

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Neurologie

Prof. Dr. med. Tim Magnus  
Prof Dr. med. Götz Thomalla

## **Innovative Diagnostik und Therapie in der Frühphase des Schlaganfalls durch den Einsatz der Magnetpartikelbildung und P2X7-spezifischer Nanobodies**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Maximilian Wilmes  
aus Geseke

Hamburg 2023

Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.12.2023

Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Tim Magnus

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Jens Minnerup

## Inhaltsverzeichnis

<b><u>1</u></b>	<b><u>MANUSKRIFT.....</u></b>	<b><u>3</u></b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>EINLEITUNG.....</u></b>	<b><u>18</u></b>
<b><u>3</u></b>	<b><u>METHODEN.....</u></b>	<b><u>22</u></b>
<b><u>4</u></b>	<b><u>ERGEBNISSE.....</u></b>	<b><u>25</u></b>
<b><u>5</u></b>	<b><u>DISKUSSION.....</u></b>	<b><u>32</u></b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>REFERENZEN.....</u></b>	<b><u>39</u></b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u></b>	<b><u>46</u></b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>EIGENANTEIL.....</u></b>	<b><u>52</u></b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>DANKSAGUNG.....</u></b>	<b><u>53</u></b>
<b><u>10</u></b>	<b><u>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....</u></b>	<b><u>54</u></b>

# 1 Manuskript

RESEARCH

Open Access



# Blocking P2X7 by intracerebroventricular injection of P2X7-specific nanobodies reduces stroke lesions

Maximilian Wilmes<sup>1</sup>, Carolina Pinto Espinoza<sup>1,2</sup>, Peter Ludewig<sup>1</sup>, Joschi Stabernack<sup>1</sup>, Arthur Liesz<sup>3,5</sup>, Annette Nicke<sup>4</sup>, Mathias Gelderblom<sup>1</sup>, Christian Gerloff<sup>1</sup>, Simonetta Falzoni<sup>6</sup>, Eva Tolosa<sup>2</sup>, Francesco Di Virgilio<sup>6</sup>, Björn Rissiek<sup>1</sup>, Nikolaus Plesnilla<sup>3†</sup>, Friedrich Koch-Nolte<sup>2†</sup> and Tim Magnus<sup>1\*†</sup>

## Abstract

**Background** Previous studies have demonstrated that purinergic receptors could be therapeutic targets to modulate the inflammatory response in multiple models of brain diseases. However, tools for the selective and efficient targeting of these receptors are lacking. The development of new P2X7-specific nanobodies (nbs) has enabled us to effectively block the P2X7 channel.

**Methods** Temporary middle cerebral artery occlusion (tMCAO) in wild-type (wt) and P2X7 transgenic (tg) mice was used to model ischemic stroke. Adenosine triphosphate (ATP) release was assessed in transgenic ATP sensor mice. Stroke size was measured after P2X7-specific nbs were injected intravenously (iv) and intracerebroventricularly (icv) directly before tMCAO surgery. In vitro cultured microglia were used to investigate calcium influx, pore formation via 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) uptake, caspase 1 activation and interleukin (IL)-1 $\beta$  release after incubation with the P2X7-specific nbs.

**Results** Transgenic ATP sensor mice showed an increase in ATP release in the ischemic hemisphere compared to the contralateral hemisphere or the sham-treated mice up to 24 h after stroke. P2X7-overexpressing mice had a significantly greater stroke size 24 h after tMCAO surgery. In vitro experiments with primary microglial cells demonstrated that P2X7-specific nbs could inhibit ATP-triggered calcium influx and the formation of membrane pores, as measured by Fluo4 fluorescence or DAPI uptake. In microglia, we found lower caspase 1 activity and subsequently lower IL-1 $\beta$  release after P2X7-specific nb treatment. The intravenous injection of P2X7-specific nbs compared to isotype controls before tMCAO surgery did not result in a smaller stroke size. As demonstrated by fluorescence-activated cell sorting (FACS), after stroke, iv injected nbs bound to brain-infiltrated macrophages but not to brain resident microglia, indicating insufficient crossing of the blood-brain barrier of the nbs. Therefore, we directly icv injected the P2X7-specific nbs or the isotype nbs. After icv injection of 30  $\mu$ g of P2X7 specific nbs, P2X7 specific nbs bound sufficiently to microglia and reduced stroke size.

**Conclusion** Mechanistically, we can show that there is a substantial increase of ATP locally after stroke and that blockage of the ATP receptor P2X7 by icv injected P2X7-specific nbs can reduce ischemic tissue damage.

<sup>†</sup>Nikolaus Plesnilla, Friedrich Koch-Nolte and Tim Magnus equally contributing last authors

\*Correspondence:  
Tim Magnus  
t.magnus@uke.de

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022, corrected publication 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

**Keywords** P2X7, Nanobodies, Ischemic stroke, Nanomedicine, Cerebrovascular disease

## Introduction

Stroke induces sterile inflammation, which worsens the initial brain damage and neurological outcome [1, 2]. Hypoxic brain tissue releases many molecules, which can activate cells such as microglia in the surrounding tissue and lead to infiltration of other immune cells such as neutrophils, amplifying the inflammatory cascade [3]. These molecules include adenosine triphosphate (ATP) as well as nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), heat shock protein (HSP), and high-mobility group box 1 protein (HMGB1). These factors can activate the inflammasome and induce the secretion of proinflammatory cytokines by innate immune cells [4, 5]. These molecules activate several pathways, such as the ATP/P2X7 pathway or the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB) pathway [6]. The P2X7 receptor is a homotrimeric, ligand-gated nonselective cation channel that is expressed in the central nervous system as well as on immune cells [7]. The P2X7 receptor consists of three polypeptide subunits, each with two transmembrane domains [8, 9]. After activation by extracellular ATP (eATP), these subunits form an ion-permeable channel, which induces Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> influx and K<sup>+</sup> efflux, resulting in plasma membrane depolarization and initiation of Ca<sup>2+</sup> signaling cascades. The K<sup>+</sup> efflux through the P2X7 receptor supports the formation of the Nod-like receptor protein 3 (NLRP3)-mediated inflammasome complex, which cleaves pro-caspase 1 and leads to a subsequent cleavage of pro-IL-1β and pro-IL-18 into their biologically active forms [5, 10, 11]. The amount of accessible intracellular pro-IL-1β and pro-IL-18 also depends on another signal transmitted by receptors, such as Toll-like receptors (TLRs) or tumor necrosis factor (TNF)-receptors, and subsequent NFκB activation.

