

Aus dem Institut für Pathobiochemie
in der Arbeitsgruppe „Molekulare Neurodegeneration“

**Die verkürzte Form des LRP1-Rezeptors und dessen Auswirkung auf
unterschiedliche Liganden und die Blut-Hirn-Schranke**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Jana Wachtel

aus Bonn

Mainz, 2023

Tag der Promotion: 18.04.2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	IX
1. Einleitung und Zielsetzung der Promotion	- 10 -
2. Literaturdiskussion	- 12 -
2.1. Blut-Hirn-Schranke.....	- 12 -
2.2. Die Blut-Hirn-Schranke und die Auswirkung auf Neurodegenerationen.....	- 12 -
2.3. Der LRP1-Rezeptor	- 13 -
2.4. α -2-Makroglobuline	- 15 -
2.5. Tissue Plasminogen Activator.....	- 15 -
2.6. Die Verbindung zwischen LRP1 und den Liganden α -2-Makroglobulin und Tissue Plasminogen Aktivator	- 16 -
3. Material	- 17 -
3.1. Zelllinie	- 17 -
3.2. Bakterienbestand.....	- 17 -
3.3. Plasmidvektor	- 17 -
3.4. Primer.....	- 17 -
3.5. Chemikalien und Reagenzien	- 17 -
3.6. Kits	- 19 -
3.7. Lösungen und Medien für die Zellkultur	- 20 -
3.8. Lösungen und Medien für die Bakterienkultur	- 20 -
3.9. Lösungen und Puffer für DNA-Gelelektrophorese	- 21 -
3.10. Lösung und Puffer für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese und den Western-Blot.....	- 21 -
3.11. Lösungen und Puffer für die Proteinbiochemie.....	- 23 -
3.12. Antikörper	- 23 -
3.13. Primärer Antikörper.....	- 23 -
3.14. Sekundärer Antikörper	- 24 -
3.15. Software	- 24 -
3.16. Geräte und Laborhilfsmittel	- 25 -
3.17. Verbrauchsmaterialien	- 26 -
4. Methoden	- 27 -
4.1. Zellbiologische Methoden	- 27 -
4.1.1. Immortalisierte eukaryotische Zelllinien	- 27 -
4.1.1.1. Kultur von eukaryotischen Zellen.....	- 27 -
4.1.1.2. Allgemeiner Umgang mit eukaryotischen Zellen	- 27 -
4.1.1.3. Passagieren von adhärenenten Zellen	- 27 -
4.1.1.4. Kryokonservierung von Zellen	- 28 -
4.1.1.5. Revitalisierung von kryokonservierten Zellen.....	- 28 -
4.1.1.6. Bestimmung der Zellmenge und das Aussäen von Zellen	- 28 -
4.1.1.7. Stimulation von Zellen mit Chloroquin.....	- 29 -

4.1.1.8. Transfektionsmethoden	- 29 -
4.1.1.9. Transiente Transfektion mit Polyethylenimin (PEI).....	- 29 -
4.1.2. Stabile Transfektion von Zelllinien mit retroviraler Infektion	- 29 -
4.1.2.1. Grundlage der Methodik	- 29 -
4.1.2.2. Die Transfektion von HEK-GP2-Zellen zur Virusherstellung	- 30 -
4.1.2.3. Blasticidin-Selektion infizierter Zellen.....	- 31 -
4.1.3. Endozytose bei transfizierten Zellen	- 31 -
4.1.3.1. tPA	- 31 -
4.1.3.2. α 2M	- 31 -
4.2. Proteinbiochemische Methoden	- 32 -
4.2.1. Zellyse.....	- 32 -
4.2.2. Proteinkonzentrationsbestimmung	- 32 -
4.2.3. Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	- 33 -
4.2.4. Gießen der Gele.....	- 33 -
4.2.5. Vorbereitung der Proben, Beladen des Gels und Abschluss des Vorgangs.....	- 33 -
4.2.6. Western-Blot	- 34 -
4.3. Molekularbiologische Methoden.....	- 35 -
4.3.1. Allgemeine Methoden zur Arbeit mit DNA	- 35 -
4.3.2. Primer-Design	- 35 -
4.3.3. Amplifizierung mit Polymerasekettenreaktion	- 35 -
4.3.4. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	- 36 -
4.3.5. Auftrennung von DNA im Agarosegel	- 37 -
4.3.6. Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel	- 38 -
4.3.7. Ligation	- 38 -
4.4. Mikrobiologische Methoden	- 38 -
4.4.1. Bakterientransformation	- 38 -
4.4.2. Mini-Präparation von Plasmid-DNA	- 39 -
4.4.3. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	- 39 -
5. Ergebnisse	- 40 -
5.1. Transiente Transfektion von pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 in CHO 13-5-1-Zellen und die Endozytose von tPA	- 40 -
5.2. Aktivierung und Endozytose von α 2M	- 42 -
5.3. Amplifikation von pcDNA3.1(+) LRP1_CR10	- 46 -
5.4. Umklonierung von pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 mit dem Vektor pLBCX.....	- 48 -
5.5. Blasticidin-Selektion.....	- 50 -
5.6. Stabile Transfektion	- 50 -
6. Diskussion.....	- 52 -
7. Zusammenfassung.....	- 55 -
Literaturverzeichnis	- 56 -
Danksagung	- 10 -

Abkürzungsverzeichnis

α_2M	α -2-Makroglobulin
A β	Amyloid β -Protein
AD	Alzheimer's disease
Ak	Antikörper
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHO	Chinese Hamster Ovary
cm	Zentimeter
Cu	Kupfer
dest.	Destilliert
d.h.	Das heißt
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
Dom	Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermale Wachstumsfaktoren
env	Envelop-gen
fwd	Forward
g	Mittlere Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
gag	Group antigen
gr	Gramm
HCl	Chlorwasserstoff
HEK	Human Embryonic Kidney
H ₂ O _{dd}	Steriles destilliertes Wasser
kb	Kilobase

KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny broth
LDL	Low density lipoprotein
LDL-R	Low density lipoprotein Rezeptor
LRP1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
MEM	Minimum Essential Medium
ml	Milliliter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NPxY	Asparagin-Prolin-x-Tyrosin-Motiv
NP-40	Nonoxinol P-40
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	Millimolar
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimine
PI	Proteinasinhibitor
pol	Polymerase-Gen
Rb	Rabbit
rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
sek	Sekunde
sek.	Sekundäre
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
Taq	Thermophilus aquaticus
TBS	Tris bufferd saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin

Trfct.	Transfected
tPA	Tissue-Plasminogen Activator
u.a.	Unter anderem
UV	Ultraviolett
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
V	Volt
z.B.	Zum Beispiel
Zn^{2+}	Zink(II)-Kationen
ZnCl_2	Zinkchlorid

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Aufbau und Struktur von LRP
Abbildung 2	Konformationsänderung von α 2M
Abbildung 3	Transiente Transfektion von pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 in CHO 13-5-1-Zellen und Endozytose von tPA
Abbildung 4	Intensitätsverhältnis von der Endozytose bei CHO K1-Zellen und bei mit pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 transfizierten CHO 13-5-1-Zellen
Abbildung 5	Endozytoseintensität von CHO K1-Zellen mit tPA und transfizierte CHO 13-5-1-Zellen mit tPA im Verhältnis zur Standardabweichung
Abbildung 6	Endozytoseexperiment mit α 2M und CHO K1-Zellen.
Abbildung 7	Endozytoseversuch mit α 2M und CHO K1-Zellen und CHO 13-5-1-Zellen.
Abbildung 8	Kontrolle von Endozytoseexperiment mit α 2M und mit pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 transfizierte CHO 13-5-1-Zellen
Abbildung 9	Das Plasmid pcDNA3.1 (+) LRP1_CR10
Abbildung 10	Der Verdau von pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 mit XbaI und KpnI.
Abbildung 11	Das ligierte Plasmid pLBCX + pcDNA(+) LRP1_CR10
Abbildung 12	Nach der Ligation wurde 500 ng der DNA auf einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt
Abbildung 13	Blasticidin-Selektion von CHO 13-5-1-Zellen
Abbildung 14	stabile Transfektion mit LRP+GFP (1,1 μ g/ μ l)
Abbildung 15	Die stabile Transfektion von pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 mit CHO 13-5-1-Zellen

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Endozytoseexperiment mit α 2M und CHO K1-Zellen.
Tabelle 2	Endozytoseversuch mit α 2M und CHO K1-Zellen und CHO 13-5-1-Zellen
Tabelle 3	Kontrolle des Endozytoseexperiment mit α 2M und mit pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 transfizierte CHO 13-5-1-Zellen
Tabelle 4	Konzentration und Reinheit vom amplifizierten pcDNA3.1(+) LRP1_CR10-Plasmid
Tabelle 5	Konzentration und Reinheit von pLBCX+pcDNA3.1(+) LRP1_R10

1. Einleitung und Zielsetzung der Promotion

Transport, Austausch und Verteilung von Stoffwechselprodukten sind einige der vielen Aufgaben der Blut-Hirn-Schranke. Sie ermöglicht den Blutgradienten vom zentralen Nervensystem abzugrenzen und somit die einzelnen Bereiche zu schützen (Abbott 2013). Interaktion mit verschiedenen neuronalen, vaskulären und immunabhängigen Zellen beeinflussen die vielfältigen Mechanismen. Allerdings hat die Blut-Hirn-Schranke im funktionsfähigen sowie im fehlerhaften Zustand einen Einfluss auf das neuronale System und deren Funktionen. Neurologische Störungen wie Multiple Sklerose, Morbus Alzheimer, Epilepsie und traumatische Gehirnverletzungen können Folge und auch Auslöser für eine zugrunde gehenden Blut-Hirn-Schranke sein. Der Funktionsverlust der Blut-Hirn-Schranke kann zu Ödemen, Veränderung der ionischen Homostase, veränderten Signalen und Einbruch des Immunsystems führen. Degeneration und Dysregulation sind häufige Folgen von diesen Einflüssen. Die veränderte Form der Blut-Hirn-Schranke schließt auch oft einzelne Komponenten wie z.B. Transportproteine oder auch Rezeptoren ein (Daneman und Prat 2015).

Ein wichtiger Rezeptor ist der Low Density Lipoprotein Receptor-related-Protein 1 (LRP1), der ein Teil der Low Density Lipoprotein Receptor Familie (LDLR) ist. LRP1 ist in einige unterschiedliche biologische Prozesse wie z.B. die Signaltransduktion von Proteinen und Liganden, die Degradierung von Proteasen und die Regulation vom Metabolismus eingebunden, die das Nervensystem nachhaltig beeinflussen. Aufgrund der Tatsache, dass LRP1 vor allem in neuronalen Zellen zu finden ist, beeinflusst der Rezeptor hochwirksam das zentrale Nervensystem (Storck und Pietrzik 2017).

Zum heutigen Zeitpunkt sind die Aufgaben von LRP1 und deren Auswirkungen auf das neurovaskuläre System in einem gewissen Umfang bekannt. LRP1 ermöglicht die Endozytose von unterschiedlichen Liganden durch verschiedene Molekülformen (Bres und Faissner 2019). LRP1 ist durch die enge Beziehung zur Blut-Hirn-Schranke ein essenzieller Faktor für den funktionellen Ablauf von Signalübertragungen, Liganden- und Proteintransport und auch für die Regulation des Stoffwechsels (Kanekiyo und Bu 2014). Der Untergang dieses Rezeptors kann Funktionen im neuronalen System beeinträchtigen und im schlimmsten Fall zum Verlust dieses Systems führen (Bres und Faissner 2019).

Aus diesem Grund gibt es eine Verbindung zu neuronalen Erkrankungen. Mit der Beschädigung der Blut-Hirn-Schranke verliert LRP1 seine Affinität und Aktivität zu den unterschiedlichen Liganden und zu den diversen Funktionen von Enzymen und Proteinen (Storck und Pietrzik 2017).

In diesem Zusammenhang soll nun die Funktionsfähigkeit einer verkürzten Form von LRP1 (pcDNA3.1 (+) LRP1_CR10) untersucht werden. Bekannt ist die Affinität der Domänen von

LRP1, doch wie genau die Aufgaben auf die Einzelteile der jeweiligen Domänen und der verschiedenen Kompartimente verteilt ist, ist noch unklar. In diesem Fall besitzt das Konstrukt 1 von 11 cysteinreiche komplementäre Teile der Domäne IV von LRP1 und stellt eine verkürzte Variante von LRP1 dar (Storck und Pietrzik 2017).

Anhand dieses Aufbaus soll die genaue Spezifizierung von Domäne IV von LRP1 ablaufen. Darüber hinaus soll die Auswirkung auf LRP1-abhängige neurologische Funktionen wie z.B. den Transport der Liganden untersucht werden. Mit den Liganden Tissue Plasminogen Activator (tPA) und α -2-Makroglobuline (α 2M) soll die Aufnahme und deren Intensität durch die verkürzte Variante überprüft werden. Außerdem wird die Effektivität des Konstrukts pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 untersucht. Die Vervielfältigung und die Klonierung wird die stetige Arbeit mit dem Vektor gewährleisten und ermöglicht im Anschluss eine stabile Transfektion durchzuführen, die die Idee einer stabilen Variante von pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 erfüllt.

2. Literaturdiskussion

In der Literatur ist mittlerweile der Aufbau und die Funktion der Blut-Hirn-Schranke, des LRP1-Rezeptors und den Liganden tPA und α 2M anerkannt. Die Auswirkung und die Interaktion der einzelnen Komponenten aufeinander soll in den folgenden Punkten dargestellt werden.

2.1. Blut-Hirn-Schranke

Eine präzise Kontrolle vom zentralen Nervensystem, die Regulation von unterschiedlichen Funktionen, sowie der Schutz von neuralem Gewebe vor pathogenen und toxischen Faktoren ermöglicht eine wichtige Struktur im menschlichen Körper- die Blut-Hirn-Schranke (Daneman und Prat 2015). Die Blut-Hirn-Schranke ist eine Ansammlung von Zellen und strukturellen Untereinheiten im zerebrovaskulären System, die das Blut vom Gehirnparenchym trennt. Folglich kann der Transport von Stoffen durch aktive und passive Regulationsmechanismen beeinflusst werden (van de Haar et al. 2016). Die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke sind durch „tight junctions“ verknüpft, die eine niedrige parazelluläre Permeabilität haben. Nur kleine lipophile Moleküle, Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxide können frei durch die Schranke diffundieren (Zlokovic 2011). Allerdings ist die genaue Aufgabe von „tight junctions“ noch nicht klar, da diese bei chronisch neuronalen Krankheiten beeinträchtigt werden (Zlokovic 2008). Ebenso ermöglicht es die Kombination von Carrier-Proteinen und dem Gefäßsystem die Transport- und Barriere-Funktion zu vereinigen. Extrazelluläre und intrazelluläre Enzyme geben ebenfalls Schutz, um die metabolisierte Form von toxischen Anteilen an ihrem Transport sicher zu hindern (Abbott 2013).

2.2. Die Blut-Hirn-Schranke und die Auswirkung auf Neurodegenerationen

Durch die essenzielle Rolle der Blut-Hirn-Schranke steht diese sehr eng in Verbindung mit pathologischen Veränderungen im menschlichen Körper. Es wurde bereits festgestellt, dass Funktionsstörungen der Blut-Hirn-Schranke das zentralen Nervensystems beeinträchtigen können. Schäden an der Blut-Hirn-Schranke lassen sich mit Entzündungen und neuronalen Pathologien, Störungen und Verlust in Verbindungen bringen (Abbott 2013). Folglich können Störungen der Blut-Hirn-Schranke zu neuronalen Einschränkungen führen, die in Form von Morbus Alzheimer, Multipler Sklerose, Epilepsie und traumatischen Gehirnverletzungen zum Vorschein kommen (Daneman und Prat 2015). Eine Funktionsstörung der Blut-Hirn-Schranke kann sich durch Veränderungen der „tight junction“, der Transportproteine oder auch der Ion-Kanäle äußern (Daneman und Prat 2015). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es durch die Veränderung unterschiedlicher Komponenten, wie z.B. Rezeptoren, Endothelzellen, Proteinen innerhalb der Blut-Hirn-Schranke, zu pathologisch veränderten Auswirkungen im neuronalen System kommen kann. Da die Barriere, welche das Blut vom Gehirnparenchym trennt,

einen komplexen Aufbau hat, können Neurodegenerationen eine Konsequenz einer veränderten Blut-Hirn-Schranke sein (Oboudiyat et al. 2013; van de Haar et al. 2016).

