saint-Laurent O, Bourbonnière L, Larouche S, Larochelle C, Michel L, et al. Dual role of ALCAM in neuroinflammation and blood-brain barrier homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:E524-E533. doi:10.1073/pnas.1614336114.
18. Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary

- endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol.* 1977;1:409–17. doi:10.1002/ana.410010502.
19. Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature.* 2006;443:700–4. doi:10.1038/nature05193.
 20. Abbott NJ, Rönnebeck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7:41–53. doi:10.1038/nrn1824.
 21. Methia N, André P, Hafezi-Moghadam A, Economopoulos M, Thomas KL, Wagner DD. ApoE Deficiency Compromises the Blood Brain Barrier Especially After Injury. *Mol Med.* 2001;7:810–5. doi:10.1007/BF03401973.
 22. Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol.* 2009;31:497–511. doi:10.1007/s00281-009-0177-0.
 23. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010;37:13–25. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030.
 24. Petty MA, Lo EH. Junctional complexes of the blood–brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol.* 2002;68:311–23. doi:10.1016/S0301-0082(02)00128-4.
 25. Steinberg MS, McNutt PM. Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:554–60. doi:10.1016/s0955-0674(99)00027-7.
 26. Luissint A-C, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud P-O. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS.* 2012;9:23. doi:10.1186/2045-8118-9-23.
 27. Pardridge WM. Drug targeting to the brain. *Pharm Res.* 2007;24:1733–44. doi:10.1007/s11095-007-9324-2.
 28. Erdő F, Bors LA, Farkas D, Bajza Á, Gizurarson S. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain Research Bulletin.* 2018;143:155–70. doi:10.1016/j.brainresbull.2018.10.009.
 29. Slavic I, Cohen-Pfeffer JL, Gururangan S, Krauser J, Lim DA, Maldaun M, et al. Best practices for the use of intracerebroventricular drug delivery devices. *Mol Genet Metab.* 2018;124:184–8. doi:10.1016/j.ymgme.2018.05.003.
 30. Dong X. Current Strategies for Brain Drug Delivery. *Theranostics.* 2018;8:1481–93. doi:10.7150/thno.21254.
 31. Pardridge WM, Boado RJ, Farrell CR. Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *J Biol Chem.* 1990;265:18035–40.
 32. Pardridge WM, Oldendorf WH. Kinetic analysis of blood-brain barrier transport of amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1975;401:128–36. doi:10.1016/0005-2736(75)90347-8.
 33. Stoll J, Wadhvani KC, Smith QR. Identification of the cationic amino acid transporter (System y⁺) of the rat blood-brain barrier. *J Neurochem.* 1993;60:1956–9. doi:10.1111/j.1471-4159.1993.tb13428.x.
 34. Singh N, Ecker GF. Insights into the Structure, Function, and Ligand Discovery of the Large Neutral Amino Acid Transporter 1, LAT1. *Int J Mol Sci* 2018. doi:10.3390/ijms19051278.