In the central nervous system (CNS), P2X7 has been found primarily on microglia, with less on astrocytes and oligodendrocytes [12–17]. These findings were confirmed by data from the Allen Brain Atlas for mice [18] and humans [19]. There are some similarities between human and rodent P2X7 expression in the brain, such as high expression on microglia and low expression on astrocytes, but there are also some differences such as high expression of P2X7 on human oligodendrocytes and low expression on rodent oligodendrocytes.

Several studies have shown that the experimental stroke size in P2X7<sup>-/-</sup> mice is smaller than that in wild-type mice [20, 21]. In addition, blocking the P2X7 channel with brilliant blue G (BBG) attenuated ischemic

damage [20]. However, systemic BBG cannot be used in humans since it is nonspecific and toxic.

Nanobodies (nbs), named for their small size (2.5 nm diameter, 4 nm height, 12 kDa) [22], are single-domain antibodies derived from camelid heavy chain antibodies. Compared to small molecule inhibitors, nbs have key advantages, such as low toxicity, high specificity, no off-target effects and, in the case of P2X7, a more potent inhibition [10, 21, 23]. With their long complementarity determining region 3 (CDR3), these molecules can access cavities or clefts on membrane proteins that are often inaccessible to antibodies [24, 25]. Other advantages of nbs over conventional antibodies include high stability, better solubility and rapid and targetable *in vivo* biodistribution. In addition, the ability to form nb multimers and the low costs and ease of production make them ideal candidates for treatment [26]. Fusion of an nb (monomer or multimer) to the Fc domain of a conventional antibody yields a heavy chain antibody with reconstituted Fc-mediated effector functions, including binding to Fc receptors, extended half-life and complement activation. This phenomenon allows a much broader tailoring of nbs than of conventional antibodies to different pathophysiologicals [27].

In this proof-of-concept study, we used P2X7-specific nbs to treat mice directly before temporary middle cerebral artery occlusion (tMCAO) surgery. We found that these nbs need to be injected intracerebroventricularly to reach P2X7 receptor on brain resident cells and protect against ischemic stroke.

## Methods

### Animals

All animal experiments were approved by the local animal care committees (Behörde für Justiz und Veterinärwesen Hamburg, Nr 006/18) and conducted following the “Guide of the Care and Use of Laboratory Animals” published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 83–123, revised 1996). All mice were kept at a constant temperature of 22 ± 2 °C with a 12-h light–dark cycle and *ad libitum* access to food and water. Only 12- to 18-week-old male mice were used for this study. C57BL/6J mice were purchased from Charles River (Bar Harbor, ME 04609, USA), whereas the generation of pmeLUC transgenic and P2X7-EGFP transgenic mice (line 17 in C57BL/6J) was described previously [28, 29].

### Production of P2X7 nbs

The P2X7-antagonizing nbs 1c81 and 13A7 were selected and cloned into the pCSE2.5 expression vector (kindly provided by Thomas Schirrmann, Braunschweig, Germany) [30] as described previously [10, 28]. Then, 13A7 was fused to the hinge, constant domain heavy chain (CH) 2, and CH3 domains of mouse immunoglobulin (Ig) G2c, resulting in a heavy chain format (nb A), whereas 1c81 was dimerized and fused to the albumin-specific nb Alb8 (mAb77) [31], resulting in a bispecific heterotrimeric nb with an extended half-life (nb B) (Additional file 1: Fig. S1). Since dimers showed a higher potency than monomers [10], we used nb B for intracerebroventricular (icv) injection. For icv injection, we needed to create a construct that could be highly concentrated without aggregation, so we modified our nb B (Additional file 1: Fig. S1). The modified nb B-mod was concentrated up to 15 µg/µl without aggregation. The exact sequences and further information on the various constructs can be found in patent WO/2013/178783.

HEK-6E cells were transfected with the constructs, and 6 days after transfection, the nbs were purified from the cell supernatant by affinity chromatography on a protein-G Sepharose column. The buffer was exchanged by gel filtration on a PD-10 column. The concentration and purity were monitored by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and a BCA™ Protein Assay Kit (Pierce).

### tMCAO surgery and stroke size analysis

tMCAO was performed as previously described [32–34]. Mice were anesthetized with 1.5% isoflurane in 100% O<sub>2</sub> and an intraperitoneal injection of 0.05 mg/kg body weight buprenorphine in saline was used as analgesic. A midline skin incision in the neck was made before ligating the proximal common carotid artery (CCA) and the external carotid artery (ECA) without disrupting the venous vessels. Vital parameters were continuously monitored with PhysioSuite (Kent Scientific Corporation, USA). Occlusion was confirmed by a laser Doppler monitor (moorVMS-LDF; Moor Instruments, UK) and persisted for 40 min. Mice with an occlusion rate of less than 80% were excluded.

Stroke size was measured by triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining and magnetic resonance imaging (MRI). We used a 7-Tesla MR small animal imaging system (ClinScan, Bruker, Ettlingen, Germany). The imaging protocol comprised T2-weighted imaging MRI. Calculation of corrected stroke volumes was performed as described previously [35].

The infarct volumes and total areas of the treated hemisphere were calculated using NIH ImageJ software.

### Intravenous (iv) and icv injections of nbs

Different methods of nb administration were used. P2X7-specific nbs (nb A, 13A7-Fc) were directly injected (100 µg in 100 µl of phosphate-buffered saline [PBS]) intravenously, or P2X7-specific nbs (nb B/nb B-mod, 1c81-dim-HLE) or isotype nbs against human cluster-of-differentiation (CD) 38 were injected (30 µg in 2 µl of PBS containing 60 mg/ml trehalose and 0.4 mg/ml Tween-20) directly into the ventricles of the brain by using a stereotaxic apparatus. Mice were pain treated with 1 mg tramadol/kg body weight one day before surgery. Directly before the surgery, the mice were anesthetized with isoflurane (4% for induction, 2.5% for maintenance) in 100% oxygen. After placing the mice in a stereotaxic frame (Stoelting, 51615), we made a 1-cm-long incision above the midline. A cranial burr hole (0.9 mm) was drilled 1.1 mm lateral and 0.5 mm posterior to the bregma. Nbs were drawn into a 10-µl Hamilton syringe (Hamilton, 1701RN) connected to a 26-gauge needle (Hamilton, 26G, Point Style 4, 12°) controlled by a motorized stereotaxic injector (Stoelting, integrated stereotaxic injector [ISI]).