2.3. Der LRP1-Rezeptor

Der LRP1-Rezeptor gehört zu der Familie der Low Density Lipoproteine, die einen großen Einfluss auf multifunktionale Proteine haben (Spuch et al. 2012). Diese Art von Rezeptoren befinden sich auf der Zelloberfläche und sind in einige biologische Funktionen eingebunden (Beffert et al. 2004). LRP1 ist ein 600 kDa schweres transmembranes Glykoprotein und wird im trans-Golgi-Komplex durch die Endopeptidase Furin gespalten (Pietrzik et al. 2002). Die ursprünglich 600 kDa große Einheit zerfällt in eine 85 kDa transmembrane β -Kette und eine 515 kDa schwere extrazelluläre α -Kette (Kanekiyo und Bu 2014). Die extrazelluläre Untereinheit setzt sich aus epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF) und vier komplementär-bindenden Domänen, die aus cysteinreichen komplementären Teilen bestehen, zusammen. Domäne I besitzt zwei, Domäne II acht, Domäne III zehn und Domäne IV elf cysteinreiche wiederholende komplementäre Anteile (Storck und Pietrzik 2017). Dieser Teil beeinflusst die Bindungsaffinität der unterschiedlichen Liganden am Rezeptor (Herz und Strickland 2001). Der intrazelluläre Anteil von LRP1 wird mit der Funktion der Signaltransduktion und der Endozytose durch zwei NPxY-Motive in Verbindung gebracht (Kanekiyo und Bu 2014). LRP1 ist vor allem im zentralen Nervensystem vorzufinden und kann mehr als 10 verschiedene Ligandtypen binden und transportieren (Zhuo et al. 2000) wie z.B. α -2-Makroglobuline und auch Tissue Plasminogen Activator (Willnow et al. 1994). Es konnte festgestellt werden, dass die Domänen II und IV eine größere Bindungsaffinität im Vergleich zu anderen Domänen besitzen (Obermoeller-McCormick et al. 2001). Ein Grund für diese Besonderheit kann die Anordnung der cysteinreichen komplementären Anteile und deren Verbindungen durch Disulfidbrücken sein, durch welche die Wahrscheinlichkeit der Bindung mit einem Liganden erhöht ist (Sagare et al. 2013; Obermoeller-McCormick et al. 2001). Jedoch sind einige Details bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht genau geklärt (Neels et al. 1999). LRP1 ist in neurovaskulären Einheiten und im Plexus choroideus vorzufinden und kann angesichts seiner besonderen Struktur problemlos Liganden über die Blut-Hirn-Schranke transportieren (Spuch et al. 2012). Allerdings ist der Ligandentransport nicht die einzige Funktion von LRP1, so reguliert es z.B. auch die Aktivität der Proteasen an der Zelloberfläche und den zellulären Austausch mit Toxinen und Viren (Bres und Faissner 2019). Außerdem spielt der Rezeptor eine große Rolle in dem physiologischen und pathologischen Zellwachstum, der Zellmigration, der Fibrinolyse sowie in der Thromboseaktivität von Atherosklerose (Neels et al. 1999).

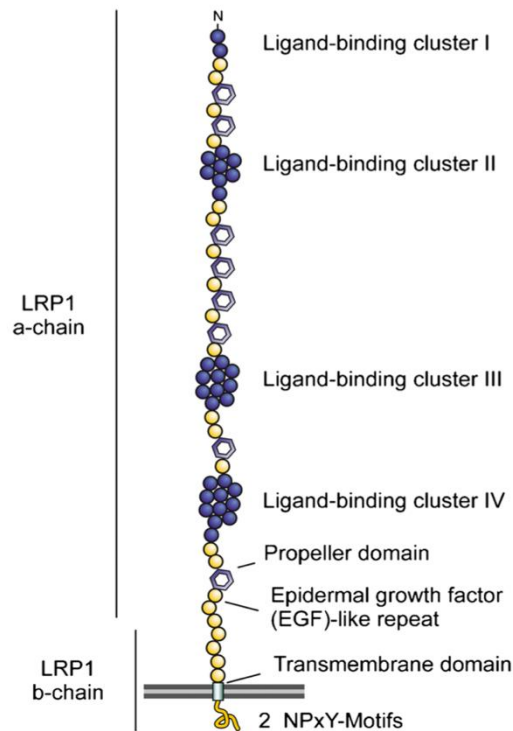


Abbildung 1: Die Darstellung zeigt den Aufbau und Struktur von LRP1. Nach der Synthese im trans-Golgi-Komplex spaltet die Endopeptidase Furin den LRP1-Rezeptor 85 kDa transmembranen β -Kette und eine 515 kDa schwere extrazelluläre α -Kette zerfällt. Die extrazelluläre Untereinheit setzt sich aus epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF) und vier komplementär-bindenden Domänen, die aus cysteinreichen komplementären Teilen bestehen, zusammen. Domäne I besitzt zwei, Domäne II acht, Domäne III zehn und Domäne IV elf cysteinreiche wiederholende Anteile. Die β -Kette setzt sich aus dem transmembranen Anteil und zwei intrazellulären NPxY-Motiven zusammen (Storck und Pietrzik 2017).

2.4. α -2-Makroglobuline

Das α -2-Makroglobulin (α 2M) gehört zu der Familie der α -Makroglobuline. Diese ursprüngliche Ligandenfamilie ist in Körperflüssigkeiten, wie Blutplasma, zerebrospinalen Flüssigkeiten und anderen fluiden Substanzen, zu finden, die essenziell für die körperliche Vitalität sind. α 2M besitzt eine 720 kDa große Struktur, die wie ein Käfig aufgebaut ist. Die käfigartige Struktur wird durch den Zusammenschluss von vier 180 kDa-Untereinheiten zu zwei disulfidverbundenen Dimeren gebildet, die nicht kovalent gebunden sind, um die tetrameriche quartär Struktur des Proteins zu ermöglichen (Cater et al. 2019). Innerhalb jeder Untereinheit befindet sich eine „Bait“-Region, die sich aus 25 Aminosäuren zusammensetzt (Rehman et al. 2013). Sie gehört zu dem Teil, welcher für die Spaltung von Proteasen verantwortlich ist und für die große Vielfalt der Interaktionen zwischen α 2M und den unterschiedlichen Proteasen eine Rolle spielt. Die Bindung von Proteasen an α 2M löst eine Konformationsänderung aus. Folglich kommt es zu chemischen Verbindungen mit unterschiedlichen Liganden, die durch eine gesteigerte Aktivität der freiliegenden „Bait“-Regionen ausgelöst wird (Wolfgang Borth; Cater et al. 2019). Der Verbund mit LRP1 ermöglicht α 2M die Menge an nichtkovalent gebundenen Liganden zu kontrollieren und an α 2M gebundenen Liganden zu beseitigen (Nielsen, M.S. et al. 1995). Allgemein besteht die Aufgabe von α 2M in der Kontrolle von extrazellulären Prozessen. Somit gehört die Stimulierung und die Inhibition von unterschiedlichen Faktoren, aber auch die Chaperonaktivität dazu. Sie unterstützt neue Proteine bei ihrer Faltung und falsch gefaltete Proteine werden stabilisiert und deren Aggregation verhindert (Rehman et al. 2013). Diese Funktion ermöglicht es auch bei β -Amyloid (A β), den Prozess der Akkumulation anzuhalten und eine Stagnation und auch Beseitigung mithilfe der kovalenten Bindung an α 2M einzuleiten (Kang et al. 2000).

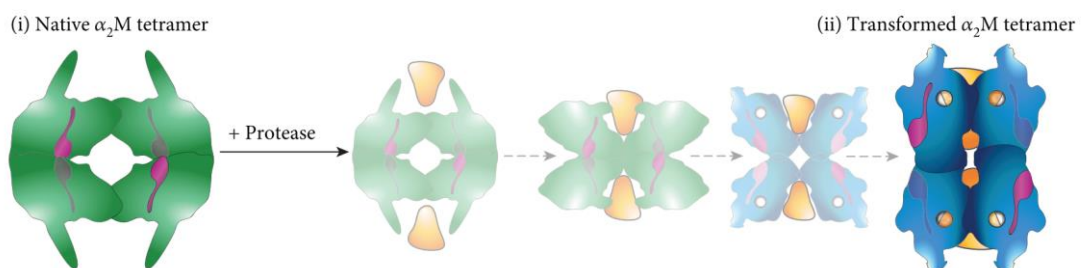


Abbildung 2: Konformationsänderung von α 2M. Es ist die tetrameriche Anordnung der einzelnen Untereinheiten zu erkennen, die mittig eine rötlich- markierte „Bait“- Region besitzen. Durch die Verbindung mit einer Protease kommt es zur Änderung des Ursprungzustands. Die Protease wird von α 2M aufgenommen und die Untereinheiten orientieren sich um, sodass die „Bait“-Region nach außen gekehrt ist und die Protease aufnehmen kann (Cater et al. 2019).

2.5. Tissue Plasminogen Activator

Tissue Plasminogen Activator (tPA) ist ein Teil der Gruppe der Plasminogenaktivatoren, die proteolytische Enzyme sind (Rouf et al. 1996). tPA ist eine Serinprotease, die von Endothel-

zellen sekretiert wird (Gravanis und Tsirka 2008). Es setzt sich aus einer einzelnen Polypeptidkette zusammen, die 527 Aminosäuren beinhaltet. Insgesamt hat tPA ein Gewicht von 72 kDa. Mithilfe von 17 Disulfidbrücken zwischen 34 Cystein-Resten kann die typische Faltung mit den Kringeln und Fingern entstehen (Rouf et al. 1996). Die N-Terminus leichte Kette bindet mit C-Terminus der schweren Ketten über Disulfidbrücken. Die Verbindung der beiden Ketten ermöglicht eine erhöhte katalytische Funktion und gibt die vollständige Aktivität von tPA frei (Gravanis und Tsirka 2008). tPA hat die Aufgabe Bestandteile der extrazellulären Matrix mit der Aktivierung von Plasmin abzubauen. Die Konzentration von tPA wird extrazellulär im zentralen Nervensystem unter anderem von LRP1 überwacht und beeinflusst (Bres und Faissner 2019; Zhuo et al. 2000). In einer hohen Dosierung ist tPA vor allem im Gehirnnareal (meistens im Cerebellum) zu finden, wo eine Zellmigration abläuft (Bres und Faissner 2019). Ansonsten ist tPA in der Pathologie neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer oder auch Schizophrenie anzutreffen (Fabbro und Seeds 2009; Hoirisch-Clapauch und Nardi 2015). Da tPA in einer funktionellen Verbindung mit dem fibrinolytischen System steht, kann tPA als therapeutisches Mittel bei Schlaganfällen verwendet werden (Marler, J.R. (1995). Prinzipiell beeinflusst tPA Protein-Protein-Verbindungen und steht in enger Verbindung mit LRP1 (Obermoeller-McCormick et al. 2001; Gravanis und Tsirka 2008).

2.6. Die Verbindung zwischen LRP1 und den Liganden α -2-Makroglobulin und Tissue Plasminogen Aktivator

Wie bereits in 2.3. erwähnt, steht LRP1 mit unterschiedlichen Liganden in einem Zusammenhang, die physiologische und pathologische Funktionen grundlegend beeinflussen (Zhuo et al. 2000). Anhand von α 2M und tPA kann die Endozytose bestimmt werden. tPA hat einen Einfluss auf den Blutfluss und infolgedessen auch auf Gefäße und deren Tonus. LRP1 kontrolliert tPA über die Endozytose. Der Rezeptor unterstützt einerseits die neuronale Aktivität von tPA, andererseits kann in einer pathologischen Situation der Komplex mit Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) aufgelöst werden. Als Folge kann ein neuronaler Zusammenbruch eintreten (Gravanis und Tsirka 2008; Zhuo et al. 2000; Hoirisch-Clapauch und Nardi 2015). LRP1 kann zudem die metabolische Signalkaskade beeinflussen, in der α 2M mit einbegriffen ist (Kang et al. 2000). α 2M steht mit unterschiedlichen Proteinen in einer permanenten Wechselwirkung, dabei unterstützt LRP1 diesen Prozess, auch wenn es zur fehlerhaften Verbindung kommt und diese verworfen werden müssen (Cater et al. 2019). Des Weiteren ist klar, dass LRP1 und auch α 2M eine genetische Kausalität zu Morbus Alzheimer besitzen. Bei einer reduzierten Menge an LRP1-Rezeptoren kann es zu einer Verringerung an α 2M kommen und dadurch wird der A β -Abbau gefördert. Als Folge kommt es zu Ablagerungen von A β (Herz und Strickland 2001).

3. Material

3.1. Zelllinie

Zelllinie	Zelltyp	Kulturmedium
CHO K1	Chinese hamster ovary cells	Alpha-MEM
CHO 13-5-1	Chinese hamster ovary cells with no dectabel LRP1	Alpha-MEM

3.2. Bakterienstock

Bakterienstock	Hersteller
E.coli DH5 α	Invitrogen, Karlsruhe

3.3. Plasmidvektor

Plasmidvektor	Hersteller
pLBCX	Clontech™
pCDNA 3.1	Invitrogen, Karlsruhe

3.4. Primer

Name	Schnittstelle	Sequenz 5' → 3'
XhoI fwd	XhoI	ATTATCCTCGAGGACCATGCTGACCCCGCCGTTG
NotI-rev	NotI	GATCGCGGCCGCTCTATGCCAAGGGGTC

3.5. Chemikalien und Reagenzien

Material	Hersteller
40 % Acrylamid/ Bis Solution 29:1	Bio-Rad Laboratories
Actilyse	
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf

Alpha-2-Macroglobulin (A2M) Antibody (FITC)

Alpha- MEM without L-Gluthamine	Lonza
Ammoniumpersulfat (APS)	
BSA	
Chloroquine	Sigma-Aldrich
Complete™ Protease Inhibitor Coctail	Sigma-Aldrich
10 xCutSmart	NEB, Bad Schwalbach
DNA-Marker 1kb	NEB, Bad Schwalbach
Dublecco's Phosphate Puffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, DEisenhofen
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum (FCS)	Thermo Fisher Scientific
Heparin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Immobilon Western HRP Substrate Luminol Re- agenz	Millipore
Immobilon Western HRP Substrate Peroxide Lösung	Millipore
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Methylamine	Carl Roth, Karlsruhe
Nitrocellulose Membran	GE Healthcare Life Science
Nonfat dry milk (Magermilchpulver)	First Street
Nonidet P40 (NP40)	Merck
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ab116029)	

Penicillin-Streptomycin (p/s)	Sigma-Aldrich
Pierce™ BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific
Pierce™ BCA Protein Assay Reagenz B	Thermo Fisher Scientific
Polyornithin	
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Plasmocin	
Pyruvat	
Roti®-load 1 (4 x konz.) non-reducing	Carl Roth, Karlsruhe
SuperSignal West Pico Luminol/Enhancer Lösung	Pierce
SuperSignal West Pico Stable Peroxide Lösung	Pierce
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Trypan Blue (0,4 %)	Sigma-Aldrich
0,5 % Trypsin-EDTA (10x)	gibco
Tween20	Carl Roth, Karlsruhe

3.6. Kits

MiniPrep

MediPrep

NucleoSpin Gel and PCR clean up

Restriction Enzymes: XhoI, NotI HF, XbaI, SacII

Loading dye: 6x-blue, 10x-orange

Marker: 1 kb

3.7. Lösungen und Medien für die Zellkultur

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
0,1 % BSA in PBS	20 % BSA 0,02 % NaN ₃ PBS
Alpha-MEM	MEM 10 % (v/v) FCS 1 % Penicilin/ Streptomycin (p/s)
Alpha-MEM serum free	MEM 1 % Penicilin/ Streptomycin (p/s)
DMEM	MEM 10 % (v/v) FCS 1 % Penicilin/ Streptomycin (p/s) 1 % Pyruvat
Einfriermedium	10 % (v/v) DMSO 90 % Kompletmedium
Opti-MEM	Opti-MEM 1 % Penicilin/ Streptomycin (p/s)
PBS (pH 7,4)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM NaH ₂ PO ₄ Anhydrat 1,8 mM KH ₂ PO ₄
1x Trypsin	5 ml 10x Trypsin 45 ml Duplecco's Phosphate Buffered Sa- line (PBS)

3.8. Lösungen und Medien für die Bakterienkultur

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
LB-medium (Ampicilin)	LB-Medium pH 7,5 50 µg/ml Ampicillin (Endkonzentration)
LB-medium containing agar	LB-Medium pH 7,5 1,5 % Agar 50 µg/ml Ampicillin (Endkonzentration) H ₂ O

3.9. Lösungen und Puffer für DNA- Gelelektrophorese

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
6x DNA-Probenpuffer	10 mM Tris-HCl; pH8,0 50 % (v/v) Ficoll 0,006 % (w/v) Bromphenolblau
10x TAE-Elektrophorese	97,6 gr Tris-Base 20 ml Eisessig 5,84 gr EDTA 2 l H ₂ O
Ethidiumbromidstammlösung	500 µg/ml in H ₂ O

3.10. Lösung und Puffer für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese und den Western-Blot

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
Blockierungspuffer	TBS-T 5 % (w/v) Magermilchpulver
Blotting Buffer (Laufbuffer) pH 8,3	Aqua dest. 192 mM glycine 25 mM Tris base 20 % Methanol
Coomassie Blue Stain	50 % (v/v) EtOH 0,7 % (v/v) acetic acid 0,0175 % (v/w) Brilliant Blue in Ve * H ₂ O
De- Stain I	20 % EtOH 7 % acetic acid
1x Laufbuffer pH 8,3	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 0,1 % (w/v) SDS
Phosphate- Buffered Saline (PBS) -/-	Aqua dest.