35. Witt KA, Gillespie TJ, Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Peptide drug modifications to enhance bioavailability and blood-brain barrier permeability. *Peptides*. 2001;22:2329–43. doi:10.1016/s0196-9781(01)00537-x.
36. Egleton RD, Davis TP. Bioavailability and Transport of Peptides and Peptide Drugs into the Brain. *Peptides*. 1997;18:1431–9. doi:10.1016/s0196-9781(97)00242-8.
37. Hervé F, Ghinea N, Scherrmann J-M. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J*. 2008;10:455–72. doi:10.1208/s12248-008-9055-2.
38. Tashima T. Smart Strategies for Therapeutic Agent Delivery into Brain across the Blood-Brain Barrier Using Receptor-Mediated Transcytosis. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2020;68:316–25. doi:10.1248/cpb.c19-00854.
39. Pardridge WM. Delivery of Biologics Across the Blood-Brain Barrier with Molecular Trojan Horse Technology. *BioDrugs*. 2017;31:503–19. doi:10.1007/s40259-017-0248-z.
40. Johnsen KB, Burkhardt A, Thomsen LB, Andresen TL, Moos T. Targeting the transferrin receptor for brain drug delivery. *Prog Neurobiol*. 2019;181:101665. doi:10.1016/j.pneurobio.2019.101665.
41. Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2:347–60. doi:10.1038/nrd1088.
42. Murthy SK. Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. *Int J Nanomedicine*. 2007;2:129–41.
43. Borchard G, Audus KL, Shi F, Kreuter J. Uptake of surfactant-coated poly(methyl methacrylate)-nanoparticles by bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *Int J Pharm*. 1994;110:29–35. doi:10.1016/0378-5173(94)90372-7.
44. Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;47:65–81. doi:10.1016/S0169-409X(00)00122-8.
45. Peracchia MT, Harnisch S, Pinto-Alphandary H, Gulik A, Dedieu JC, Desmaële D, et al. Visualization of in vitro protein-rejecting properties of PEGylated stealth® polycyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials*. 1999;20:1269–75. doi:10.1016/S0142-9612(99)00021-6.
46. Garcia-Garcia E, Andrieux K, Gil S, Couvreur P. Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain? *Int J Pharm*. 2005;298:274–92. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.03.031.
47. Broadwell RD, Salzman M, Kaplan RS. Morphologic effect of dimethyl sulfoxide on the blood-brain barrier. *Science*. 1982;217:164–6. doi:10.1126/science.7089551.
48. Ziylan Y, Korkmaz G, Bernard G, Lefauconnier JM. Effect of dimethyl sulfoxide on blood-to-brain transfer of α -aminoisobutyric acid: Examination of regional blood-brain barrier function. *Neuroscience Letters*. 1988;89:74–9. doi:10.1016/0304-3940(88)90483-1.
49. Neuwelt EA, Barnett P, Barranger J, McCormick C, Pagel M, Frenkel E. Inability of dimethyl sulfoxide and 5-fluorouracil to open the blood-brain barrier. *Neurosurgery*. 1983;12:29–34. doi:10.1227/00006123-198301000-00006.
50. Erdlenbruch B, Schinkhof C, Kugler W, Heinemann DEH, Herms J, Eibl H, Lakomek M. Intracarotid administration of short-chain alkylglycerols for increased delivery of methotrexate to the rat brain. *Br J Pharmacol*. 2003;139:685–94. doi:10.1038/sj.bjp.0705302.

51. Ebinger M, Uhr M. ABC drug transporter at the blood-brain barrier: effects on drug metabolism and drug response. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2006;256:294–8. doi:10.1007/s00406-006-0664-4.
52. Lee Y-J, Kusuhara H, Jonker JW, Schinkel AH, Sugiyama Y. Investigation of efflux transport of dehydroepiandrosterone sulfate and mitoxantrone at the mouse blood-brain barrier: a minor role of breast cancer resistance protein. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312:44–52. doi:10.1124/jpet.104.073320.
53. Dewanjee S, Dua TK, Bhattacharjee N, Das A, Gangopadhyay M, Khanra R, et al. Natural Products as Alternative Choices for P-Glycoprotein (P-gp) Inhibition. *Molecules* 2017. doi:10.3390/molecules22060871.
54. Zhou S-F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica*. 2008;38:802–32. doi:10.1080/00498250701867889.
55. Bansal T, Jaggi M, Khar RK, Talegaonkar S. Emerging significance of flavonoids as P-glycoprotein inhibitors in cancer chemotherapy. *J Pharm Pharm Sci*. 2009;12:46–78. doi:10.18433/j3rc77.
56. DAZ.online. *Wirkort Gehirn*. 2012. <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/daz-az/2012/daz-8-2012/wirkort-gehirn>. Accessed 21 Oct 2024.
57. Patel MM, Goyal BR, Bhadada SV, Bhatt JS, Amin AF. Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery. *CNS Drugs*. 2009;23:35–58. doi:10.2165/0023210-200923010-00003.
58. Gabathuler R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiol Dis*. 2010;37:48–57. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.028.
59. Inamura T, Black KL. Bradykinin selectively opens blood-tumor barrier in experimental brain tumors. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994;14:862–70. doi:10.1038/jcbfm.1994.108.
60. Borlongan CV, Emerich DF. Facilitation of drug entry into the CNS via transient permeation of blood brain barrier: laboratory and preliminary clinical evidence from bradykinin receptor agonist, Cereport. *Brain Research Bulletin*. 2003;60:297–306. doi:10.1016/S0361-9230(03)00043-1.
61. Patel MM, Patel BM. Crossing the Blood-Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain. *CNS Drugs*. 2017;31:109–33. doi:10.1007/s40263-016-0405-9.
62. Doolittle ND, Petrillo A, Bell S, Cummings P, Eriksen S. Blood-brain barrier disruption for the treatment of malignant brain tumors: The National Program. *J Neurosci Nurs*. 1998;30:81–90. doi:10.1097/01376517-199804000-00002.
63. Beccaria K, Canney M, Bouchoux G, Puget S, Grill J, Carpentier A. Blood-brain barrier disruption with low-intensity pulsed ultrasound for the treatment of pediatric brain tumors: a review and perspectives. *Neurosurg Focus*. 2020;48:E10. doi:10.3171/2019.10.FOCUS19726.
64. Sheikov N, McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz F, Hynynen K. Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles. *Ultrasound Med Biol*. 2004;30:979–89. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2004.04.010.
65. Sheikov N, McDannold N, Sharma S, Hynynen K. Effect of focused ultrasound applied with an ultrasound contrast agent on the tight junctional integrity of the