The needle was slowly introduced 2.3 mm deep into the left ventricle (Additional file 1: Fig. S2). Following a period of 5 min to let the ventricular system re-expand, 2 µl of dissolved nbs at a concentration of 15 µg/µl was injected at 1 µl/min. This step was followed by another 10-min break and slow removal of the needle. Vital parameters were monitored by an animal support unit (Minerve, Esternay, France). Body temperature was maintained throughout the procedure at 37 °C using a feedback-controlled heating device.

### In vivo ATP measurement after tMCAO using pmeLUC-TG

Three hours before tMCAO surgery, 150 mg/kg luciferin (Promega) was injected intraperitoneally. Luciferin was reinjected 1 day after tMCAO in prior of the measurement. In vivo ATP release was monitored by whole-body luminometry performed using the IVIS-Perkin Elmer in vivo imaging system. In vitro calibration was performed in brain homogenates from pmeLUC-tg mice.

### Microglia and macrophage preparation and FACS

Animals were euthanized and perfused with PBS. Brains were dissected and digested in 1 mg/ml collagenase A (Roche) and 0.1 mg/ml DNase type I (Sigma). Separation from myelin and debris was performed by density centrifugation with Percoll (GE Healthcare). The following antibodies and detection systems were used: CD45-APC-Cy7 (1:100, 30-F11, #103,115 BioLegend), CD45-PerCP (1:100, 30-F11, #103,129, BioLegend), CD11b-APC (1:100, M1/70, #17-0112-82, eBioscience), Ly6C-PerCP/

Cy5.5 (1:100, HK1.4, #128,011, BioLegend), anti-mIgG1-brilliant violet (BV) 421 (1:100, RMG1-1, #406,615, BioLegend), anti-mIgG2-BV421 (1:100, RM223, #31-1103-02, Dianova), streptavidin-BV421 (1:100, #405,226, BioLegend), Fc blocking anti-CD16/CD32 (1:100, 2.4G2, #BE0307, BioXcell), and mAb77 (1:100, Alb8-specific mouse monoclonal antibody kindly provided by Ablynx). Microglia were gated as mentioned in the supplementary materials (Additional file 1: Fig. S3). In the first step, cells were incubated (30 min on ice) with Fc blocking anti-CD16/32, where *ex vivo* samples were incubated with 0.5  $\mu\text{g}$  of P2X7 specific nb in the presence of Fc blocking anti-CD16/32. For detection of cell-bound P2X7 nbs, cells were incubated either with biotinylated anti-mouse IgG2c-fused antibody followed by streptavidin BV421 conjugated (nb A) or with mAb77 (nb B-mod) followed by fluorochrome-conjugated antibodies in the presence of Fc blocking anti-CD16/CD32 (Additional file 1: Fig. S1). Calcium influx was measured by a Fam-fluorochrome-labeled inhibitor of caspase-1 (FLICA) detection system. DAPI uptake and IL-1 $\beta$  release were monitored by flow cytometry. IL-1 $\beta$  enzyme-linked immunoassays (ELISAs) were performed according to Invitrogen Thermo Fisher Scientific (#BMS6002).

Differentiation between brain resident microglia and brain infiltrating macrophages was performed by FACS, where infiltrating cells were labeled CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> and microglia were labeled CD45<sup>int</sup>CD11b<sup>+</sup> [36].

For functional analysis, brain cells from icv injected brain cells were stimulated with 0.5 mM ATP in RPMI containing DAPI at 37 °C for 5 min. Cells were washed and analyzed by flow cytometry.

### Immunostaining

Mice were deeply anesthetized, and brains were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) by transcardial perfusion. After fixation in 4% PFA overnight, 50  $\mu\text{m}$  thick sections were prepared using a vibratome. Immunostaining was performed at 4 °C on free-floating sections using an anti-Iba1 antibody to detect microglia (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) and an anti-neuronal nuclear protein (NeuN) antibody to detect neurons (Thermo Fisher Scientific). DAPI (Thermo Fisher Scientific) was used to counterstain nuclei. Images were obtained by confocal laser scanning microscopy (LSM 880, Zeiss, Oberkochen, Germany).

## Results

### ATP is released rapidly after ischemic stroke

We analyzed ATP release after tMCAO by using ATP-sensing pmeLUC transgenic mice. These mice ubiquitously express firefly-derived luciferase on the outer layer of the plasma membrane [29, 37], which is activated by

extracellular ATP. The pmeLUC mice can be used to detect changes in the extracellular ATP concentration in the micromolar range in a strictly ATP-selective fashion since the luciferase used is insensitive to all other nucleotides [37].

Immediately after tMCAO, a base image was taken (Fig. 1). At 90 min after artery occlusion, eATP release/luminescence increased in the ischemic hemisphere. After 24 h, we could still detect a strong signal in the ischemic hemisphere. Rough estimations of the *in vivo* eATP concentration were performed by an *in vitro* concentration gradient (Additional file 1: Fig. S4).

### P2X7 overexpression exacerbates stroke volume

Immunostaining of P2X7-enhanced green fluorescent protein (EGFP) transgenic mice revealed that P2X7 is expressed mainly on ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1)-positive cells (Fig. 2A, negative controls in Additional file 1: Fig. S5). Merged staining of Iba1 and GFP showed, for the most part, a congruent symmetry, where neurons stained with NeuN did not show any GFP expression.