(non-sterile)	13,7 mM NaCl 0,27 mM KCl 1,0 mM NaH ₂ PO ₄ 0,18 mM KH ₂ PO ₄
Ponceau-S	Aqua dest. 5 % Essigsäure 0,1 % Ponceau S
Resolving Buffer (Trenngelpuffer) (pH 8,8)	Aqua dest. 1,5 M Tris base 0,4 % (w/v) SDS
Resolving Gel (8 %)	Aqua dest. 8 % Acrylamid (29:1) 25 % Resolving Buffer pH 8,8 0,1 % APS 0,1 % TEMED
SDS-Laufpuffer	Aqua dest. 192 mM Glycine 25 mM Tris base 0,1 % SDS
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	Aqua dest. 0,6 M Tris-HCl 0,4 % (w/v) SDS
Sammelgel (4 %)	Aqua dest. 4 % Acrylamid (29:1) 25 % Sammelpuffer pH 6,8 0,1 % APS 0,1 % TEMED
10x Western-Blot Transferpuffer	250 mM Tris Base 192 mM Glycin H ₂ Odd

3.11. Lösungen und Puffer für die Proteinbiochemie

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
NP40 Lysis Buffer	50 mM Tris base pH 8,0 150 mM NaCl 0,02 % NaN ₃ 1 % NP40
Lysis-Puffer	NP40-Puffer 1x Protease-Inhibitor 1x Phosphatase-Inhibitor
Tris-puffered saline mit Tween20 (TBS-T)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 25 mM Tris base pH 7,4 0,1 % Tween20

3.12. Antikörper

Der primäre Antikörper wurde für diese Arbeit in 10 ml TBS-T mit 5 % Magermilchpulver verdünnt (s. obere Tabelle). 0,02 % NaN₃ wurde hinzugefügt, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern.

Der sekundäre Antikörper wurde zu Verwendung in 10 ml TBS-T und 5 % Magermilchpulver versetzt.

3.13. Primärer Antikörper

Name	Antigen	Organismus	Verdünnung	Hersteller
1704 (rb@ LRP1)	LRP1	Hase	1:10000 Verdünnung mit TBS+T-Puffer + 5 % Magermilchpulver + 0,02 % NaN ₃	
rb@tPA	tPA	Hase	1:2000 in TBS-T and 5 % Magermilchpulver	
rb@actin	actin	Hase	1:1000 in TBS-T	Thermo Fisher Scientific
mouse@tubulin	tubulin	Maus	1:10000 in TBS-T	Sigma-Aldrich 5060

3.14. Sekundärer Antikörper

Name	Antigen	Organismus	Verdünnung	Hersteller
goat@rabbit	rabbit	goat	1:10000 in TBS-T und 5 % Magermilchpulver	Sigma-Aldrich 9169
donkey@mouse	mouse	donkey	1:10000 in TBS-T und 5 % Magermilchpulver	Jackson Immuno Research 715-035-151

3.15. Software

Software	Hersteller
ADAP	Anthos
Excel	Microsoft
LAS-3000 Mini Image Reader	FujiFilm
Intas	
Power Point 2013	Microsoft
Wallac 1420 Counter multilabeled	Perkin Elmer

3.16. Geräte und Laborhilfsmittel

Agarose Gelelektrophorese System Agagel Biorad, München
Mini

Agarose Geldokumentation Intas Gel Imager	INTAS, Göttingen
CO ₂ -Brutschränke	New Brunswick, Edison, USA
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Flachbettschüttler Rocky®	Fröbel Labortechnik, Lindau
Folienschweißgerät	Krupps, Solingen
Gamma Counter Wizard ²	Perkin Elmer, Billerica, USA
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Hanau
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Kirchdorf
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Kühlschrank +4°C	Liebherr, Kirchdorf
LAS-3000 FujiFilm	FujiFilm, Fuji, Japan
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Magnetrührer MR 3000D	Heidolph, Schwabach
Mehrfachdispenser HandyStep®	Brand, Wertheim
Mikrowelle	Medion, Essen
Mini Protean III Gel und Transblot System	Biorad, München
Mini Protean III Western Transblot System	Biorad, München
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
pH-Meter	Mettler Toledo, Gießen
Pipetten 1µl-1000 µl	Gilson, Limburg-Offheim
Pipettierhilfe	Thermo Scientific, Dreiech
Plastikaustanzer X-Tracta	Biozym, Hess Oldendorf
Sterilbank Herasafe	Hereaus, Hanau
Sterilbank Safemate 1.2 Vision	Euroclone, Pero, Italien
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Vortexer	VWR, Darmstadt
Waage Mettler AE 160	Mettler Toledo, Gießen
Waage Denver Instrument XP-1500	Fisher Scientific, Schwerte
Wallac 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer, Billerica, USA
Wasserbad GFL 1056	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Biofuge fresco	Hereaus, Hanau
Zentrifuge Biofuge stratos	Hereaus, Hanau
Zentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Universal 320R	Hettich, Tuttlingen

3.17. Verbrauchsmaterialien

Einmalküvetten Kunststoff	Roth, Karlsruhe
Einweghandschuhe Latex	Roth, Karlsruhe
Einweghandschuhe Nitril	VWR, Darmstadt
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebekulturschalen (Ø 6 cm, 10 cm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Gewebekulturschalen (6- und 12-Lochplatten)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Glaspipetten 2,5 ml-5 ml	VWR, Darmstadt
Kryoröhrchen	Apogent, Wiesbaden
Mikrotest Platten 96-well (weiß)	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotest Platten 96-well (schwarz)	Greiner, Frickenhausen
Nitrocellulose- Membran Protran	Schleicher & Schuell, Dassel
Parafilm® American National Can™	Neeah, USA
Pipettenspitzen 0,1 µl-1000 µl	Starlab, Ahrensburg
Plastikpipetten 10 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Reaktionsgefäße 1,5 ml- 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Sterile Plastikröhrchen 15 ml	Greiner, Frickenhausen
Sterile Plastikröhrchen 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Zellspachtel	TPP, Trasadingen, Schweiz

4. Methoden

Bei den Methoden kann man zwischen zellbiologische, proteinbiochemische, molekularbiologische und mikrobiologische Methoden unterscheiden. Die einzelnen Versuche werden benötigt, um die Fragestellung zu erörtern. Diese werden im Folgenden dargestellt.

4.1. Zellbiologische Methoden

4.1.1. Immortalisierte eukaryotische Zelllinien

4.1.1.1. Kultur von eukaryotischen Zellen

Damit das Risiko einer Kontamination der Zellen mit Keimen und Bakterien verringert wird, wird vor Beginn der Arbeit mit eukaryotischen Zellen die Arbeitsfläche sowie die Arbeitsmaterialien mit 70%igen Ethanol desinfiziert oder autoklaviert. Jeglicher Arbeitsschritt der Kultivierung wird unter der Sterilbank durchgeführt. Die Zellen für die Versuche werden im Inkubator aufbewahrt, der für eine konstante Temperatur von 37 °C, 5 % CO₂ und für eine 95 % Luftfeuchtigkeit sorgt. Die flüssigen Arbeitsmaterialien, die bei 4 °C aufbewahrt werden, werden vor jeder Arbeit auf 37 °C aufgewärmt. Das Zellwachstum wurde regelmäßig mithilfe eines Phasenkontrastmikroskops beobachtet.

4.1.1.2. Allgemeiner Umgang mit eukaryotischen Zellen

Damit die Zellen nicht zu Grunde gehen, wurde alle zwei Tage das alte Medium entfernt, mit PBS behandelt, um tote oder nicht adhärente Zellen zu entfernen und daraufhin neues Medium hinzuzufügen. Das Medium dient der Versorgung der Zellen mit wichtigen Nährstoffen, die in den Zusätzen, wie fetales Kalbserum, des Mediums zu finden sind.

4.1.1.3. Passagieren von adhärenenten Zellen

Wenn die Zellen eine Dichte von etwa 60-70 % erreichen, sollten diese passagiert werden, damit eine uneingeschränkte Wachstumsrate gewährleistet werden kann. Falls dies nicht geschieht, kann es zu einem eingeschränkten Versorgungsangebot an Nährstoffen kommen und die Zellen sterben ab. Abhängig von der Wachstumsrate wurde dieser Schritt alle 2-4 Tage durchgeführt. Altes Medium wurde entfernt und die Oberfläche wurden mit 1ml 1xPBS abgespült und verworfen. Daraufhin wurde 1 ml 1xTrypsin/EDTA Lösung hinzugefügt. Die Platten wurden mehrmals in leichten Kreisen bewegt. Trypsin ist eine Serinprotease und gehört zu den Endopeptidasen. Es dient der Auflösung des Zell-Oberflächen-Kontakt und des Zell-Zell-Kontakts. Dadurch lösen sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschale und werden vereinzelt. Die Zellkulturschalen wurden in den Inkubator bei 37 °C für 3-5 min gestellt. Der Vorgang wurde abgebrochen, indem 9 ml neues Medium zur Trypsin-Lösung hinzugefügt wurde. Die Lösung wurde mehrmals auf und ab pipettiert, um eine optimale Vereinzelung der Zellen zu

gewährleisten. Danach wurde sie in der gewünschten Relation zum neuen Medium hinzugegeben und in neuen Zellkulturschalen ausgesät.

4.1.1.4. Kryokonservierung von Zellen

Um einen festen Bestandteil an Zellen zu besitzen, sollten zwischenzeitlich Zellen immer wieder eingefroren werden, um darauf zu einem späteren Zeitpunkt für weitere Arbeiten zurückgreifen zu können. Für eine kürzere Zeitspanne ist eine Lagerung bei -80 °C möglich. Langfristig werden Zellen bei -180 °C im Stickstofftank gelagert. Die Kryokonservierung hat das Ziel mithilfe eines Gefrierschutzmittels, wie z.B. DMSO, Zellmaterial, ohne jegliche zeitliche Beschränkung, lagern zu können. Dafür wurde von 60-70 % dichten Zellen das alte Medium entfernt, mit 1x PBS gewaschen und Trypsin hinzugegeben, damit sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschale lösen. Die Trypsinierung wurde dann durch das Hinzufügen von neuem Medium gestoppt. Diese Suspension wurde in ein 15 ml Falcon gegeben und 4 min bei 160 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit Medium nochmal resuspendiert. 1 ml Suspension wurde in ein Kryobehälter gegeben, welcher 10 % DMSO enthielt. DMSO dient als Gefrierschutzmittel und verhindert die Bildung von Eiskristallen, die beim Einfrieren die Zellen zerstören können. DMSO ist ein stark toxisches Reagenz und sollte sofort bei Kontakt mit Zellen weggefroren werden. Die Zellen wurden kontrolliert mit Mr.Frosty runtergekühlt auf -80 °C gelagert und nach einigen Stunden im Stickstofftank abgestellt.

4.1.1.5. Revitalisierung von kryokonservierten Zellen

Falls neue Zellen benötigt werden, können diese aus dem Stickstofftank entnommen werden. Dementsprechend wurden die Zellen aus dem Tank entnommen und resuspendiert bis die Suspension getaut ist. 1 ml der Zellen aus dem Kryogefäß wurden dann in ein 10 ml Falcon überführt. Ein weiterer Milliliter, mit dem das Kryogefäß durchgespült wurde, wurde in dieses Falcon überführt. 8 ml Medium wurde hinzugefügt und 4 min bei x160 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, 10 ml neues Medium hinzugefügt und auf und ab pipettiert, damit sich das Pellet im Medium verteilen konnte. Dieses Medium wurde in einer neuen Zellkulturschale verteilt.

Die nächsten zwei Wochen wurden diese Zellen mit 25 mg/ml Plasmocin behandelt. Dabei wird eine Kontamination mit Mycoplasmen verhindert.

4.1.1.6. Bestimmung der Zellmenge und das Aussäen von Zellen

Um einen genauen Versuchsablauf zu gewährleisten, benötigt man eine bestimmte Anzahl an Zellen. Dafür müssen die Zellen gezählt und in einem bestimmten Verhältnis ausgesät werden. Von den verwendeten Zellen wurde dafür das alte Medium entfernt, mit 1x mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin behandelt. Der Vorgang wurde durch das Hinzufügen von 9 ml Medium angehalten. Die Lösung wurde in ein 15 ml Falcon überführt und für 4 min bei x160 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und mit 10 ml neuem Medium resuspendiert und 10-15

Mal geschwenkt. In ein 2 ml Eppendorfer Gefäß wurde daraufhin 20 µl der Zelllösung und 1:10 Trypan-Blau zusammengeführt, vermischt und in der Neubauer-Kammer verteilt. Anschließend wurden die Zellen gezählt und die benötigte Menge an Zellen mit dieser Formel berechnet:

$$\text{Anzahl der Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnung} / \text{Anzahl der Großquadranten} = \text{Zellzahl} / \text{ml}$$

Die kalkulierte Menge an Zellen wurde nun in 6-Lochplatten verteilt und mit der benötigten Menge an Medium aufgefüllt. Für eine gleichmäßige Verteilung wurde die Suspension nochmals resuspendiert.

4.1.1.7. Stimulation von Zellen mit Chloroquin

Um eine verbesserte Transfektion zu gewährleisten wurden die Zellen vor einem Transfektionsvorgang mit α2M mit 25 mM Chloroquin behandelt. Chloroquin hemmt die DNase durch Neutralisierung des pH-Wert im Vesikel und kann die Effizienz der Transfektion steigern (Murphy und Weaver 2018).

4.1.1.8. Transfektionsmethoden

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von bestimmten Genmaterial z.B. Fremd-DNA mithilfe eines Vektors in eine Wirtszelle, welche in diesem Fall eukaryotische Zellen waren. Durch diese Methode kann ein bestimmtes Genprodukt und seine Wirkung auf den Wirt untersucht werden. Kommt es zu einer zeitlich beschränkten Einschleusung der DNA spricht man von einer transienten Transfektion. Wenn das Genmaterial langfristig in das Wirtsgenom integriert wird, handelt es sich um eine stabile Transfektion.

4.1.1.9. Transiente Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

In diesem Fall wird bei der transienten Transfektion PEI verwendet, da es die Transfektionseffizienz bei Plasmid-DNA erhöht.

Dafür wurden circa 600.000-800.000 Zellen pro Schale ausgesät. Das Medium wurde entfernt und durch serumfreies Medium ersetzt, um die Zellen reaktionsfähiger zu machen. Danach wurde der Transfektionsansatz hinzugefügt (1 µg DNA, 4 µl PEI, 60 µl Medium) und bei 37 °C für 4-6 Stunden inkubiert. Dann wurde das Medium erneut gewechselt.

4.1.2. Stabile Transfektion von Zelllinien mit retroviraler Infektion

4.1.2.1. Grundlage der Methodik

Das langfristige Einbringen von genetischem Material in eine Zelle wird mithilfe von Retroviren ermöglicht. Retroviren besitzen die Fähigkeit ein externes Genom stabil in das Genom einer Wirtszelle einzubauen. Für den Gentransfer wurde ein retroviraler Vektor und eine Verpackungszelllinie verwendet. Um diesen Prozess auszuführen, besitzt der Virus drei Gene: gag, pol und env. Welche im weiteren Verlauf als drei Banden im Agarosegel ersichtlich sind (Abbildung 10). Die ersten beiden Gene werden stabil in die Verpackungszelllinie eingegliedert.

Dieser Transferplasmid beinhaltet den nichtkodierende Nukleinsäureabschnitt des Verpackungssignals Ψ . Der retrovirale Expressionsvektor besitzt alle drei Gene, das zu integrierende Gen, den Selektionsfaktor, das Verpackungssignal und das Transkriptions- und Prozessierungselement. Durch diesen Aufbau wird verhindert, dass es zu keiner willkürlichen Entwicklung infizierter Viren kommt, sodass dieser Vorgang kontrollierbar bleibt. Nachdem es zum Verbund zwischen der Verpackungslinie und dem retroviralen Vektor gekommen ist, werden Viruspartikel während der Transkription sezerniert. Der sezernierte Bestand kann nach einer gewissen Zeitperiode zu den Zielzellen hinzugefügt werden. Der virale Bestandteil kann sich in das Genom der Zielzelle stabil integrieren.

4.1.2.2. Die Transfektion von HEK-GP2 zur Virusherstellung

Die Verpackungszelllinie GP2-293, die ein Teil der HEK 293-Zellen ist, wird bei stabilen Transfektionen verwendet, da diese die Replikation von Retroviren ermöglichen. Um den Virus herzustellen, wird die Ziel-DNA mit dem Helferplasmid pVSVG in GP2-Zellen transfiziert. Das Helferplasmid ist ein Glykoprotein, das aus dem Vesikulären Stomatitisvirus stammt. Es unterstützt die Endozytose des Virus in der Verpackungszelllinie und die Expression des Virus.

Die HEK-GP2 wurden in 10 cm Schalen kultiviert bis eine Konfluenz von 1:3 vorhanden war. Am folgenden Tag wurde die Transfektion von pVSVG und der Ziel-DNA in GP2-Zellen durchgeführt. Dafür wurden ein Ansatz mit 10 μg pVSVG, 10 μg Ziel-DNA mit jeweils 40 μl PEI und Opti-MEM mit Chloroquine und anschließend mit DMEM inkubiert, der nach einer Inkubationszeit von insgesamt 25 min zu den GP2-Zellen gegeben wurde. Nach 4-6 Stunden wurde das Medium gewechselt.