- brain microvascular endothelium. *Ultrasound Med Biol.* 2008;34:1093–104. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2007.12.015.
66. Aryal M, Fischer K, Gentile C, Gitto S, Zhang Y-Z, McDannold N. Effects on P-Glycoprotein Expression after Blood-Brain Barrier Disruption Using Focused Ultrasound and Microbubbles. *PLoS One.* 2017;12:e0166061. doi:10.1371/journal.pone.0166061.
67. Chen H, Konofagou EE. The size of blood-brain barrier opening induced by focused ultrasound is dictated by the acoustic pressure. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014;34:1197–204. doi:10.1038/jcbfm.2014.71.
68. McDannold N, Vykhodtseva N, Hynynen K. Effects of acoustic parameters and ultrasound contrast agent dose on focused-ultrasound induced blood-brain barrier disruption. *Ultrasound Med Biol.* 2008;34:930–7. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2007.11.009.
69. Choi JJ, Feshitan JA, Baseri B, Wang S, Tung Y-S, Borden MA, Konofagou EE. Microbubble-size dependence of focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening in mice in vivo. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2010;57:145–54. doi:10.1109/TBME.2009.2034533.
70. Spencer BJ, Verma IM. Targeted delivery of proteins across the blood–brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007;104:7594. doi:10.1073/pnas.0702170104.
71. Reekmans SM, Pflanzner T, Gordts PLSM, Isbert S, Zimmermann P, Annaert W, et al. Inactivation of the proximal NPXY motif impairs early steps in LRP1 biosynthesis. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67:135–45. doi:10.1007/s00018-009-0171-7.
72. Mao H, Xie L, Pi X. Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Signaling in Angiogenesis. *Front Cardiovasc Med.* 2017;4:34. doi:10.3389/fcvm.2017.00034.
73. Li Y, Lu W, Marzolo MP. Differential functions of members of the low density lipoprotein receptor family suggested by their distinct endocytosis rates. *J Biol Chem.* 2001;276:18000–6. doi:10.1074/jbc.M101589200.
74. Demeule M, Régina A, Ché C, Poirier J, Nguyen T, Gabathuler R, et al. Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324:1064–72. doi:10.1124/jpet.107.131318.
75. Demeule M, Currie J-C, Bertrand Y, Ché C, Nguyen T, Régina A, et al. Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2. *J Neurochem.* 2008;106:1534–44. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05492.x.
76. Ché C, Yang G, Thiot C, Lacoste M-C, Currie J-C, Demeule M, et al. New Angiopep-modified doxorubicin (ANG1007) and etoposide (ANG1009) chemotherapeutics with increased brain penetration. *J Med Chem.* 2010;53:2814–24. doi:10.1021/jm9016637.
77. Régina A, Demeule M, Ché C, Lavallée I, Poirier J, Gabathuler R, et al. Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2. *Br J Pharmacol.* 2008;155:185–97. doi:10.1038/bjp.2008.260.
78. Bertrand Y, Currie J-C, Poirier J, Demeule M, Abulrob A, Fatehi D, et al. Influence of glioma tumour microenvironment on the transport of ANG1005 via low-density lipoprotein receptor-related protein 1. *Br J Cancer.* 2011;105:1697–707. doi:10.1038/bjc.2011.427.