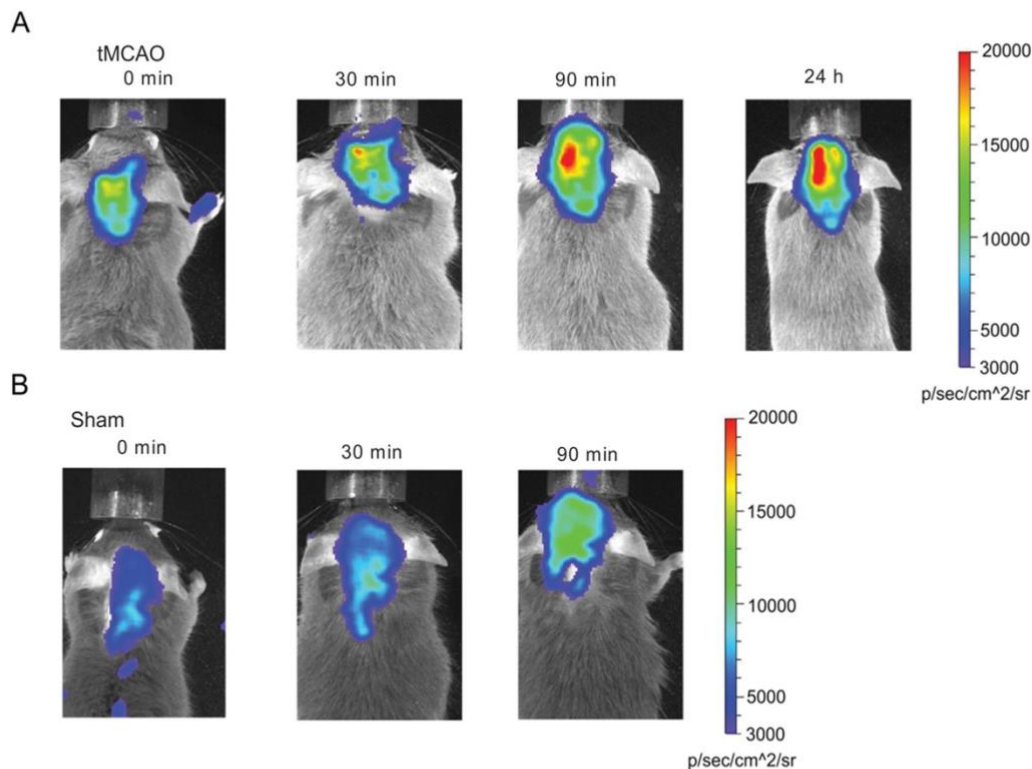
Additionally, we used the expression data from the Allen Brain Atlas for mice [18] and humans [19] to determine cellular P2X7 expression in the brain (Table 1).

To evaluate the relevance of P2X7 for ischemic stroke, we used P2X7-overexpressing mice [28]. Littermate mice ( $n=10$ ) and P2X7-overexpressing mice ( $n=9$ ) were subjected to tMCAO, and the stroke size was determined by TTC staining. After 40 min of occlusion, we found that stroke sizes in P2X7-overexpressing mice was significantly larger in comparison to wt controls 24 h after tMCAO. The P2X7-overexpressing mice had a mean ischemic volume of  $52.50 \text{ mm}^3 \pm 8.52 \text{ mm}^3$  compared to the littermates with a mean ischemic volume of  $36.66 \text{ mm}^3 \pm 13.64 \text{ mm}^3$  (Fig. 2B). Additionally, the percentage of the ischemic hemisphere differed significantly between the two cohorts, with  $49.36\% \pm 8.76\%$  in the P2X7-overexpressing cohort and  $34.15\% \pm 13.56\%$  in the control group (Fig. 2B).

### P2X7-specific nbs inhibit the P2X7 receptor on microglia *in vitro*

To verify that P2X7-specific nbs can inhibit the P2X7 receptor in microglia, we tested them in ATP-stimulated primary microglia *in vitro*. The P2X7-specific nbs (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) decreased the ATP-evoked calcium influx compared to the isotype control nbs (Fig. 3A). In addition, the P2X7-specific nbs dampened the ATP-evoked pore formation monitored by DAPI uptake (Fig. 3B). Caspase-1 activation, measured by the FAM-FLICA detection system, was reduced significantly in the presence of the P2X7-blocking nbs (Fig. 3C; mean fluorescence intensity





**Fig. 1** ATP was released after stroke. Transgenic ATP sensor mice (pmeLuc-mice) show eATP in the brain. **A** After tMCAO, ATP is rapidly released in the ischemic hemisphere starting after 30 min and is still prominent after 24 h compared to that in the contralateral hemisphere. **B** Sham-treated mice do not show substantial ATP level differences between the two hemispheres. Three mice for each group underwent surgery with similar results. Representative pictures are provided

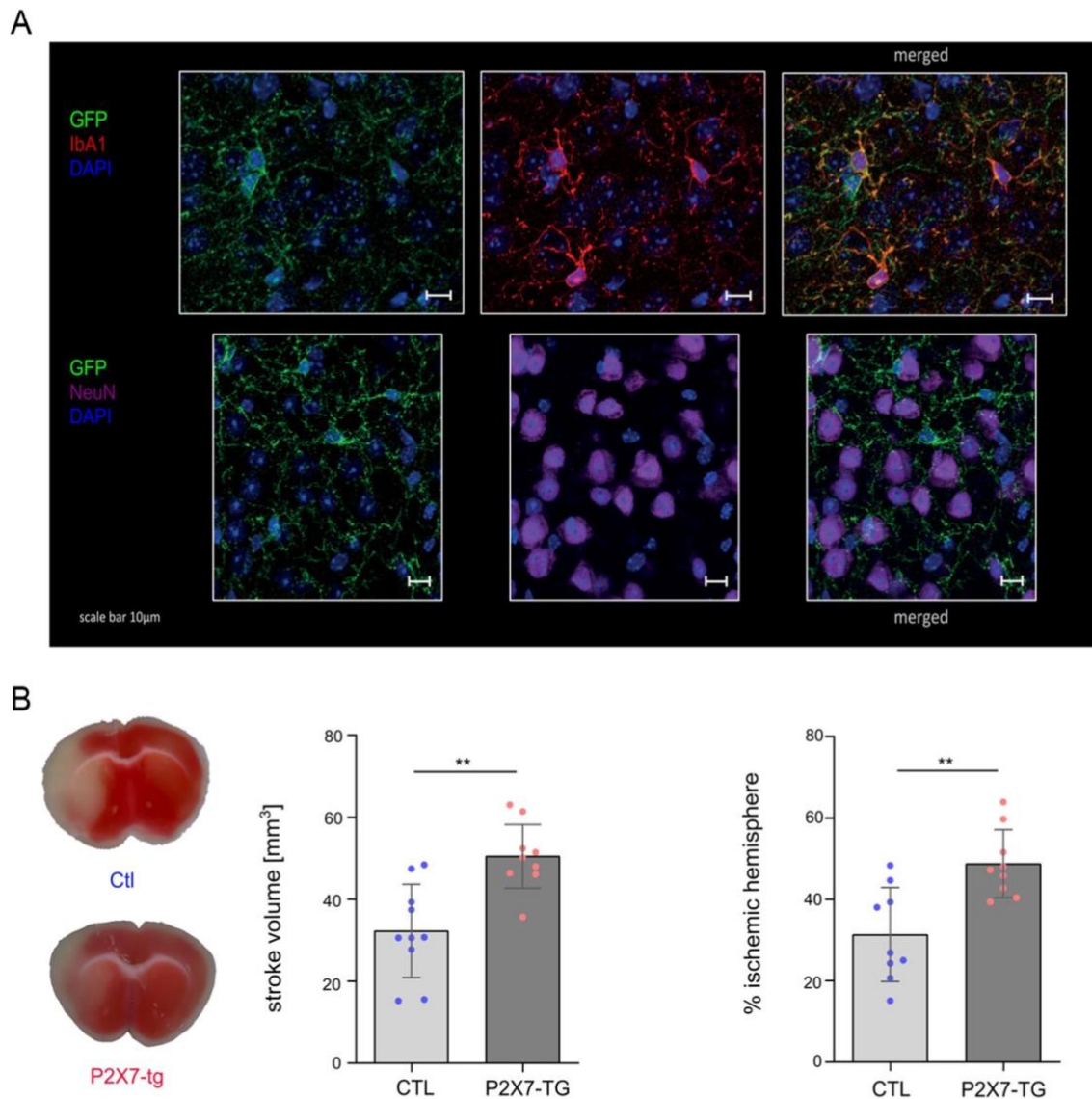
[MFI]: 2617 vs. 674;  $***p < 0.001$ ;  $n = 3$ ). LPS/ATP-evoked IL-1 $\beta$  release was significantly reduced after preincubation with the P2X7-specific nbs (Fig. 3D;  $***p < 0.001$ ;  $n = 3$ ). Further investigation showed that low doses of nbs were sufficient to suppress IL-1 $\beta$  release (Fig. 3E).