Diese Arbeiten erfolgten unter S2-Bedingungen. Um eine Kontamination zu vermeiden, wurde die entsprechende Sicherheitskleidung angezogen und Plastikpipetten verwendet. Der Abfall wurde gesondert entsorgt.

Am nächsten Tag wurde dann das Medium durch 5 ml frisches DMEM ersetzt, um einen höheren Titer der Viren zu erreichen. Die Zielzellen (CHO 13-5-1) wurden in 6 cm Schalen für eine 50 % Konfluenz ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und 4 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde die Lösung, die aus 2 ml Viren-Überstand, 1 μl Alpha-MEM und 6 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene bestand, in jede Schale mit den Zielzellen hinzugefügt.

4.1.2.3. Blastocidin-Selektion infizierter Zellen

Die Zielzellen (CHO 13-5-1) wurden in den nächsten zwei Wochen mit 4 mg/µl Blastocidin behandelt, dass die transfizierten Zellen eine Resistenz besitzen. Folglich konnten die transfizierten Zellen weiterwachsen.

Damit die richtige Menge an Antibiose verwendet wird, wurden CHO 13-5-1 in 6 cm Schalen ausgesät, Blastocidin in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt und deren Mortalität beobachtet.

4.1.3. Endozytose bei transfizierten Zellen

4.1.3.1. tPA

Ziel des Endozytoseexperimentes ist es festzustellen, ob und in welchem Maß die Endozytose mit pcDNA 3.1 (+) LRP1_CR10 transfizierten CHO 13-5-1 stattfinden kann. Dafür wurde zunächst tPA internalisiert. Das Medium der transfizierten Zellen wurde abgesaugt. Die Schale wurde mit 1x PBS durchgespült und serumfreies Medium hinzugefügt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Endozytoseansatz hinzugefügt. In diesen Fall wurde die therapeutische tPA-Konzentration von 0,016 mg/ml verwendet.

Die Endozytose wurde abgebrochen, sobald die Zellkulturschalen auf Eis gelegt wurden.

4.1.3.2. α2M

Um ein Endozytoseexperiment mit α2M durchführen zu könne, muss das α2M zunächst aktiviert werden. Dafür wurde durch die Zugabe von 1 ml α2M-TBS-Lösung hinzugefügt, um eine erhöhte Reaktivität zu gewährleisten. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Suspension über Nacht mithilfe einer Dialyse mit TBS-Lösung aufgetrennt.

Nach der Aktivierung der Moleküle war das Ziel des Versuchs die Initialisierung von α2M von pcDNA 3.1 (+) LRP1_CR10 transfizierten CHO 13-5-1-Zellen festzustellen. Dafür wurden die Zellen 30min vor der Endozytose mit serumfreiem Medium inkubiert, welches 0,2 % BSA und 1,8 gefaltetes Trypsin beinhaltet. Daraufhin wurde das serumfreie Medium entfernt, mit 1x PBS ausgespült und der Endozytoseansatz (serumfreies Medium, 50 µg/ml FITC-labeled human α2M, 100 µM Chloroquin) hinzugefügt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Eis mit PBS gewaschen und lysiert. Jeweils 50 µl des Lysat wurde in eine schwarze Micro-Test Platte gegeben und mit dem „Wallac 1420 Multilabel Counter“ (PerkinElmer) ausgewertet.

4.2. Proteinbiochemische Methoden

4.2.1. Zellyse

Um vorherige zelluläre Aktivitäten zu unterbinden, wurden die Zellen auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellkulturschalen vorsichtig mit 5 °C kaltem PBS 2–3 Mal ab gespült, um restliche nicht adhärenzte Zellbestände oder Zellabfall zu entfernen. Allerdings durften keine aktiven Zellen weggespült werden. Dann wurde in die Schalen 600µl 5°C kaltes PBS hinzugefügt und die Zellen vom Schalenboden abgeschabt, um sie in ein Eppendorfer-Gefäß zu übertragen. Diese wurden bei 4 °C, bei 4250 rpm, 4 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt. Das entstandene Pellet wurde mit NP-40 und einem Proteaseinhibitor (PI) resuspendiert, welche jegliche Prozesse in den Zellen aufhalten. Dieser Vorgang ist für eine Proteinanalyse notwendig. Das entstandene Pellet konnte nun bei -20 °C eingefroren werden, bis er weiterverwendet wurde.

4.2.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

In diesem Fall wurde die BCA-Assay Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet. In alkalischen Lösungen findet die Biuretreaktion statt, wo Kupfer(II)-Ionen sich mit Proteinen zu einem Komplex verbinden. In diesem Komplex werden die Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer-Ionen reduziert. In Kombination mit Bicinchoninsäure verfärbt sich die Lösung violett. Je mehr BCA in der Suspension beinhaltet ist, desto dunkler ist deren Farbe. Die Lösung wurde 20 min auf Eis inkubiert und bei 4 °C bei 14.000 rpm, 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfer Gefäß übertragen. Danach wurde dieser 10x mit destilliertem Wasser verdünnt (5 µl Proteinlysate mit 45 µl H₂O). Als Referenzschema wurde eine Eichgerade gemessen, wo BSA (0-500 µg/ml) als Standardprotein verwendet wurde. Dies findet man in einem Pipettierschema wieder (s.u. Tabelle). Zu jedem Lysat und der Standardreihe wurde 1 ml Reaktionslösung pipettiert. Diese wurde 1:50 aus Lösung A (BCA) und Lösung B (4 % Cu₂SO₄ x 5 H₂O) zusammengesetzt. Die Lösungen wurden für 30 min bei 60 °C auf dem Schüttler inkubiert und die Extinktion bei 562 nm gemessen.

<u>Standard-Konzentration (µg BSA/ml)</u>	<u>µl H₂O</u>	<u>µl BSA Lysat (1 µg/µl)</u>
0	50	0
100	45	5
200	40	10
300	35	15
400	30	20
500	25	25

4.2.3. Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Um die Proteinmischung noch genauer analysieren zu können, wurde die Gelelektrophorese für eine Bestimmung des molekularen Gewichtes verwendet. Eine Form ist die SDS-PAGE. Dabei werden Proteine nach ihrer molekularen Masse im elektrischen Feld aufgetrennt. Das Trennmedium ist ein Polyacrylamid-Gel. Folglich dient das Gel als Sieb für die unterschiedlichen Proteingrößen. Die Proteine binden mit einem negativen SDS-Komplex mit einem konstanten Masse-Ladung-Verhältnis bei dem SDS die Proteine denaturiert und in ihrer Quartärstruktur einschränkt. Diese Reaktion wird verstärkt durch Mercaptoethanol oder DTT. Durch diesen Schritt und durch die allgemeine negative Ladung kann die Auftrennung der Proteine nach Größe erfolgen, da die Eigenladung überdeckt wird. Das elektrische Feld sorgt dafür, dass die Proteine zur Anode wandern und sich nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Das Gel lässt sich in zwei Teile einteilen, ein 4%igen Sammelanteil und in der Durchlässigkeit variables Trenngel.

4.2.4. Gießen der Gele

Zum Gießen des Gels wurden das System der Firma Biorad verwendet. Die Platten wurden mit destilliertem Wasser und anschließend mit Ethanol gesäubert. Diese wurden nach Anleitung im Gießständer fixiert. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und eine Höhe von 2-4 cm freigelassen. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überdeckt. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und restliche Flüssigkeitsüberstände mit Filterpapier entfernt. Danach wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der gewünschte Probetaschenkamm eingesetzt. Nach Beendigung der Polymerisation wurde der Kamm und die restlichen Gelüberstände mit destilliertem Wasser entfernt. Als Nächstes wurde das Gel in eine Laufkammer eingesetzt und mit 1x SDS- Laufpuffer aufgefüllt. Die Anode und Kathode wurden mit der Spannungsquelle verbunden.

4.2.5. Vorbereitung der Proben, Beladen des Gels und Abschluss des Vorgangs

Die Proben wurden mit einem Gellade-Puffer vermischt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht und zentrifugiert, um das Kondenswasser zu entfernen. Die Proben wurden sodann auf Eis gestellt. Je Probenkammer wurden 10-20 µg Proteinlysate aufgetragen. Zunächst liefen dabei die Proben durch das Sammelgel mit einer Spannung von 80 V. Sobald die Proteine durch das Gel gelaufen sind, wurde die Spannung auf 120 V für ca. 90 min erhöht, bis die Laufbande den untersten Teil des Gels erreicht hat.

4.2.6. Western-Blot

Als nächster Schritt nach der SDS-PAGE folgt der Western-Blot, indem die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen wurden. Ziel ist es, das Auftrennungsmuster, das durch die SDS-PAGE entstanden ist, auf eine Transfermembran zu übertragen, um diese in den folgenden Schritten optisch darzustellen. Die Proteine sind durch polare und ionische Wechselwirkungen bei Nitrocellulose an der Transfermembran fixiert. Das SDS wird in diesem Arbeitsschritt ausgewaschen. Um den Transfer zu beginnen, wurde das Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dafür wurde vorher die Membran und zwei Whatman-Filterpapiere in Western-Blot-Puffer aufgeweicht. Das Gel wurde von der Glasplatte gelöst und auf die Nitrocellulosemembran übertragen und luftbläschenfrei mit dem Filterpapier und Watte geschichtet. Danach wurde dieser Verbund in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Puffer aufgefüllt. Um eine Überhitzung zu vermeiden, wurde die Kammer in Eis gestellt. Der Western-Blot lief bei einer Spannung von 30 V über Nacht. Nach Beendigung des Blot wurde die Nitrocellulosemembran mit destilliertem Wasser abgewaschen und mit Poceaus S-Färbung für ein paar Minuten inkubiert, damit die Proteine und deren Auftrennung sichtbar wurden. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde in 5 % Magermilchpulver mit TBS-T (Block-Puffer) geblockt, damit unspezifische Bindungen blockiert wurden und Antikörper nicht einfach an die Membran binden. Im nächsten Schritt wurde der Block-Puffer entfernt und die Membran wurde dreimal jeweils 5 min mit TBS-T gewaschen. Der primäre Antikörper, welcher auf der Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde, ist ein proteinspezifischer Antikörper, der an das Ziel Epitop des gesuchten Proteins bindet. Danach wurde die Membran dreimal 10 min mit TBS-T Puffer gewaschen, um die restlichen Bestandteile des Antikörpers zu entfernen. Der mit Meerrettichperoxidase gekoppelte sekundäre Antikörper bindet spezifisch an Antikörper aus bestimmten Organismen, wie z.B. Maus-Antikörper. Es wurde 1h mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Jegliche Inkubation wurde auf dem Wipptisch durchgeführt.

Die Auswertung wurde mit einer Maschine detektiert, die Lichtquanten bestimmen kann. Durch die Peroxidase des sekundären Antikörpers kann ein lichtemittierendes Produkt mit ausstrahlenden Lichtquanten entstehen. Mithilfe der Chemilumineszenz-Reaktion der Lösung von Milipore Immobilion Western wurde die Auswertung durchgeführt. Abhängig von der Signalintensität wurde die Expositionsdauer bestimmt. Diese kann zwischen 10 Sekunden und mehreren Minuten liegen. Die Detektion erfolgt im Fujifilm LAS-3000 Imager und wird mittels LAS 3000 Image Reader ausgewertet. Weitere Bearbeitung der Western-Blot Bilder erfolgt in PowerPoint.

4.3. Molekularbiologische Methoden

4.3.1. Allgemeine Methoden zur Arbeit mit DNA

Für die allgemeine Arbeit mit DNA ist es hilfreich, wenn konkrete Bedingungen bekannt sind, z.B. die Konzentration von Plasmid und Insert, die Anzahl an Basenpaaren etc. Die Konzentration kann mithilfe des NanoDrop One-Micro-UV/Vis-Spektralphotometer bestimmt werden. Das Gerät kann die Konzentration von doppelsträngiger-, einzelsträngiger-DNA und RNA nachweisen. Dabei kann die Konzentration in ng/µl gemessen werden und das Reinheitsverhältnis wird über den Quotienten der Absorption bei 260nm und 280nm bestimmt. Abhängig vom Extinktions-Wert kann die Reinheit der DNA kontrolliert werden. Um die Konzentration und weitere Nachweise feststellen zu können, wurde die Oberfläche des NanoDrop vor der eigentlichen Messung der DNA mit H₂Odd neutralisiert. Anschließend wurde nach der Anleitung des Herstellers die Konzentration und das Reinheitsverhältnis der vorliegenden DNA gemessen.

4.3.2. Primer-Design

Wenn ein bestimmter Abschnitt einer DNA repliziert werden soll, verwendet man Primer, die auch als Oligonukleotide bezeichnet werden. Diese haben die Aufgabe den zu replizierenden Abschnitt einzugrenzen. Die DNA verläuft in 5' → 3'-Richtung und jeder Abschnitt hat bestimmte Eigenschaften, die berücksichtigt werden müssen, um ein optimales Ergebnis zu erreichen. Der Primer hat eine optimale Länge von 18-30 Nukleotiden. Die Schmelztemperatur, die spezifisch für den nächsten Schritt, der Polymerasen-Kettenreaktion wichtig ist, liegt über 60 °C. Die sogenannte Hybridisierungstemperatur, wo der Primer am besten binden kann, sollte nicht über 72 °C liegen und keine größere Differenz als 5 °C zur Schmelztemperatur haben. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Menge von Guanin und Cytosin in dem Primer. Ein optimaler Gehalt ist 40-60 % (Thermo Fisher Scientific). Bei den jeweiligen Endigungen wurde die Reihenfolge und die Anzahl der Basenpaare berücksichtigt. Außerdem wurde hinsichtlich der Sekundärstruktur die Reihenfolge überprüft, so dass es zu keiner Hybridisierung mit sich selbst oder mit einem anderen Primer kommen kann. Somit wurde die „DNA-Hairpin“ (Haarnadelschleife) und auch „Dinukleotid-repeats“ (Dinukleotid-Wiederholungen) vermieden.

4.3.3. Amplifizierung mit Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine semikonservative Methode, um DNA in vitro zu vervielfältigen. Mithilfe eines selbstgewählten Primers kann der Abschnitt, der vervielfältigt werden soll, bestimmt werden. Die Polymerasekettenreaktion kann in drei Schritte unterteilt werden. Der erste Schritt ist die Denaturierung, bei der die DNA auf 98 °C erhitzt wird, damit der Doppelstrang denaturieren und zwei Einzelstränge entstehen können. Während des zweiten Schrittes, der Hybridisierung, lagern sich bei ca. 60 °C spezifische Primer komplementär

am 3'-Ende an. Der letzte Schritt ist die Polymerisation, die bei einer Temperatur von 72 °C abläuft. Am Primer lagern sich weitere Basen komplementär zum DNA-Strang von 3' nach 5' an. Dieser Prozess kann mehrere Zyklen durchlaufen. Durch die Wiederholung steigt die Menge der vervielfältigten DNA exponentiell an. Die PCR lief im T3 Thermocycler (Whatman, Biometra) ab. Für die PCR-Reaktion wurde die Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase verwendet. Ein Vorteil der Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase ist, dass es zu einer höheren Ausbeute bei einer verkürzten Extensionszeit kommt. Die Amplifikation ist robuster und die Polymerase kann für alle PCR-Anwendungen verwendet werden, wo eine hohe Genauigkeit und eine längere Amplifikation nötig ist. Der PCR-Ansatz in diesem Fall:

Komponente	20 µl Reaktion
Nuclease-freies Wasser	bis 20 µl
5X Phusion HF	4 µl
10 mM dNTPs	0.4 µl
10 µM Forward Primer	1 µl
10 µM Reverse Primer	1 µl
Template DNA	10 ng
DMSO (optional)	(0,6 µl)
Phusion DNA Polymerase	0,2 µl

Das PCR-Programm wurde nach den unten genannten Angaben eingestellt:

Step	Temp.	Zeit
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sek
40x Denaturierung	98 °C	5 sek
Hybridisierung 1.	60 °C	60 sek
2.	72 °C	60 sek (15-30sek per kb →2,5 kb)
3.	72 °C	30 sek
Finale Amplifikation	72 °C	5 min
Hold	4 °C	

Nachdem die PCR durchgelaufen ist, wurde die DNA im Agarosegel aufgereinigt.

4.3.4. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Um DNA so gut wie möglich verdauen zu können, wurden Restriktionsendonukleasen verwendet. Das sind kleine Proteine, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen können und an dieser Stelle schneiden. In diesem Fall wurden Restriktionsendonukleasen des Typ II verwendet. Sie schneiden genau an der palindromischen Erkennungssequenz, die im Schnitt 4-8 Basenpaaren lang ist. Im Vergleich zu den anderen Klassen benötigen die Restriktionsenzyme des Typ II kein zusätzliches ATP oder zusätzliche Methyltransferase-Aktivität. Folglich gehören diese

Restriktionsenzyme zu der Klasse, welche in einer kurzen Zeit ein präzises Ergebnis erreichen können.