79. Kim JA, Casalini T, Brambilla D, Leroux J-C. Presumed LRP1-targeting transport peptide delivers β -secretase inhibitor to neurons in vitro with limited efficiency. *Sci Rep*. 2016;6:34297. doi:10.1038/srep34297.
80. Stalmans S, Bracke N, Wynendaele E, Gevaert B, Peremans K, Burvenich C, et al. Cell-Penetrating Peptides Selectively Cross the Blood-Brain Barrier In Vivo. *PLoS One*. 2015;10:e0139652. doi:10.1371/journal.pone.0139652.
81. Sakamoto K, Shinohara T, Adachi Y, Asami T, Ohtaki T. A novel LRP1-binding peptide L57 that crosses the blood brain barrier. *Biochem Biophys Rep*. 2017;12:135–9. doi:10.1016/j.bbrep.2017.07.003.
82. Rodrigues JP, Prajapati N, DeCoster MA, Poh S, Murray TA. Efficient LRP1-Mediated Uptake and Low Cytotoxicity of Peptide L57 In Vitro Shows Its Promise as CNS Drug Delivery Vector. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;110:824–32. doi:10.1016/j.xphs.2020.09.019.
83. Sakamoto K. Generation of KS-487 as a novel LRP1-binding cyclic peptide with higher affinity, higher stability and BBB permeability. *Biochem Biophys Rep*. 2022;32:101367. doi:10.1016/j.bbrep.2022.101367.
84. Zensi A, Begley D, Pontikis C, Legros C, Mihoreanu L, Wagner S, et al. Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. *J Control Release*. 2009;137:78–86. doi:10.1016/j.jconrel.2009.03.002.
85. Neves AR, Queiroz JF, Lima SAC, Reis S. Apo E-Functionalization of Solid Lipid Nanoparticles Enhances Brain Drug Delivery: Uptake Mechanism and Transport Pathways. *Bioconjug Chem*. 2017;28:995–1004. doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00705.
86. Meister S, Zlatev I, Stab J, Docter D, Baches S, Stauber RH, et al. Nanoparticulate flurbiprofen reduces amyloid- β 42 generation in an in vitro blood-brain barrier model. *Alzheimers Res Ther*. 2013;5:51. doi:10.1186/alzrt225.
87. zur Hausen H. Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *J Virol*. 1967;1:1174–85. doi:10.1128/jvi.1.6.1174-1185.1967.
88. Montesano R, Pepper MS, Möhle-Steinlein U, Risau W, Wagner EF, Orci L. Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene. *Cell*. 1990;62:435–45. doi:10.1016/0092-8674(90)90009-4.
89. Pietrzik CU, Busse T, Merriam DE, Weggen S, Koo EH. The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing. *EMBO J*. 2002;21:5691–700. doi:10.1093/emboj/cdf568.
90. Körbelin J, Dogbevia G, Michelfelder S, Ridder DA, Hunger A, Wenzel J, et al. A brain microvasculature endothelial cell-specific viral vector with the potential to treat neurovascular and neurological diseases. *EMBO Mol Med*. 2016;8:609–25. doi:10.15252/emmm.201506078.
91. Tanaka RD, Li AC, Fogelman AM, Edwards PA. Inhibition of lysosomal protein degradation inhibits the basal degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Lipid Res*. 1986;27:261–73.
92. Uphoff CC, Drexler HG. Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2014;106:28.4.1-14. doi:10.1002/0471142727.mb2804s106.