**Iv injection of P2X7-specific nbs does not affect stroke size**  
Next, we investigated the effect of the P2X7-specific nbs on stroke size in wild-type mice. We intravenously injected 100  $\mu$ g of nb B prior to tMCAO. Stroke size was analyzed 24 h after surgery in two independent cohorts by histology or MRI. We did not find any significant reduction in stroke size compared to that of the isotype control nb group (MRI and TTC:  $p > 0.05$ ). The isotype-treated wild-type mice showed ischemic lesions of  $60.91\% \pm 12.23\%$  in the ischemic hemisphere in the TTC cohort and  $62.92\% \pm 1.68\%$  in the MRI cohort. The nb-treated mice showed an almost identical ischemic lesions, with  $59.41\% \pm 15.13\%$  in the TTC cohort and  $63.72\% \pm 3.73\%$  in the MRI cohort (Fig. 4A).

To detect whether the nbs successfully cross the blood–brain barrier (BBB), we intravenously injected fluorophore-labeled P2X7-specific nbs 1 h after tMCAO. After 24 h, we analyzed the MFI of P2X7-specific nbs bound to either brain resident microglia or brain infiltrating macrophages (see staining protocol in Additional file 1: Fig. S1). We found that 100  $\mu$ g of intravenously injected nbs did not label brain resident microglia but could be detected on infiltrating macrophages (Fig. 4B), indicating an insufficient passage through the BBB of the nbs. This insufficient passage was further verified by a dose–response analysis of intravenously injected nbs (Additional file 1: Fig. S6), indicating that extremely high doses are needed for BBB crossing.

#### Icv injection of P2X7-specific nbs reduces stroke size

To circumvent the BBB, we performed direct icv injection of nbs into the brain and examined the effect of these P2X7-specific nbs on stroke size. Because of the minimal volume of 1–2  $\mu$ l available for icv injections, we needed to concentrate the nbs. For this, we had



**Fig. 2** P2X7 was mainly expressed on microglia, and P2X7-overexpressing transgenic mice had more strokes. Immunostaining of 50  $\mu$ m free-floating sections of P2X7-EGFP (**A**,  $n = 2$ ) transgenic mice illustrated that P2X7 is highly expressed on Iba1-positive (red) cells compared to NeuN-positive (purple) neurons. DAPI (blue) was used to stain the nucleus. For the negative control, see Additional file 1: Fig. S5. **B** One day after tMCAO surgery, including an occlusion time of 40 min, the P2X7-overexpressing mice had a significantly higher infarct volume and a significantly higher % loss of parenchyma in the ischemic hemisphere. Statistical significance was analyzed by Student's  $t$  test.  $**p < 0.001$ . Data are presented as the median  $\pm$  range of 9 P2X7-overexpressing mice and 10 wild-type littermate controls. Representative TTC staining and representative overlays of stroke volume at day 1 following tMCAO treatment

to slightly modify nb B (see MM). After performing a dose–response analysis of icv injected nbs, we saw that 10 to 30  $\mu$ g were already sufficient to cover the P2X7 receptor on all microglia and could be detected up to 21 days after injection (Additional file 1: Figs. S7, S8).

Following our dose response curve we injected 30  $\mu$ g of this modified P2X7-specific nb B-mod ( $n = 8$ ) or an isotype control nb ( $n = 9$ ) intracerebroventricularly into wildtype mice. Twenty-four hours after tMCAO, we analyzed the stroke size and found that the P2X7-specific

**Table 1** Expression of P2X receptor genes in brain resident cells in humans and mice

Cell class	Species	P2X1R	P2X2R	P2X3R	P2X4R	P2X5R	P2X6R	P2X7R	Panx1
All	Mice	0.332	0.511	1.216	19.836	1.051	3.929	7.355	29.659
	Human	0.292	0.339	0.445	10.320	5.952	6.170	41.939	13.923
Non-Neuronal	Mice	2.397	0.000	1.514	46.330	0.524	7.071	80.562	6.860
	Human	2.705	0.003	0.641	15.760	0.002	1.908	120.507	8.173
Endothelial	Mice	0.003	0.000	0.116	17.535	0.563	0.000	5.314	3.262
	Human	45.215	0.000	0.000	3.565	0.000	0.000	0.067	2.641
Microglia/PVM	Mice	13.870	0.000	0.067	132.048	0.000	0.617	390.551	12.421
	Human	26.250	0.000	0.074	92.659	0.000	0.054	226.445	16.611
Astrocytes	Mice	0.012	0.000	0.898	28.560	0.327	10.739	17.652	0.044
	Human	0.176	0.000	1.042	11.586	0.002	0.507	26.116	1.883
Oligo-dendrocytes	Mice	0.000	0.000	2.622	46.636	0.000	0.359	22.786	11.473
	Human	1.076	0.009	0.812	12.157	0.003	2.621	189.904	7.268
OPC	Mice	5.271	0.000	9.382	20.593	5.435	0.000	122.913	56.927
	Human	0.098	0.000	0.098	5.707	0.000	3.245	121.165	15.029
Excitatory Neurons	Mice	0.369	0.008	1.331	23.817	0.993	5.603	4.603	25.911
	Human	0.149	0.480	0.452	10.647	6.711	5.875	45.346	11.203
Inhibitory Neurons	Mice	0.117	1.118	1.084	13.174	1.170	1.884	4.010	36.270
	Human	0.119	0.052	0.383	8.268	5.328	7.877	15.680	22.188