Um einen optimalen Verdau von DNA zu gewährleisten, wurden die Restriktionsendonukleasen mit einem Puffer versetzt. Es wurde „CutSmarter with Restriction Enzymes from NEB“ verwendet. Damit die zerschnittene DNA sich mit ihren eigenen Enden nicht wieder verknüpft (Selbstligierung), wurden die „sticky ends“ dephosphoryliert. Somit kann durch eine Hydrolyse der 5'-Ende die Esterbindung zur Phosphatgruppe aufgelöst werden. Hierfür wurde die Antarctic Phosphatase von NEB die aus einer Phosphatase und dem passenden Puffer besteht, verwendet. Des Weiteren wurde noch 100x ZnCl₂ hinzugefügt, um eine höhere Aktivität der DNA-Teile zu gewährleisten, die durch das Hinzufügen von Zn²⁺ noch verstärkt aktiviert wird. Für den Verdau von DNA wurde folgender Ansatz verwendet:

DNA	1 µg
10X NEBuffer 3.1	2 µl (1X)
XhoI	1,0 µl (or 10 units)
NotI	1 µl (or 10 units)
Antarctic Phosphatase	2 µl
Buffer Phosphatase	2 µl
ZnCl ₂	0,1 mM
Nuclease-freies Wasser	Bis zu 20 µl

Der Ansatz wurde für mindestens 3 Stunden oder auch über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend mithilfe einer Gel-Elektrophorese analysiert.

4.3.5. Auftrennung von DNA im Agarosegel

Nachdem die gewünschte DNA verdaut wurde, kann diese in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Das Agarosegel wird verwendet, um DNA in ihrer Größe und Länge aufzutrennen, zu visualisieren und bei Bedarf zu extrahieren. Während einer Gel-Elektrophorese wird ein elektrisches Feld aufgebaut und die negativ geladene DNA kann zum Pluspol laufen. Kürzere DNA-Abschnitte bewegen sich durch ihr niedrigeres Gewicht schneller zum positiv geladenen Feld als die längeren Fragmente. In diesem Fall wurde für die Gel-Elektrophorese ein 0,8 % Agarosegel verwendet. Dafür wurden 100 ml TAE-Puffer und 0,8 gr Agarose vermischt und erhitzt bis eine klare Flüssigkeit entstanden ist. Anschließend wurde die Flüssigkeit in einer Gelbox verteilt und ca. 20 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Dadurch wird während der Beleuchtung mit UV-Licht eine bessere Visualisierung der Banden im Agarose-Gel gewährleistet. Anschließend wurde der Taschenkamm eingesetzt und das Gel abgekühlt. Als das Gel ausgehärtet war, wurden die Proben aufgetragen. Diese Proben wurde mit 6x Ladepuffer (NEB, Frankfurt) versetzt und auf das Gel aufgetragen, das sich in einem 1x TAE-Puffer befand. Als Marker diente

ein 1 kbp-DNA-Leiter. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt. Als die Laufbande kurz vor dem Ende war, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel unter einem UV-Transiluminator analysiert. Durch das UV-Licht wurden die DNA-Banden auf dem Agarosegel sichtbar.

4.3.6. Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Die Agarose-Gelelektrophorese wird ebenfalls dafür verwendet, um gewünschte DNA-Abschnitte aus dem Gel zu extrahieren. In diesem Fall wurde das Gel nur kurzen UV-Bestrahlungen ausgesetzt, da durch längere Bestrahlung eine höhere Gefahr für DNA-Schäden besteht. Mithilfe eines Plastikausstechers konnten die gewünschten Banden extrahiert werden. Anschließend wurde das ausgestochene Produkt mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen aufgereinigt und die gewünschte Nucleinsäure rückgewonnen. Die Aufreinigung erfolgt nach Anleitung des Herstellers.

4.3.7. Ligation

Als nächster Schritt wurde die Ligation durchgeführt, wobei der jeweilige DNA-Abschnitt in ein dephosphoryliertes Plasmid eingefügt wurde. Während der Ligation können die einzelnen Abschnitte miteinander enzymatisch verknüpft werden. Dafür wird das 3´Hydroxy-Ende mit dem 5´-Phosphat-Ende der DNA-Segmente verbunden. Für diesen Versuch wurde die T4-Ligase von NEB verwendet. Die T4-Ligase ist eine ATP-abhängige Ligase und kann im Vergleich zu anderen Ligasen auch DNA-Enden mit kleinen Unstimmigkeiten („mismatch“) und mit keiner vollständigen Komplementarität miteinander verknüpfen. Abhängig von der DNA-Konzentration der einzelnen Komponente wurde in unterschiedlichen Mischverhältnissen die Ligationslösung (1:2,1:3, 1:5, 1:7) zusammengesetzt. Bei einem 20 µl Reaktionsansatz wurde zusätzlich 1 µl T4 DNA-Ligase und 2 µl T4-DNA-Puffer hinzugefügt.

4.3.8. DNA- Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde durch das Unternehmen StarSeq in Mainz durchgeführt. Es wurde jeweils 500 ng/ml DNA und 10 µM der entsprechenden Primer zur Sequenzierung abgegeben.

4.4. Mikrobiologische Methoden

4.4.1. Bakterientransformation

Unter einer Bakterientransformation versteht man die nicht-virale Übertragung einer frei zugänglichen DNA in eine kompetente Bakterienzelle. In diesem Fall wurden E.coli DH5α verwendet. In ihrer Struktur sind sie so mutiert, dass sie eine maximierte Transformationseffizienz besitzen. Die eingeschleuste DNA kann in den Bakterien in großen Mengen vervielfältigt und

in einem späteren Schritt isoliert werden. Dafür wurde 0,1 µg der Plasmid-DNA zu kompetenten E.coli DH5α hinzugefügt und durch Anklopfen des Eppendorfer-Gefäß vermischt. Die Suspension wurde für 20 min auf Eis und anschließend für eine Minute bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Danach folgte eine weitere Inkubation von 2 min auf Eis. Es wurde 400 µl LB-Medium hinzugefügt und für eine Stunde bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert. 50 µl der Lösung wurde auf Platten mit LB-Medium und Ampicillin verteilt, da die eingeschleuste DNA eine Ampicillin-Resistenz codiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Tag darauf wurden die Platten auf Bakterienkolonien überprüft. Die gewünschten Kolonien wurden extrahiert und für die weiteren Schritte der Isolierung von Plasmid-DNA verwendet.

4.4.2. Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Für die Plasmidisolation wurde das High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche AppliedScience, Mannheim) verwendet. Die Handhabung wurde mithilfe der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurden die vorherigen Arbeitsschritte überprüft, indem das Plasmid mit gewünschten Restriktionsendonukleasen verdaut wurde und ein 0,8%iges Agarosegel mit diesen Proben und einer Kontrollprobe gelaufen ist.

4.4.3. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Für die Maxi-Präparation wurde das Endotoxin-free Plasmid DNA Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die Präparation wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Im Vergleich zu einer Mini-Präparation wird eine größere Menge an Plasmid-DNA benötigt, um eine erhöhte Menge an DNA gewinnen zu können.

5. Ergebnisse

5.1. Transiente Transfektion von pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 in CHO 13-5-1 und die Endozytose von tPA

Um die Aufnahme von tPA durch den Minirezeptor pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 überprüfen zu können, wurde der verkürzte LRP1-Rezeptor transient in CHO 13-5-1-Zellen transfiziert. Im Vergleich zu CHO K1-Zellen, die den LRP1-Rezeptor integriert haben, besitzen CHO 13-5-1-Zellen das Genom für LRP1 nicht. Dementsprechend wurden CHO K1-Zellen als Positivkontrolle und CHO 13-5-1-Zellen als Negativkontrolle bei der transienten Transfektion verwendet (Salicioni et al. 2002).

Die transiente Transfektion fand mithilfe von Polyethylenimin (PEI) statt. Der Vektor war das Plasmid pcDNA3.1(+) LRP1_CR10. Anschließend wurde das Endozytoseexperiment ausgeführt, indem zu den am vorherigen Tag transfizierten Zellen tPA hinzugefügt wurde. Die Zellen wurden lysiert. Zur Konzentrationsbestimmung des Lysats wurde eine BSA-Standardreihe angefertigt.

Das Lysat wurde auf das Plasmid pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 und auf tPA untersucht. Es wurde bei einer Proteinkonzentration von 40 µg/µl dargestellt, dass pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 von CHO 13-5-1 aufgenommen wurden (13-5-1+ tPA). Auf einer Bandenhöhe von 96 kDa kann LRP1 detektiert werden. Unterhalb dieser Bande kann der Endozytoseversuch nachgewiesen werden, da tPA eine Bandenhöhe bei ca. 69 kDa hat. Die Ladekontrolle befindet sich auf einer Höhe von 55 kDa und wird durch den monoklonalen Maus-anti- α -tubulin-Antikörper dargestellt. Es ist zu erwarten dass die transfizierten CHO 13-5-1-Zellen und die positive Kontrolle CHO K1-Zellen tPA aufnehmen können.

Anhand dieser Feststellung wurde gezeigt dass auch die transiente Transfektion gelungen ist (13-5-1 transfected). An der positiven Kontrolle kann man feststellen dass LRP1 vorhanden ist (CHO K1) und dass dieser ebenfalls tPA aufnehmen kann (CHO K1+ tPA).

Die negative Kontrolle besitzt keine Banden auf Höhe von LRP1.

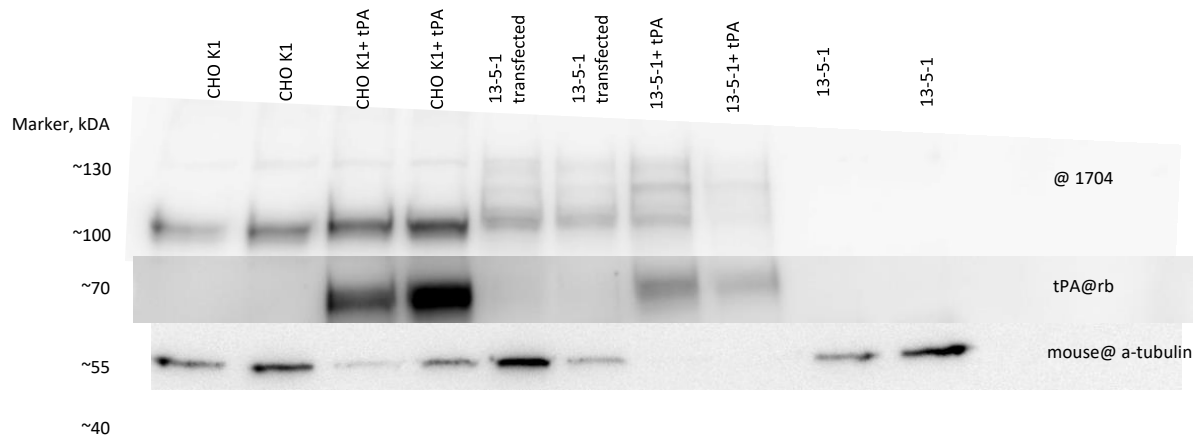


Abbildung 3: Transiente Transfektion von pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 in CHO 13-5-Zellen und Endozytose von tPA. Nach der transienten Transfektion und Endozytose wurden die Zellen lysiert. Bei einer Konzentration von 40 µg/µl wurde das Lysat in einem 10%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. CHO K1-Zellen und CHO 13-5-1-Zellen dienen als Kontrolle. Bei beiden Kontrollen fand die Endozytose mit tPA statt. Als primärer Antikörper wurde für pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 1704 (1:10 000 in 5%iger Milch in TBS-T), für tPA tPA-anti-Hase (1:10 000 in 5%iger Milch in TBS-T) und für α-Tubulin α-Tubulin-anti-Maus (1:10 000 in 5%iger Milch in TBS-T) verwendet. Der sekundäre Antikörper für LRP1 und tPA war Ziege-Anti-Hase (1:10 000 in 5%iger Milch in TBS-T) und bei α-Tubulin war der sekundäre Antikörper Esel-Anti-Maus (1:10 000 in 5%iger Milch in TBS-T). Die Bande, welche einen Teil von LRP1 detektiert ist bei ca. 96 kDa, für tPA bei ca. 69 kDa zu finden. α-Tubulin, das als zelluläre Kontrolle dient, liegt bei 55 kDa.

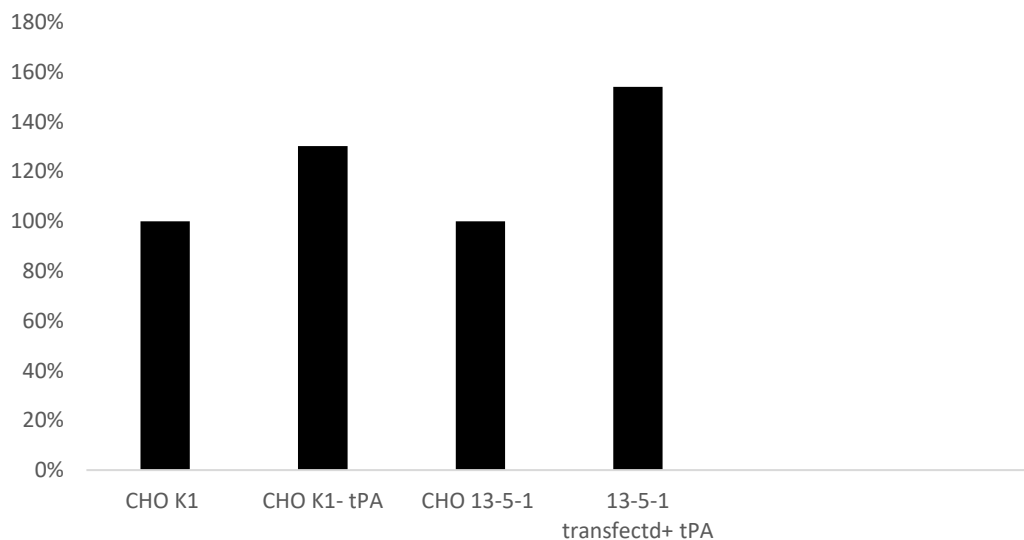


Abbildung 4: Intensitätsverhältnis von der Endozytose bei CHO K1-Zellen und bei mit pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 transfizierten CHO 13-5-1-Zellen. Anhand der prozentualen Verteilung in diesem Graphem kann man sehen, dass CHO K1-Zellen im selben Versuchsablauf durchschnittlich 30 % und mit dem Plasmid transfizierten CHO 13-5-1- Zellen 54 % aufgenommen haben. Folglich wurde eine um 24 % höhere Aufnahme bei den transfizierten CHO 13-5-1-Zellen festgestellt.

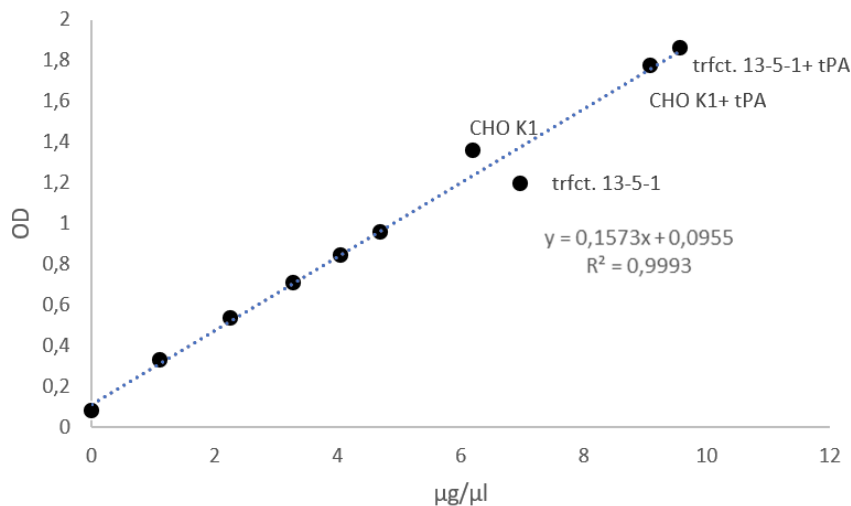


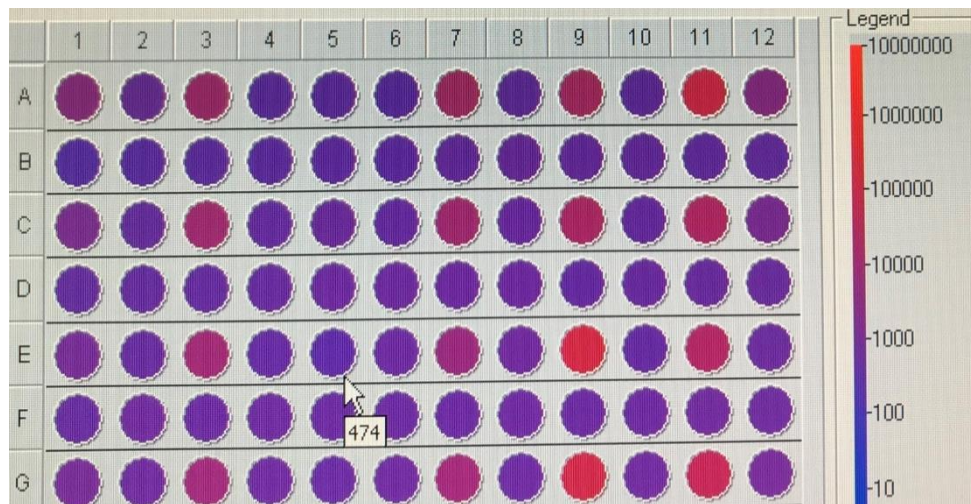
Abbildung 5: Endozytoseintensität von CHO K1-Zellen mit tPA und transfizierte 13-5-1-Zellen mit tPA im Verhältnis zur Standardabweichung

5.2. Aktivierung und Endozytose von $\alpha 2M$

Ein weiteres Endozytoseexperiment wurde mit $\alpha 2M$ durchgeführt. Zunächst wurde das Endozytoseexperiment mit CHO K1-Zellen durchgeführt. Es war zu erwarten, dass CHO K1-Zellen $\alpha 2M$ aufnehmen würde (Nielsen, M.S. et al. 1995). Dafür wurde 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FITC-labeled human $\alpha 2M$ mit 600 μl Alpha-MEM Medium für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen lysiert und die Proteinkonzentration mit einem BCA-Proteinkonzentrationsbestimmung die Konzentration vom Lysat bestimmt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität bestimmt. In diesem Fall fand keine Internalisierung statt.