93. Zhao Z, Sagare AP, Ma Q, Halliday MR, Kong P, Kisler K, et al. Central role for PICALM in amyloid- β blood-brain barrier transcytosis and clearance. *Nat Neurosci.* 2015;18:978–87. doi:10.1038/nn.4025.
94. Baradaran Eftekhari R, Maghsoudnia N, Dorkoosh FA. Chloroquine: a brand-new scenario for an old drug. *Expert Opinion on Drug Delivery.* 2020;17:275–7. doi:10.1080/17425247.2020.1716729.
95. Zimmermann S. Funktionelle Analyse des Transferrin Rezeptors zum Transport über die Blut-Hirn-Schranke. 2021.
96. Tian X, Nyberg S, S Sharp P, Madsen J, Daneshpour N, Armes SP, et al. LRP-1-mediated intracellular antibody delivery to the Central Nervous System. *Sci Rep.* 2015;5:11990. doi:10.1038/srep11990.
97. Yu YJ, Zhang Y, Kenrick M, Hoyte K, Luk W, Lu Y, et al. Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target. *Science Translational Medicine.* 2011;3:84ra44. doi:10.1126/scitranslmed.3002230.
98. Schüchner S, Behm C, Mudrak I, Ogris E. The Myc tag monoclonal antibody 9E10 displays highly variable epitope recognition dependent on neighboring sequence context. *Sci. Signal.* 2020;13:eaax9730. doi:10.1126/scisignal.aax9730.
99. Fritzen L, Wienken K, Wagner L, Kurtyka M, Vogel K, Körbelin J, et al. Truncated mini LRP1 transports cargo from luminal to basolateral side across the blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS.* 2024;21:74. doi:10.1186/s12987-024-00573-1.