Expression data from the Allen Brain Atlas for mice [18] and humans [19] on P2X receptors and pannexin 1. P2X7 expression is mainly found on human and rodent microglia and perivascular macrophages (PVM). Data are given as the mean count per million (CPM). Other cells show substantially lower expression of P2X7. Although oligodendrocytes show high expression of P2X7 in humans, this cannot be transferred to rodents. Oligo precursor cells (OPC) show intermediate P2X7 expression in humans and rodents

nbs resulted in significantly decreased stroke sizes ( $26.16 \text{ mm}^3 \pm 10.29 \text{ mm}^3$  compared to isotype  $42.02 \text{ mm}^3 \pm 8.49 \text{ mm}^3$ ;  $***p < 0.01$ ; Fig. 5A). This effect was also reflected by the loss of viable tissue ( $22.78\% \pm 8.84\%$  compared to isotype  $38.00\% \pm 8.32\%$ ;  $***p < 0.01$ ; Fig. 5A). Flow cytometry of brain resident microglia of these mice showed a strong signal of the P2X7-specific nbs (Fig. 5B). This signal could not be further increased by ex vivo addition of the P2X7-specific nbs. Functional P2X7 activation after icv injection of nbs was tested by analysis of ATP-induced DAPI uptake (Fig. 5C). Then, 160 min after icv injection of the P2X7-specific nbs, microglia were isolated from the brain and activated by ATP. Microglia exposed to the P2X7-specific nbs in vivo showed substantially lower DAPI uptake. After in vivo icv injection of 30  $\mu\text{g}$  and administration of 0.5 mM ATP 61.9% of the microglia were protected from P2X7 activation and accordingly from DAPI-uptake. As a positive control DAPI-uptake in the absence of nbs and the presence of 0.5 mM ATP was 89.5%. The negative control without any nbs or ATP resulted in a DAPI-uptake of 1.4% (Table 2).

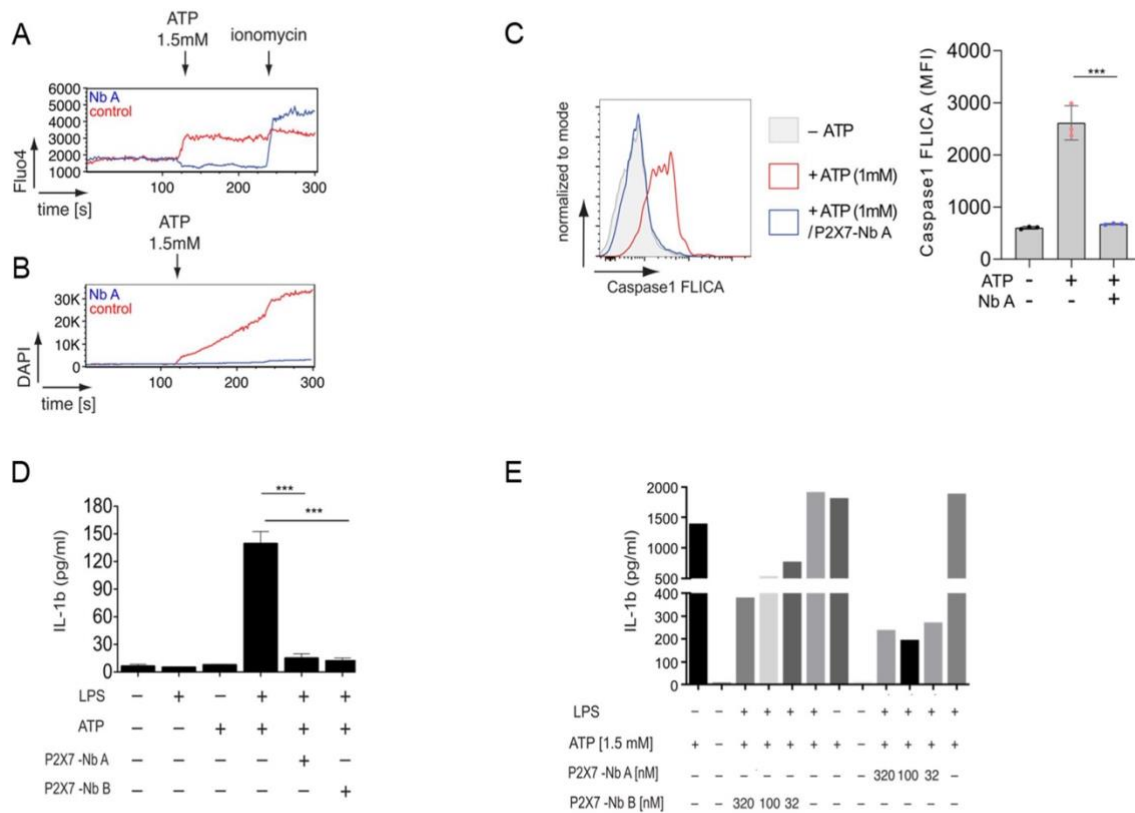
## Discussion

Here, we show that eATP is present early after cerebral ischemia and that blocking the ATP receptor P2X7 with specific nbs diminishes the tissue damage caused by ischemia. However, the nbs need to be injected

intracerebroventricularly to bypass the BBB and reach the P2X7 receptor on brain resident cells.

Mounting evidence indicates that stroke triggers a sterile inflammatory response. The injured tissue releases a myriad of molecules that can activate the surrounding or infiltrating immune cells. Potent activators of local immune responses are danger-associated molecular patterns (DAMPs). Some of these endogenous danger signals can induce activation of the inflammasome and the secretion of proinflammatory cytokines by innate immune cells [4, 38]. Using transgenic mice that express luciferase on the outer layer of the cell membrane, we showed that similar to traumatic brain injury [39], eATP is released very early during ischemic tissue damage. In addition, the signal is sustained over 24 h, clearly indicating an ongoing release of eATP in the ischemic tissue. Therefore, eATP and its cognate receptors likely play an important role in the initiation of the inflammatory reaction following stroke. eATP activates purinergic receptors. While the microglial P2Y12 receptor is important for microglial neuron interactions, the proinflammatory response by microglia is likely triggered by P2X7, which is highly expressed by microglia [40–42].