Da das Endozytoseexperiment zunächst nicht funktioniert hat, wurde das FITC-labeled $\alpha 2M$ mit Methylamin aktiviert (Ashcom et al. 1990). Dafür wurde mithilfe von NaOH der pH-Wert der $\alpha 2M$ -Lösung auf 8,0 titriert und anschließend dialysiert. Um die Aktivität zwischen $\alpha 2M$ und pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 zu überprüfen, wurden CHO 13-5-1-Zellen mit dem Plasmid transient transfiziert. $\alpha 2M$ wurde zu den transfizierten CHO 13-5-1-Zellen und CHO K1-Zellen hinzugegeben. In diesem Durchlauf wurde serumfreies DMEM-Medium ohne Phenolrot verwendet, um eine höhere Fluoreszenz zu erhalten. Dieses Medium beinhaltetete 0,2 % BSA, damit unspezifische Bindungen blockiert werden konnten. Zudem wurde zu dem aktivierten $\alpha 2M$ 100 μM Chloroquine hinzugefügt, um die lysosmale Aktivität einzuschränken. Zu diesem Ansatz wurde noch 1,8 gefaltetes Trypsin hinzugefügt (Herz und Strickland 2001). Dieser Ansatz wurde ebenfalls für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend mit PBS, dem 10 IE/ml Heparin hinzugefügt wurde, lysiert. Die Proteinkonzentration wurde erneut bestimmt und danach die Fluoreszenzintensität ausgewertet. Die Auswertung ergab, dass die mit pcDNA3.1(+)

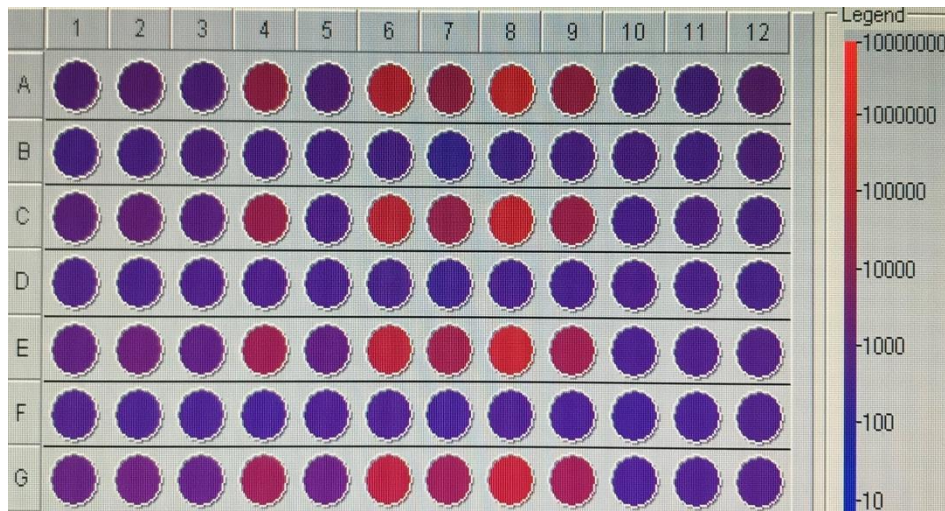
LRP1_CR10 transfizierten Zellen kein α 2M aufnehmen. CHO K1-Zellen konnten α 2M aufnehmen. Außerdem wurde auch sichtbar, dass der durchschnittliche Messwert der Fluoreszenz sich von der α 2M-Konzentration unterscheidet.



Feld	Probe	Durchschnittlicher Messwert
CHO K1 50 μ g	A1, C1, E1, G1	2,108
CHO K1-Überstand	A3, C3, E3, G3	10,645
CHO K1+ α 2M 50 μ g	A5, C5, E5, G5	712,25
CHO K1 + α 2M-Überstand	A7, C7, E7, G7	12,709.25
Input 500 μ g α 2M	A9, C9, E9, G9	136,095
Input 50 μ g α 2M	A11, C11, E11, G11	62,255

Abbildung 6 & Tabelle 1:

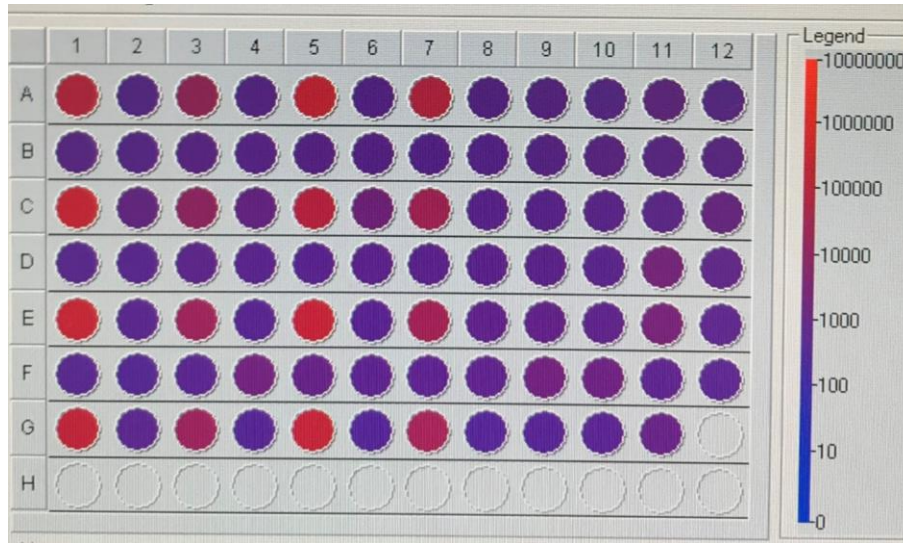
Endozytoseexperiment mit α 2M und CHO K1-Zellen. Anhand der Tabelle ist zu erkennen, dass zunächst keine Endozytose von CHO K1-Zellen stattgefunden hat. Dies kann man in der siebten Spalte erkennen. Die 9. und 11. Spalte zeigen eine fluoreszierende Aktivität. Die Fluoreszenz ist im Allgemeinen sehr unregelmäßig.



Probe	Feld	Durchschnittlicher Messwert
1. Transfizierte CHO 13-5-1	A1, C1, E1, G1	1.471,5
2. Überstand (DMEM)	A2, C2, E2, G2	2.020,75
3. Transfizierte CHO 13-5-1 + α 2M 10 μg	A3, C3, E3, G3	1.287,25
4. Überstand	A4, C4, E4, G4	21.642,5
5. Transfizierte CHO 13-5-1 + α 2M +Trypsin 50 μg	A5, C5, E5, G5	1.411,5
6. Überstand	A6, C6, E6, G6	92.836,5
7. CHO K1 + α 2M	A7, C7, E7, G7	23.214
8. Überstand α 2M + Trypsin 50 μg	A8, C8, E8, G8	175.912
9. α 2M + Trypsin 20 μg	A9, C9, E9, G9	23.983,25

Abbildung 7 & Tabelle 2:

Endozytoseversuch mit α 2M und CHO K1-Zellen und CHO 13-5-1-Zellen. Man kann in der dritten und fünften Spalte der Tabelle erkennen, dass es bei den transfizierten CHO13-5-1-Zellen zu keiner Endozytose von α 2M trotz unterschiedlicher Konzentrationen gekommen ist. Die siebte Spalte stellt dar, dass CHO K1 α 2M aufnehmen kann und die achte Spalte weist nach, dass im Medium ebenfalls α 2M vorhanden war. An der vierte, sechsten, achten und neunten Spalte wird deutlich, dass die Konzentrationsänderung von α 2M mit dem durchschnittlichen Messwert der Fluoreszenz korreliert. Durch das Ersetzen von Alpha-MEM Medium durch DMEM-Medium, welches kein Phenolrot enthält, ist es zu einer gleichmäßigen und kontrollierbaren Fluoreszenz gekommen.



Probe	Feld	Durchschnittlicher Messwert
1.Überstand (DMEM) 50 μg $\alpha 2M$	A1, C1, E1, G1	91 241,5
2.Transfizierte CHO 13-5-1 mit pcDNA	A2, C2, E2, G2	873,75
3.Überstand (DMEM) 10 μg $\alpha 2M$	A3, C3, E3, G3	19 679,25
4.Transfizierte CHO 13-5-1 mit pcDNA	A4, C4, E4, G4	891,25
5.Überstand (DMEM) 100 μg $\alpha 2M$	A5, C5, E5, G5	218 684,25
6.Transfizierte CHO 13-5-1 mit pcDNA	A6, C6, E6, G6	1237,25
7. 20 μg $\alpha 2M$	A7, C7, E7, G7	48 049,5

Abbildung 8 und Tabelle 3:

Kontrolle des Endozytoseexperiment mit $\alpha 2M$ und mit pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 transfizierte CHO 13-5-1-Zellen. Anhand der Tabelle und der Messtabelle für Fluoreszenz wird nochmals verdeutlicht, dass die mit pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 transfizierten CHO 13-5-1-Zellen, kein $\alpha 2M$ aufnehmen können. Der durchschnittliche Messwert wird immer größer, je größer die Konzentration von $\alpha 2M$ wird.

5.3. Amplifikation von pcDNA3.1(+)-LRP1_CR10

Um weitere Versuch durchführen zu können, wurde das Plasmid pcDNA3.1(+)-LRP1_CR10 mithilfe von E.coli DH5α vervielfältigt.

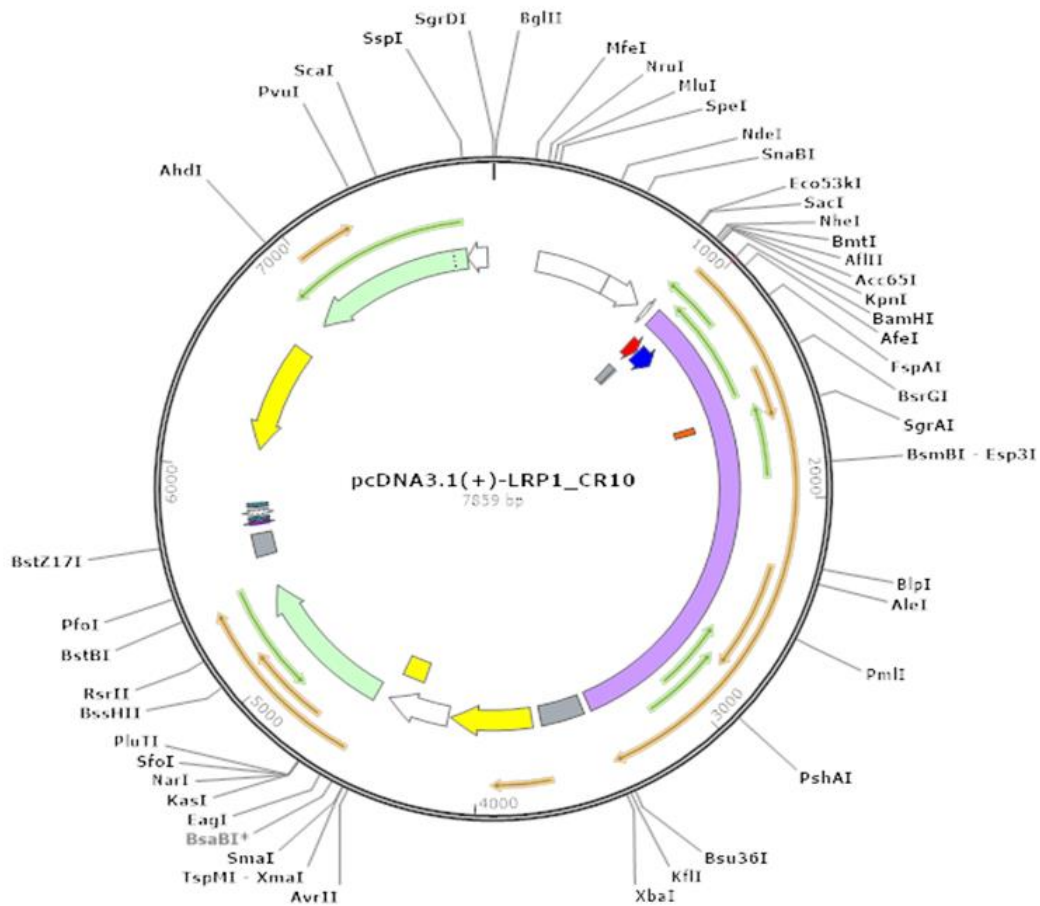


Abbildung 9: Das Plasmid pcDNA3.1 (+) LRP1_CR10. Das ganze Plasmid besitzt eine Größe von 7859 bp. Der Abschnitt, welcher die verkürzte Form der Domäne IV des LRP1-Rezeptors enthält, ist lila gekennzeichnet und besitzt eine Größe von 2499 bp.

Das Plasmid wurde in kompetente E.coli DH5α transformiert. Die kompetenten Bakterien konnten auf einer Agarplatte, die aus LB-Medium mit Ampicillin bestand, ausgesät werden. Die entstanden Kolonien wurden gesammelt, isoliert und aufgereinigt. Das vervielfältigte Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen KpnI und XbaI verdaut und mithilfe der Gelelektrophorese aufgereinigt. Diese Ergebnisse vom verdauten Plasmid sind in der Abbildung 10 zu erkennen. Man kann erkennen, dass das zweimal verdaute Plasmid jeweils eine Bande bei ca. 2.5 kb und ca. 5 kb besitzt. Das einmalig verdaute Plasmid besitzt eine Bandenhöhe von etwas weniger als 8 kb. In der jeweils unverdauten Form sind die drei unterschiedlichen Konformationen eines Plasmids zu erkennen.

	Probe 1	Probe 2
ng/µl	481,0	1297,2
A260/280	1,89	1,85
A 260/230	2,15	2,17

Tabelle 4: Konzentration und Reinheit vom amplifizierten pcDNA3.1(+) LRP1_CR10-Plasmid

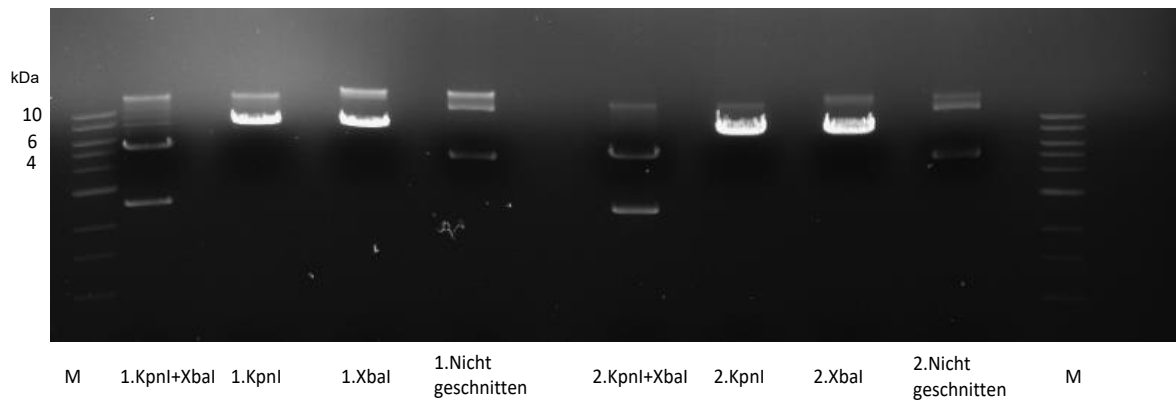


Abbildung 10: Der Verdau von pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 mit XbaI und KpnI. Um den Verdau darzustellen, wurde 500 ng vom Plasmid verwendet und auf einem 0,8 % Agarosegel dargestellt. Dabei wurde das Plasmid einmalig (1.KpnI, 1.XbaI, 2.KpnI, 2.XbaI), zweimalig (1. KpnI+ XbaI, 2. KpnI+ XbaI,) und gar nicht verdaut (1.Nicht geschnitten, 2.Nicht geschnitten) Als Marker wurde ein 1 kb DNA-Marker verwendet.