9 Anhang

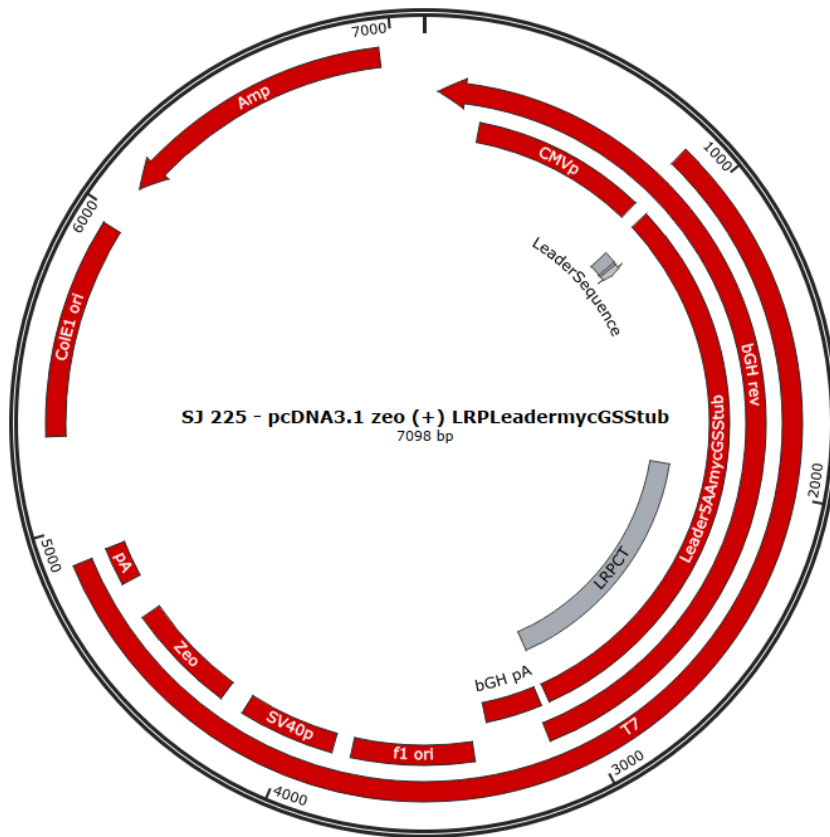


Abbildung 24: pcDNA Vektorkarte

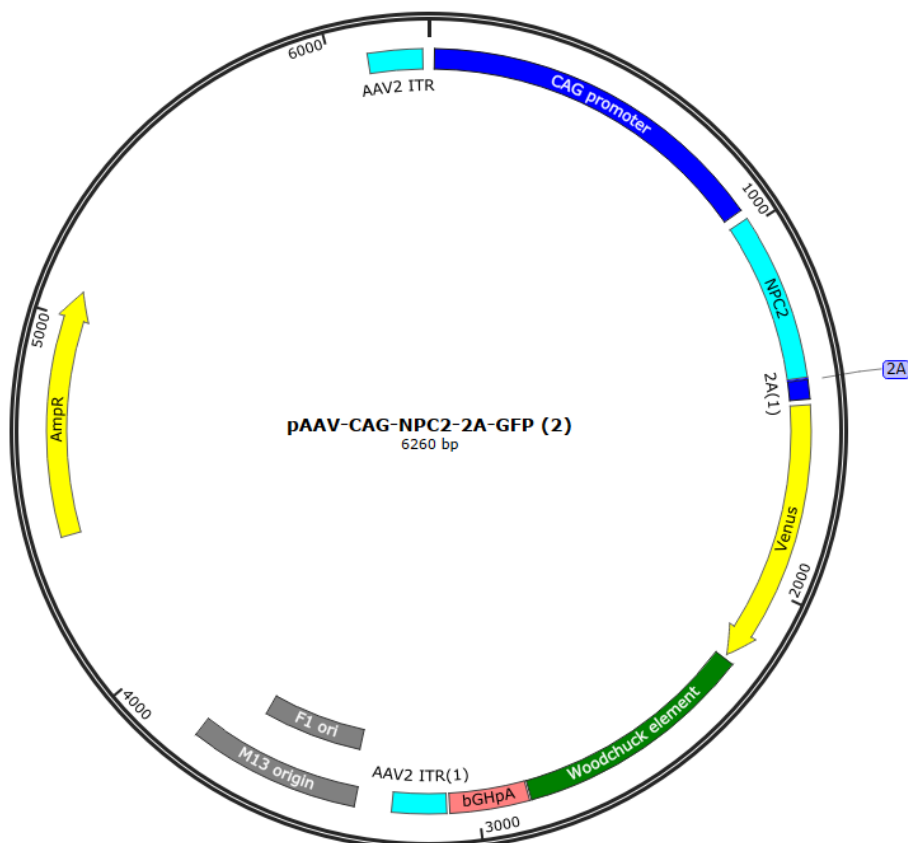


Abbildung 23: pAAV Vektorkarte

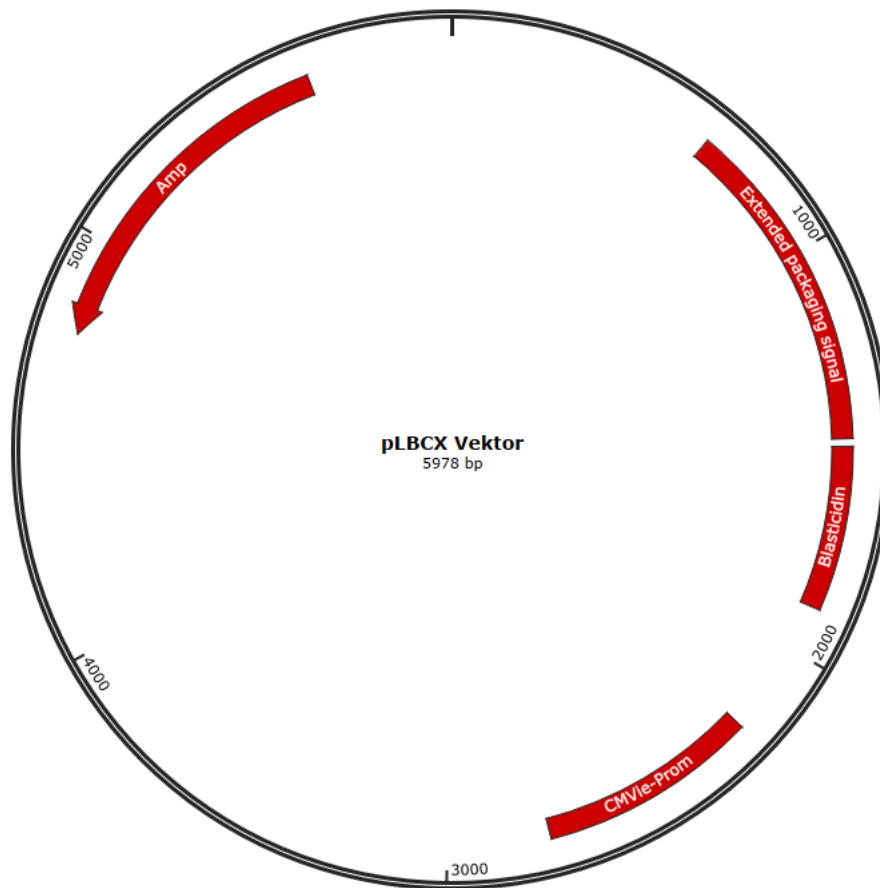


Abbildung 25: pLBCX Vektorkarte