P2X7 is expressed in the brain mainly on glial cells. Expression data from the Allen Brain Atlas for mice [18] and humans [19] show that the P2X7 receptor is highly expressed by microglia in humans and rodents (Table 1).



**Fig. 3** P2X7-specific nbs influenced the P2X7 pathway in vitro. Primary microglia preincubated with P2X7-specific nbs showed a substantially lower calcium influx (monitored by Fluo4 **A**) and DAPI uptake **B**) than those of the isotype control group after ATP (1.5 mM) challenge. As a positive control, ionomycin facilitated calcium influx across the plasma membrane. **C** In the absence of P2X7-specific nbs, stimulated microglia showed significantly higher caspase 1 activation (measured by the appearance of FAM-FLICA;  $n = 3$ ) than ATP-activated microglia in the presence of these nbs. **D** Blockade of P2X7 by specific nbs dampened IL-1 $\beta$  release in cultured microglia after ATP and LPS stimulation. Both types of P2X7-specific nbs used in this investigation significantly decreased IL-1 $\beta$  release ( $n = 3$ ). The findings in **D** are specified in **E**, showing that IL-1 $\beta$  release can be reduced by using even low doses of nbs. Statistical significance was determined by Student's t test. \*\*\* $p < 0.0001$

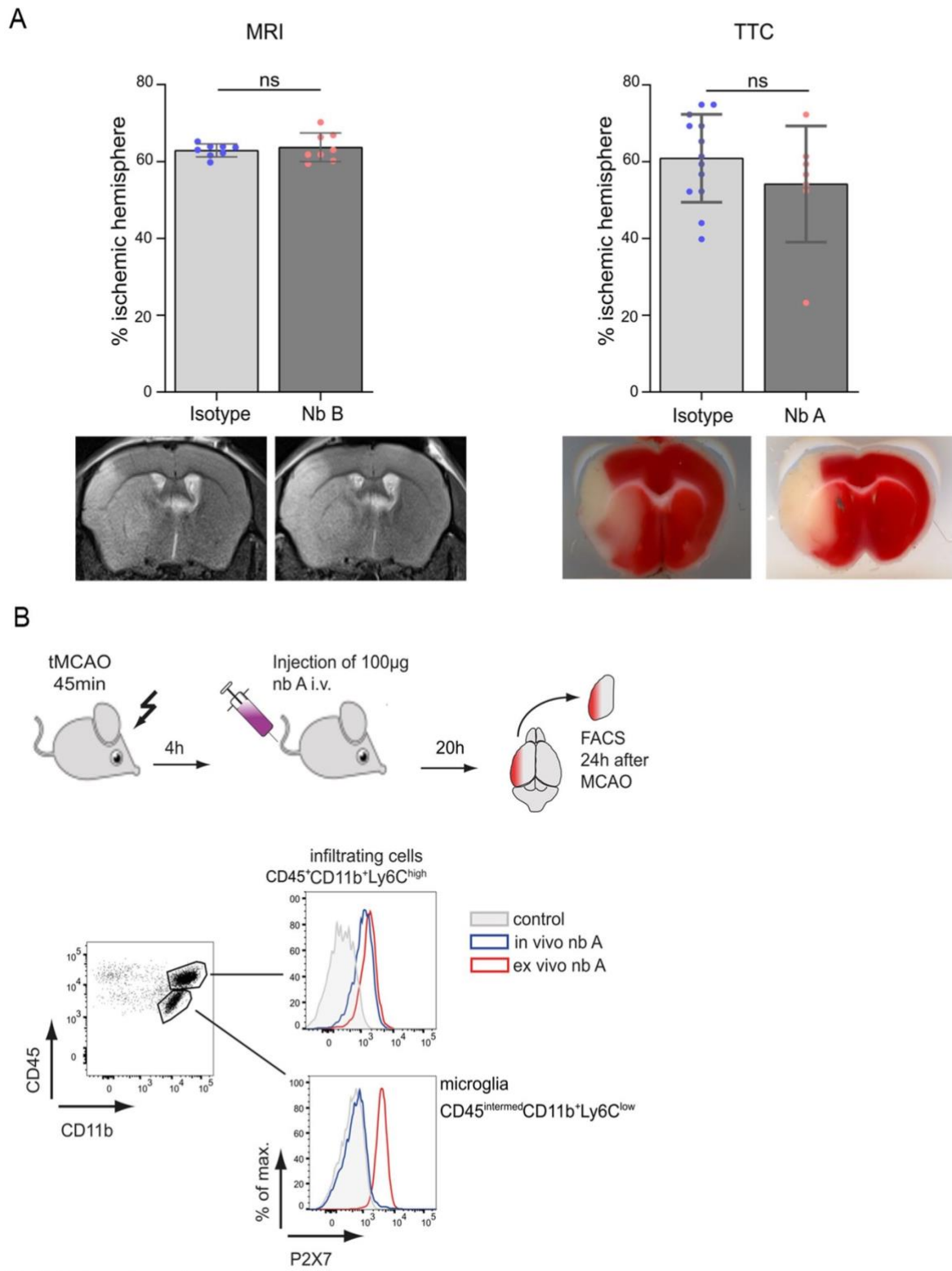
In contrast, astrocytes show low levels of P2X7 RNA. Species-specific differences in P2X7 expression can be found for oligodendrocytes, where P2X7 is highly expressed by human oligodendrocytes but not by murine oligodendrocytes. Therefore, it is likely that in rodents, the main effect of blocking P2X7 is mediated through microglial cells.