5.4. Umklonierung von pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 mit dem Vektor pLBCX

Für eine transiente und auch stabile Transfektion in Zellen wurde pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 aus seinem ursprünglichen Vektor entnommen und in den retroviralen pLBCX-Vektor umkloniert. Dieser ist für die Expression der DNA in der Zielzelle zuständig. Zunächst wurden Restriktionsstellen ermittelt, die kompatibel zum Plasmid und zu pLBCX-Vektor waren. In diesem Fall wurden passende Primer generiert, sodass sich die Schnittstellen XhoI und NotI am besten angeboten haben. Nachdem die benötigten Primer hergestellt wurden, konnte pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 durch PCR vervielfältigt werden. In dieser Zeit wurde am 5'-Ende eine Schnittstelle für XhoI und am 3'-Ende eine Schnittstelle für NotI eingefügt. Das Produkt, welches durch die PCR entstanden ist, wurde mit einem 0,8%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgereinigt und von unspezifisch entstandenen Produkten getrennt. Anschließend wurde das aufgereinigte Produkt und der Zielvektor pLBCX mit den ausgewählten Restriktionsenzymen geschnitten und ligiert. Nach der Ligation von pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 und pLBCX wurde das Plasmid in kompetenten E.coli DH5 α transformiert. Die transformierten Bakterien sind auf ampicillinhaltigen LB-Platten gewachsen. Es wurden Bakterienkolonien isoliert, aufgereinigt und anschließend sequenziert. Das Plasmid wurde in einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt. Das ligierte Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI und NotI geschnitten, so dass auf dem Agarosegel zwei Banden auf einer Höhe von ca. 2,5 kb und ca. 5 kb zu erwarten waren. Diese Banden waren auf dem Agarosegel auf dieser Höhe zu erkennen (s. Abbildung 11 und 12).

ng/ μ l	4201,3
<hr/>	
A260/ 280	1,92
<hr/>	
A 260/230	1,84

Tabelle 5: Konzentration und Reinheit vom Plasmid pLBCX+pcDNA3.1(+) LRP1_CR10

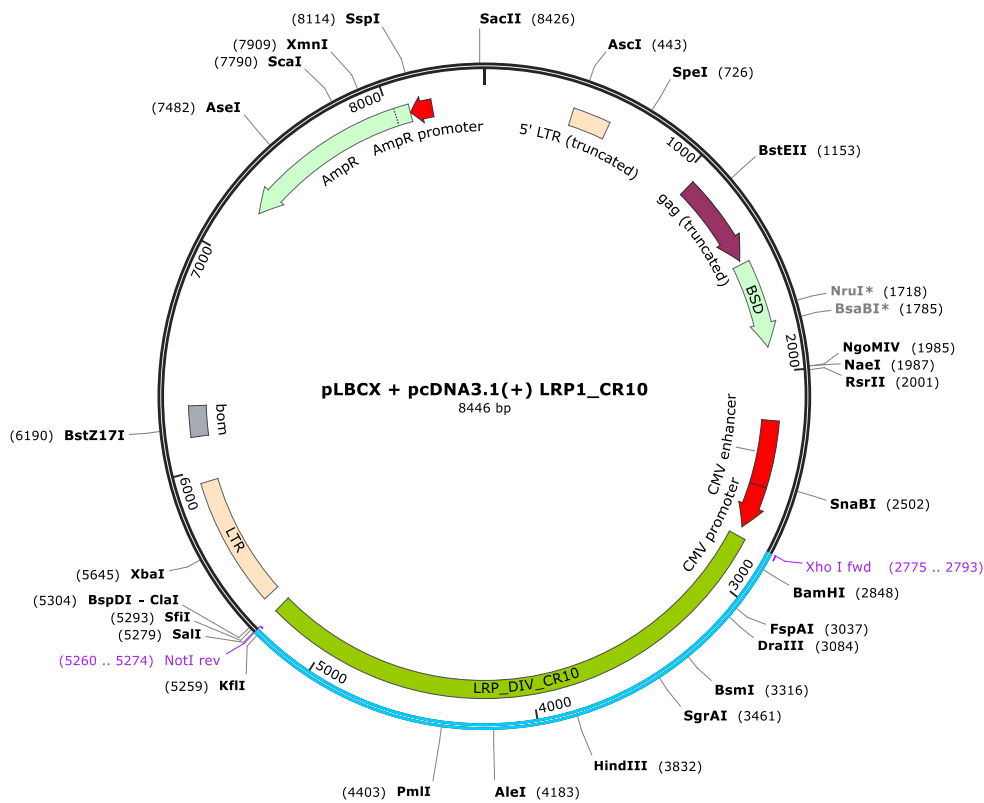


Abbildung 11: Das ligierte Plasmid pLBCX + pcDNA(+)-LRP1_CR10. Das vollständige Plasmid besitzt eine Größe von 8446 bp. Der Vektor pLBCX hat eine Größe von 5947 bp. Der grün/ blau markierte Abschnitt ist die DNA pcDNA3.1(+)-LRP1, die eine Größe von 2499 bp hat. Die lila markierten NotI rev und XhoI fwd, sind die eingefügten Schnittstellen.

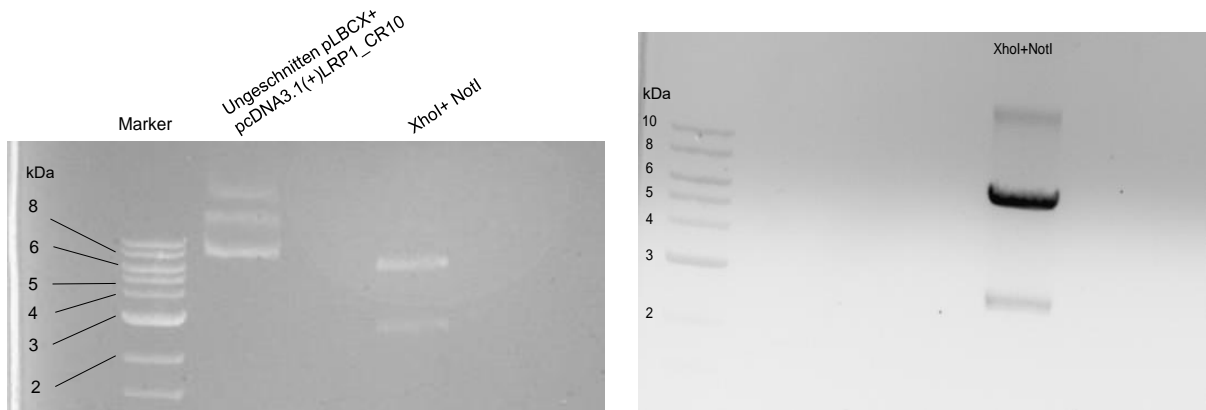


Abbildung 12: Nach der Ligation wurde 500 ng der DNA auf einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt. Beide Gele zeigen pLBCX und pcDNA3.1(+)-LRP1_CR10. Als Kontrolle dient im linken Gel die ungeschnittene Form, die eine Bandenhöhe von ca. 8,5 kb hat. Die DNA wurde mit XhoI und NotI geschnitten, diese DNA besitzt zwei Fragmente jeweils auf der Höhe von, ca.6 kb und ca. 2,5 kb.

5.5. Blastocidin-Selektion

Im folgenden Versuch wurde die Konzentration der Antibiose Blastocidin bestimmt, die für die Selektionierung der stabil transfizierten Zellen essenziell ist. Um die korrekte Konzentration zu bestimmen, wurden in einer 6-Loch-Schale jeweils 600.000 CHO 13-5-1-Zellen pro Schale ausgesät und mit unterschiedlichen Blastocidin-Konzentrationen behandelt. Nach 10 Tagen wurde anhand der Mortalität, die passende Konzentration gewählt. In diesem Fall wurde eine Konzentration von 4 µg/ml gewählt.

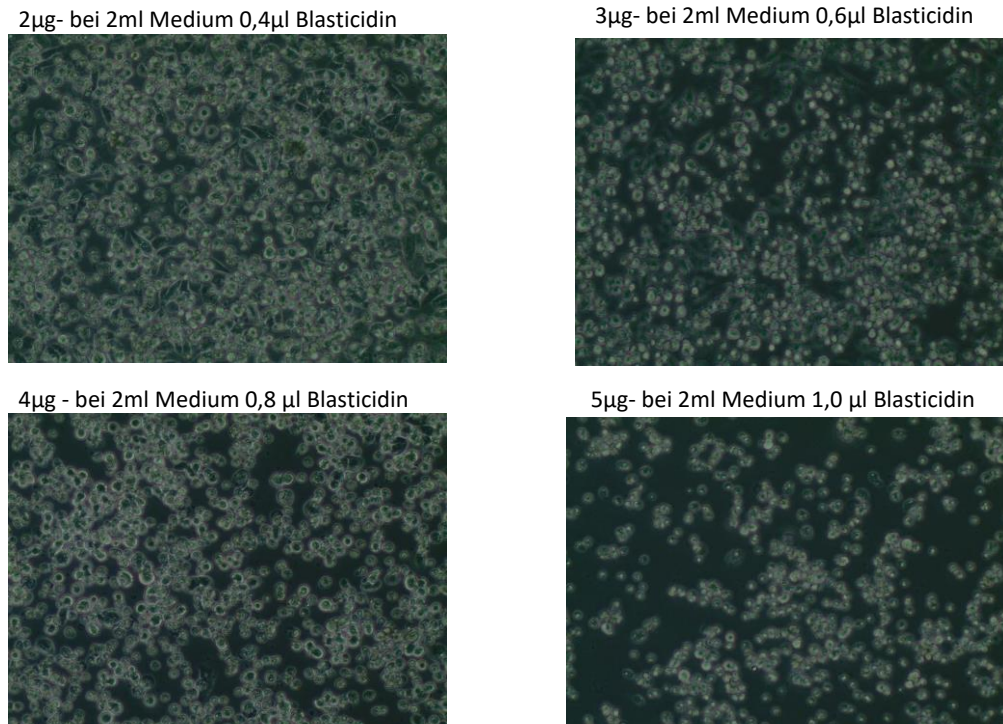


Abbildung 13: Blastocidin-Selektion von CHO 13-5-1-Zellen bei einer Dichte von ca. 80%. Die Abbildungen zeigen, dass es eine unterschiedliche Mortalität bei unterschiedlicher Konzentration gibt.

5.6. Stabile Transfektion

Nachdem die korrekte Blastocidin-Konzentration bestimmt wurde und die Umklonierung von pcDNA3.1 (+) LRP1_CR10 in den pLBCX-Vektor erfolgreich durchgeführt wurde, konnte die stabile Transfektion stattfinden. Diese wurde, wie bereits im Methodenteil 4.1.2. beschrieben, durchgeführt. Parallel zu dieser Durchführung wurde derselbe Versuch mit pLBCX+LRP1 mit GFP als Kontrolle durchgeführt. Der Durchlauf mit LRP1+GFP konnte als Zwischenkontrolle der stabilen Transfektion verwendet werden.

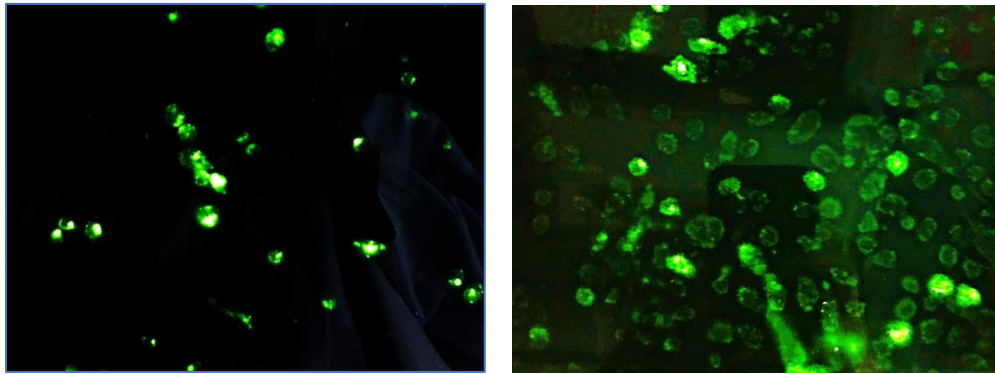


Abbildung 14: Stabile Transfektion mit LRP1+GFP (1,1 µg/µl). Anhand der Bilder kann man erkennen, dass eine Internalisierung der DNA in CHO 13-5-1-Zellen stattgefunden hat, da diese eine grüne Fluoreszenz abgeben. Folglich wurde durch diesen Ablauf der Versuchsaufbau der stabilen Transfektion überprüft.

Im nächsten Schritt wurden die transfizierten Zellen mit 4 µg/ml Blasticidin selektioniert. Anschließend wurde die Konzentration vom Zelllysat mithilfe der Standardreihe bestimmt und auf pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 untersucht. Mit einer Proteinkonzentration von 40µg/µl wurde die stabile Transfektion dargestellt und es wurde nachgewiesen, dass die DNA von CHO 13-5-1-Zellen aufgenommen wurde. Auf einer Bandenhöhe von ca. 96 kDa kann LRP1 detektiert werden. Die Ladekontrolle, die in diesem Fall der monoklonale Maus-anti-α-Tubulin-Antikörper war, wurde auf einer Höhe von 55 kDa nachgewiesen. Als Kontrolle wurden CHO K1-Zellen verwendet, die integrierte LRP1-Rezeptoren besitzen und CHO 13-5-1-Zellen, die keinen LRP1-Rezeptor besitzen.

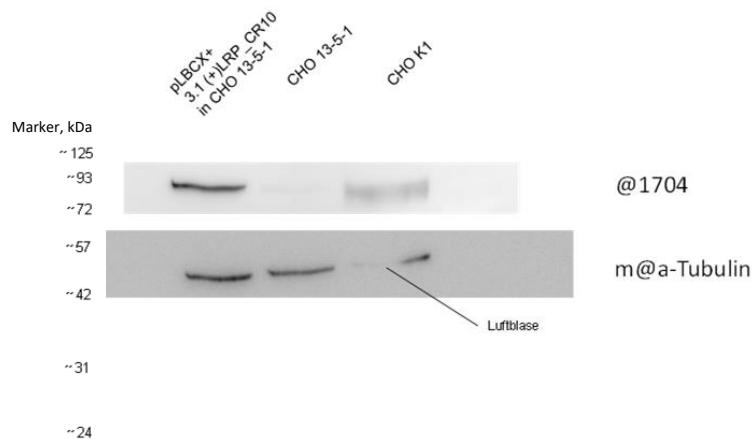


Abbildung 15: Die stabile Transfektion von pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 mit CHO 13-5-1-Zellen. Anschließend wurden die Zellen mithilfe ihrer Proteinkonzentration ausgewertet. Bei einer Konzentration von 40 µg/µl wurde das Lysat in einem 10%igen SDS-PAGE -Gel aufgetrennt. CHO K1 und CHO 13-5-1 dienen als Kontrolle. Um LRP1 zu bestimmen, wurde als primärer Antikörper 1704 (1:10 000 in 5%iger Milch in TBS-T) und als sek. AK Ziege-Anti-Hase (1:10 000 in 5%iger Milch in TBS-T) verwendet. Die Ladekontrolle war für α-Tubulin α-Tubulin-anti-Maus (1:10 000 in 5%iger Milch in TBS-T) und bei α-Tubulin war der sek. AK Esel-Anti-Maus (1:10 000 in 5%iger Milch in TBS-T). Die Bande, welche einen Teil von LRP1 detektiert, ist bei ca. 96 kDa und α-Tubulin, das als zelluläre Kontrolle dient, liegt bei 55 kDa.

6. Diskussion

Die Ausgangssituation für diese Dissertation war das bereits vorhandene Plasmid pcDNA3.1 (+) LRP1_CR10, welches eine verkürzte Form der vierten Domäne des LRP1-Rezeptors darstellt. Diese DNA wurde zunächst für eine transiente Transfektion mit CHO 13-5-1-Zellen verwendet, die ursprünglich keinen LRP1-Rezeptor besitzen (Salicioni et al. 2002). LRP1 dient als Vermittler zwischen dem extrazellulären und dem intrazellulären Raum (Willnow et al. 1994). Zu den Aufgaben von LRP1 gehört die Überwachung der Zelloberfläche, die Regulierung von Proteaseaktivität und das Übermitteln von Signalen innerhalb einer Kaskade (Bres und Faissner 2019).

Dementsprechend war das Ausgangsziel die verkürzte Rezeptorform in CHO 13-5-1-Zellen einzubringen und deren Aktivität während eines Endozytoseexperiments zu überprüfen und die Intensität der Endozytose festzustellen. Anhand des Endozytoseexperiments in den transfizierten Zellen (Abschnitt 5.1) kann man erkennen, ob eine erfolgreiche transiente Transfektion stattgefunden hat. Dieser Ablauf wurde durch die Verwendung einer SDS-PAGE und der Auswertung mit einem Western-Blot gezeigt (Abbildung 3). Mithilfe der Auswertung durch den Western-Blot konnte nachgewiesen werden, dass eine transiente Transfektion stattgefunden hat und dass die verkürzte LRP1-Form tPA aufnehmen kann. Diese Endozytose konnte die Annahme bestätigen, dass die Domäne IV ohne die Unterstützung einer weiteren Domäne den Liganden tPA aufnehmen kann (Obermoeller-McCormick et al. 2001). Durch den Vergleich der Intensität der Aufnahme von tPA bei CHO K1-Zellen und transfizierten CHO 13-5-1-Zellen wurde überprüft, ob die verkürzte Form von LRP1 und somit die Domäne IV die Hauptaufgabe trägt tPA aufzunehmen. Mithilfe der Intensitätsmessung des Western-Blot konnte festgestellt werden, dass im Vergleich transient transfizierte CHO 13-5-1-Zellen 24 % mehr an tPA aufnehmen als CHO K1-Zellen. Somit kann aus diesem Versuch der Schluss gezogen werden, dass die Domäne IV des LRP1-Rezeptors eine erhebliche Rolle für tPA spielt.

Eine weitere Annahme bezüglich α 2M sollte ebenfalls überprüft werden. Es wurde angenommen, dass α 2M nur von der Domäne IV des LRP1-Rezeptors nicht aufgenommen werden kann und dass mehrere Domänen des LRP1-Rezeptors benötigt werden, um α 2M aufzunehmen (Herz und Strickland 2001; Obermoeller-McCormick et al. 2001). Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Fluoreszenzintensität von FITC-labeled- α 2M gemessen. Dafür wurde die Endozytose von α 2M bei CHO K1-Zellen und bei pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 transfizierten CHO 13-5-1-Zellen gemessen. Dieser Versuch konnte eindeutig die Annahme beweisen, dass die ursprüngliche LRP1-Form α 2M aufnehmen kann, da die Endozytose bei CHO K1-Zellen stattgefunden hat (Abschnitt 5.2). Der Minirezeptor hat es trotz unterschiedlicher Konzentrationen von α 2M nicht geschafft diesen Liganden aufzunehmen. Folglich konnte hergeleitet werden, dass die vorausgesetzte Annahme bezüglich der Aufnahme von α 2M bestätigt wurde.

Beide Endozytoseexperimente zeigen die veränderte Beziehung zwischen dem ursprünglichen Aufbau von LRP1 und den Liganden, sowie die Interaktion der veränderten Form des LRP1-Rezeptors und tPA und $\alpha 2M$. Zum einen lässt sich durch die verkürzte Form von LRP1 zeigen, welche Auswirkungen es auf die Aufnahme und dessen Intensität hat und zum anderen gibt die verkürzte Form eine konkrete Auskunft über den Aufnahmeort der Liganden. Durch die Untersuchung der verkürzten Form kommt es zu einer besseren Analyse der physiologischen Form von LRP1 (Obermoeller-McCormick et al. 2001). Ferner zeigen diese Versuche die Relevanz von LRP1 und dessen Position im Konzept von Transport und Aufnahme.

Die Vervielfältigung von pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 spielte für die allgemeine Arbeit mit dem Plasmid eine große Rolle. Nachdem das Plasmid von den kompetenten Bakterien aufgenommen wurde und die Kolonien gesammelt und aufgereinigt wurden, konnte die Vervielfältigung mithilfe einer Gelelektrophorese kontrolliert werden. Daraufhin wurde das 7859 bp große Plasmid mit den Restriktionsenzymen KpnI und XbaI verdaut. Das Enzym KpnI konnte das Plasmid an der Position 921 und XbaI an der Position 3422 schneiden. Es wurde festgestellt, dass bei den zweifach verdauten Plasmiden eine Bande von 2501 bp und 5358 bp vorliegt. Durch die Sequenzierung konnte die Qualität festgestellt werden und der Ausschluss von jeglicher Mutation, die während einer Vervielfältigung hätte entstehen können. Folglich konnte neues Arbeitsmaterial gewonnen werden, um weitere Versuche durchzuführen. Durch den Ausschluss von Mutation konnte die Qualität des Produktes gewährleistet werden.

Um eine stabile Transfektion durchführen zu können, musste das Plasmid pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 umklont werden, da im nächsten Schritt eine Resistenz gegen Blasticidin benötigt wurde. Der Vektor in der die DNA sich befindet, konnte eine Resistenz nicht nachweisen, da eine Ampicillinresistenz ausschließlich im Bereich von 7250-8110 bp vorhanden war. Nachdem die DNA vervielfältigt und isoliert wurde, ist die Ligation fehlgeschlagen. Der pLBCX-Vektor hat sich nicht mit dem pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 verbunden. Da der vorherige Ansatz nicht funktioniert hat, wurden für einen höheren Ertrag die PCR-Einstellungen verändert und Zn^{2+} hinzugefügt, da die Antarctic Phosphatase mit diesem Zusatz optimiert werden konnte. Die Umklonierung konnte zunächst mithilfe einer Gelelektrophorese nachgewiesen (Abbildung 12) und anschließend durch eine Sequenzierung genauer analysiert werden, bevor die stabile Transfektion durchgeführt wurde.

Die Funktionalität des umklonten Plasmids konnte mit einer stabilen Transfektion überprüft werden. Parallel zur stabilen Transfektion wurde der Versuch mit pLBCX+LRP1 und GFP durchgeführt, damit eine zwischenzeitige Kontrolle möglich wäre. Anhand dieser Überprüfung konnte die Menge der transfizierten Zellen geschätzt werden (Abbildung 14). Mit ein Fluoreszenzmikroskop wurde festgestellt, dass knapp 30 % der Zellen die DNA aufgenommen haben

oder auf ihrer Oberfläche verankert waren. Anschließend wurde die stabil transfizierte Mischkolonie mit SDS-PAGE und Western-Blot ausgewertet und eine Aufnahme des umklonierten Plasmids festgestellt (Abbildung 15).

Als nächster Schritte kann die vorhandene Mischkolonie weiter selektioniert und anschließende Endozytoseversuche durchgeführt werden, um einen Vergleich zu transient transfizierten Zellen zu bekommen. Gegebenenfalls kann die Intensität der Endozytose von den jeweiligen Liganden verglichen werden. Durch eine aufgereinigte Kolonie könnten Ergebnisse genauer und die Fehlerquote verringert werden. Darüber hinaus wären weitere Endozytoseversuche mit anderen Liganden wie z.B. Aß eine Möglichkeit die Diversität des verkürzten LRP1-Rezeptors zu untersuchen.

Im Anschluss kann überprüft werden, wie sich der verkürzte LRP1-Rezeptor in weiteren Organismen verhält und inwiefern Endozytose funktioniert und welche physiologischen Auswirkungen diese haben könnten.

7. Zusammenfassung

Das multifunktionale transmembrane Glykoprotein LRP1, das eine allgemeine Größe von 600 kDa hat und sich in eine transmembrane und extrazelluläre Untereinheit unterteilen lässt, ist vor allem im zentralen Nervensystem zu finden (Pietrzik et al. 2002; Zhuo et al. 2000). Im Übrigen kann die extrazelluläre Untereinheit in vier weitere Domänen eingeteilt werden, die LRP1 in seinen Aufgaben nachhaltig beeinflussen. Jede dieser Domäne hat eine andere Affinität zu seinem Umfeld und kann es aus diesem Grund unterschiedlich stark beeinflusst werden. Zu den Aufgaben von LRP1 gehört unter anderem die Aufnahme und der Transport von Liganden und die Regulation des Stoffwechsels. Durch diese Funktionen unterstützt LRP1 die Blut-Hirn-Schranke in ihrem Aufbau (Storck und Pietrzik 2017). Dementsprechend kann sich als Folge von Störungen und Verlust von essenziellen Komponenten die Blut-Hirn-Schranke verändern und die Struktur von LRP1 mit. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte festgestellt werden, dass die zweite und vierte Domäne die höchste Bindungsaffinität besitzen und somit die meisten Liganden binden können (Obermoeller-McCormick et al. 2001).

In dieser Arbeit sollte mithilfe einer Variation der Domäne IV von LRP1 (pcDNA3.1(+) LRP1_CR10) die Domäne IV mit seinen Eigenschaften nochmals genauer untersucht werden. Dies erfolgte zunächst durch eine transienten Transfektion in CHO 13-5-1-Zellen. Die Endozytoseexperimente mit α 2M und tPA konnten die Annahmen bestätigen, dass Domäne IV von LRP1 tPA aufnimmt. Allerdings konnte α 2M nicht allein durch Domäne IV aufgenommen werden (Obermoeller-McCormick et al. 2001). Diese Ergebnisse können einer genaueren funktionellen Analyse der unterschiedlichen Domänen dienen. Durch mehr Erkenntnisse bezüglich des Aufbaus von LRP1, kann eine spezifische Affinität von LRP1 identifiziert werden. Die Vervielfältigung und Umklonierung von pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 in den pLBCX-Vektor hatte die kontinuierliche Arbeit mit der verkürzten Variante der Domäne IV von LRP1 ermöglicht. Des Weiteren fand eine stabile Transfektion nach der Umklonierung des Plasmids statt. Demzufolge sollten in Zukunft weitere Endozytoseexperimente mit der stabil transfizierten Form durchgeführt werden, um diese Effektivität und Funktionalität bewerten zu können.

Nicht zuletzt können Kombinationen zwischen pcDNA3.1(+) LRP1_CR10 und weiteren Domänen evaluiert werden. Dabei kann die Effektivität und die Funktionalität dieser Konstellationen überprüft werden. Durch das Spiel mit den cysteinreichen komplementären Anteilen könnte die kleinstmögliche effiziente Variation von LRP1 ausgemacht werden, die im Anschluss im therapeutischen Kontext Anwendung finden könnte.

Literaturverzeichnis

- Abbott, N. Joan (2013). Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 36 (3), 437–449. <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9608-0>.
- Ashcom, J. D./Tiller, S. E./Dickerson, K./Cravens, J. L./Argraves, W. S./Strickland, D. K. (1990). The human alpha 2-macroglobulin receptor: identification of a 420-kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of alpha 2-macroglobulin. *The Journal of Cell Biology* 110 (4), 1041–1048. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.4.1041>.
- Beffert, U./Stolt, P. C./Herz, J. (2004). Functions of lipoprotein receptors in neurons. *Journal of Lipid Research* 45 (3), 403–409. <https://doi.org/10.1194/jlr.R300017-JLR200>.
- Bres, E. E./Faissner, A. (2019). Low Density Receptor-Related Protein 1 Interactions With the Extracellular Matrix: More Than Meets the Eye. *Frontiers in cell and developmental biology* 7, 31. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00031>.
- Cater, J. H./Wilson, M. R./Wyatt, A. R. (2019). Alpha-2-Macroglobulin, a Hypochlorite-Regulated Chaperone and Immune System Modulator. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2019, 5410657. <https://doi.org/10.1155/2019/5410657>.
- Daneman, R./Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7 (1), a020412. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>.
- Fabbro, S./Seeds, N. W. (2009). Plasminogen activator activity is inhibited while neuroserpin is up-regulated in the Alzheimer disease brain. *Journal of Neurochemistry* 109 (2), 303–315. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05894.x>.
- Gravanis, I./Tsirka, S. E. (2008). Tissue-type plasminogen activator as a therapeutic target in stroke. *Expert opinion on therapeutic targets* 12 (2), 159–170. <https://doi.org/10.1517/14728222.12.2.159>.
- Herz, J./Strickland, D. K. (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *The Journal of clinical investigation* 108 (6), 779–784. <https://doi.org/10.1172/JCI13992>.
- Hoirisch-Clapauch, S./Nardi, A. E. (2015). Improvement of Psychotic Symptoms and the Role of Tissue Plasminogen Activator. *International Journal of Molecular Sciences* 16 (11), 27550–27560. <https://doi.org/10.3390/ijms161126053>.
- Kanekiyo, T./Bu, G. (2014). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid- β clearance in Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience* 6, 93. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00093>.
- Kang, D. E./Pietrzik, C. U./Baum, L./Chevallier, N./Merriam, D. E./Kounnas, M. Z./Wagner, S. L./Troncoso, J. C./Kawas, C. H./Katzman, R./Koo, E. H. (2000). Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *The Journal of clinical investigation* 106 (9), 1159–1166. <https://doi.org/10.1172/JCI11013>.
- Marler, J.R. (1995) The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke
- Murphy, K./Weaver, C. (2018). 10.1007/978-3-662-56004-4_6. In: Kenneth Murphy/Casey Weaver (Hg.). *Janeway Immunologie*. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 273–326.
- Neels, J. G./van den Berg, B. M./Lookene, A./Olivecrona, G./Pannekoek, H./van Zonneveld, A. J. (1999). The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties. *The Journal of biological chemistry* 274 (44), 31305–31311. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.44.31305>.

- Nielsen, M.S./ Nykjaert, A./ Warshawsky, I./ Schwartz, A.L/ Gliemann, J. (1995) Analysis of Ligand Binding to the alpha-2- Macroglobulin Receptor/ Low Density Lipoprotein Receptor.
- Obermoeller-McCormick, L. M./Li, Y./Osaka, H./FitzGerald, D. J./Schwartz, A. L./Bu, G. (2001). Dissection of receptor folding and ligand-binding property with functional minireceptors of LDL receptor-related protein. *Journal of cell science* 114 (Pt 5), 899–908.
- Oboudiyat, C./Glazer, H./Seifan, A./Greer, C./Isaacson, R., S. (2013). Alzheimer's disease. *Seminars in neurology* 33 (4), 313–329. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1359319>.
- Pietrzik, C. U./Busse, T. /Merriam, D. E./Weggen, S. /Koo, E. H. (2002). The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing. *The EMBO journal* 21 (21), 5691–5700. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf568>.
- Rehman, A. A./Ahsan, H. /Khan, F. H. (2013). α -2-Macroglobulin: a physiological guardian. *Journal of Cellular Physiology* 228 (8), 1665–1675. <https://doi.org/10.1002/jcp.24266>.
- Rouf, S. A./Moo-Young, M./Chisti, Y. (1996). Tissue-type plasminogen activator: Characteristics, applications and production technology. *Biotechnology Advances* 14 (3), 239–266. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(96\)00019-5](https://doi.org/10.1016/0734-9750(96)00019-5).
- Sagare, A. P./Bell, R. D./Srivastava, A./Sengillo, J. D./Singh, I./Nishida, Y. /Chow, N. /Zlokovic, B. V. (2013). A lipoprotein receptor cluster IV mutant preferentially binds amyloid- β and regulates its clearance from the mouse brain. *The Journal of Biological Chemistry* 288 (21), 15154–15166. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.439570>.
- Salicioni, A. M./Mizelle, K. S./Loukinova, E./Mikhailenko, I. /Strickland, D. K./Gonias, S. L. (2002). The low density lipoprotein receptor-related protein mediates fibronectin catabolism and inhibits fibronectin accumulation on cell surfaces. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (18), 16160–16166. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201401200>.
- Spuch, C. /Ortolano, S. /Navarro, C. (2012). LRP-1 and LRP-2 receptors function in the membrane neuron. Trafficking mechanisms and proteolytic processing in Alzheimer's disease. *Frontiers in physiology* 3, 269. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00269>.
- Storck, S. E./Pietrzik, C. U. (2017). 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. *Pharmaceutical research* 34 (12), 2637–2651. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2267-3>.
- Thermo Fisher Scientific. Oligo Design Tools. Primer design tips. https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/oligonucleotides-primers-probes-genes/custom-dna-oligos/oligo-design-tools.html?s_kwcid=AL!3652!3!506621651451!p!!g!!design%20primer&ef_id=Cj0KCQiAqOucBhDrARIsAPCQL1YNITJae929jTNUoRLpct1HksfNn6EwRNuedc006K-nRcKpzf-PpDwaAiKJEALw_wcB:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!506621651451!p!!g!!design%20prime!12555269437!117284658457&cid=bid_mol_pch_r01_co_cp1358_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_pur_con (besucht am 01.03.2020).
- van de Haar, H. J./Burgmans, S. /Jansen, J. F. A./van Osch, M. J. P./van Buchem, M. A./Muller, M. /Hofman, P. A. M./Verhey, F., R. J./Backes, W., H. (2016). Blood-Brain Barrier Leakage in Patients with Early Alzheimer Disease. *Radiology* 281 (2), 527–535. <https://doi.org/10.1148/radiol.2016152244>.
- Willnow, T. E./Orth, K./Herz, J. (1994). Molecular dissection of ligand binding sites on the low density lipoprotein receptor-related protein. *The Journal of biological chemistry* 269 (22), 15827–15832.
- Wolfgang Borth. α_2 “Macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics.

- Zhuo, M. /Holtzman, D. M./Li, Y. /Osaka, H. /DeMaro, J. /Jacquin, M. /Bu, G. (2000). Role of Tissue Plasminogen Activator Receptor LRP in Hippocampal Long-Term Potentiation. *The Journal of Neuroscience* 20 (2), 542–549. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-02-00542.2000>.
- Zlokovic, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57 (2), 178–201. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003>.
- Zlokovic, B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nature reviews. Neuroscience* 12 (12), 723–738. <https://doi.org/10.1038/nrn3114>.

Danksagung

Mein Dank gilt meiner Familie und meinen Freund*innen, die mich stets in allen Phasen dieser Arbeit unterstützt haben.

Darüber hinaus danke ich meinem Doktorvater und der ganzen Arbeitsgruppe.

Die gesamte Gemeinschaft hat mich stets motiviert und konnte mir Freude am wissenschaftlichen und selbstständigen Arbeiten vermitteln.