After ischemic stroke, the expression of P2X7 is increased on microglia [43, 44] and can induce cell death

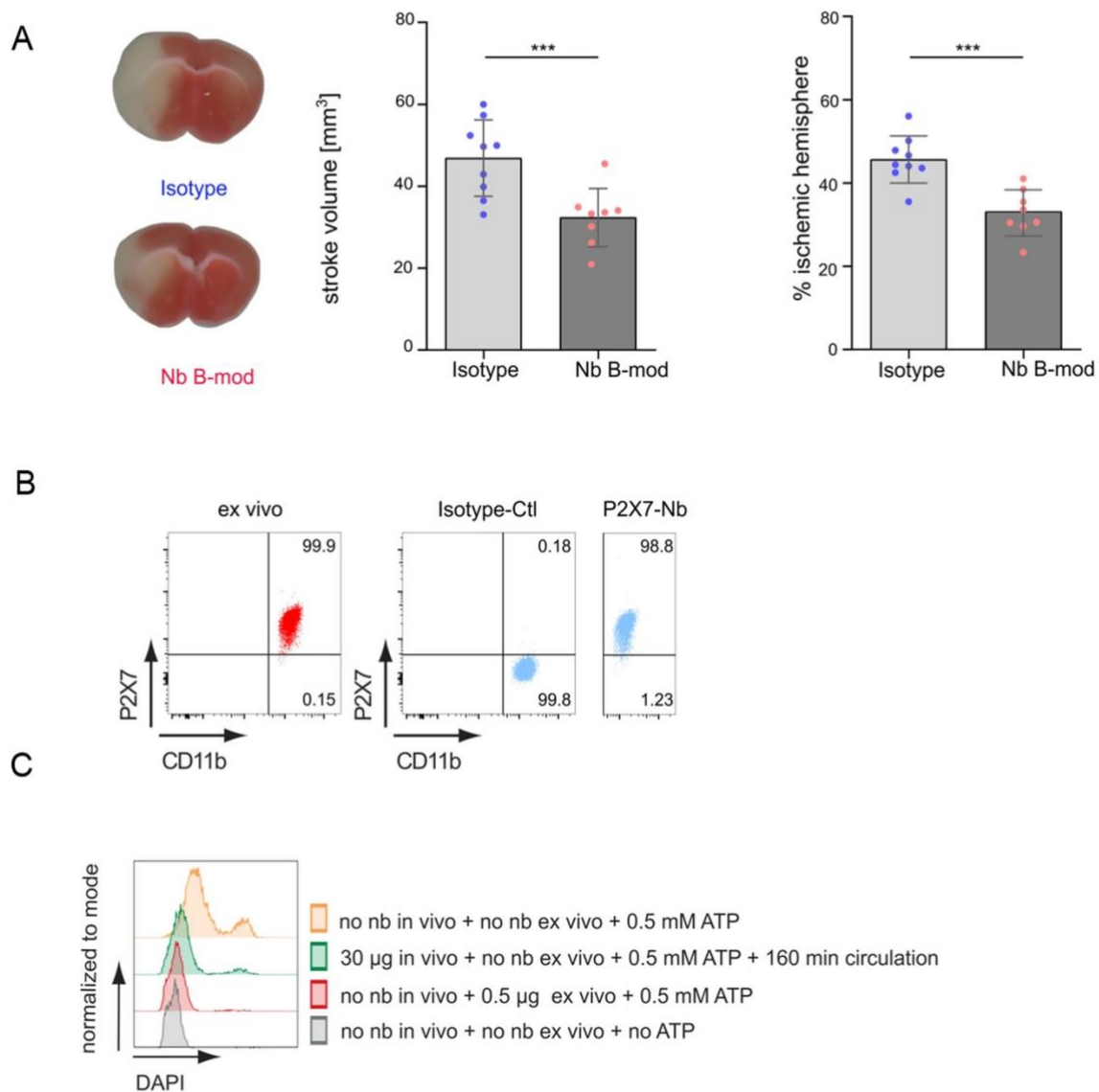
in ischemic microglia [15]. This increase in P2X7 expression is not found in astrocytes after ischemic stroke [17]. We and others have shown that experimental stroke in P2X7-/- mice results in smaller infarcts and that blockade of P2X7 with BBG reduces cerebral ischemic damage [20, 45]. In addition, the inhibition of the NLRP3 inflammasome decreased the amount of damage after cerebral ischemia, but there was no additional benefit if P2X7 was also blocked [20]. These data are still controversial [12].

(See figure on next page.)

**Fig. 4** Intravenously injected P2X7-blocking nbs did not cross the BBB and did not influence stroke size. C57BL/6J mice intravenously received 100  $\mu$ g of P2X7-specific nbs or isotype control nbs after tMCAO surgery. Twenty-four hours after stroke, lesion size was measured via MRI and TTC. Between both groups, the % of parenchymal loss in the ischemic hemisphere did not differ significantly (**A**; TTC: isotype  $n = 13$  vs. P2X7-specific nb  $n = 7$ ; MRI: isotype  $n = 8$  vs. P2X7-specific nb  $n = 8$ ). Statistical significance was determined by Student's t test. **B** For determination of whether nbs cross the BBB, the brains of iv nb-treated mice were analyzed 24 h after treatment and stroke. After injection of 100  $\mu$ g of nbs conjugated with AlexaFluor647, infiltrating macrophages (C; CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>) were covered with P2X7-specific nbs, whereas brain resident microglia (C; CD45<sup>+</sup>CD11<sup>intermedi</sup>Ly6C<sup>low</sup>) did not show any P2X7-specific nb on their surface by flow cytometry. As a positive control, 0.5  $\mu$ g of nb A was added ex vivo



**Fig. 4** (See legend on previous page.)



**Fig. 5** Icv injection of P2X7 nbs significantly reduced stroke size. P2X7-blocking nbs (30 μg) were injected intracerebroventricularly directly before tMCAO surgery of C57BL6J mice. Twenty-four hours after tMCAO, the mice were sacrificed. The mice treated with P2X7-blocking nbs showed significantly smaller ischemic volumes and a significantly smaller % of parenchyma loss in the ischemic hemisphere than the mice treated with a control isotype nbs. **A** Flow cytometry of brain resident microglia showed full coverage by P2X7-specific nbs compared to the controls (gating strategy Additional file 1: Fig. S2). Statistical significance was determined by Student's t test. \*\*\* $p < 0.001$  Data are presented as the median  $\pm$  SD of 8 P2X7-specific nb-injected mice and 9 isotype control-injected mice. **B** Representative TTC staining and representative overlays of stroke volume at 24 h following tMCAO. **C** 160 min after icv injection or ex vivo administration of 30 μg of P2X7-specific nbs, isolated microglia showed substantially lower DAPI uptake. Microglia in the absence of nbs and ATP did not show any DAPI uptake

Yanagisawa and colleagues observed an exacerbation of ischemic brain damage when P2X7 was blocked. Similar findings were also reported by Kang et al. [46], who observed an effect on ciliary neurotrophic factor (CNTF) production but no effect on lesion size. One explanation for these discrepancies is the use of BBG. Small molecule

inhibitors are often semispecific and toxic. In particular, BBG is not specific for P2X7 [47] and is known to have dose-dependent off-target effects. Therefore, we used nbs that we had recently developed and are currently in the process of being patented (see MM; WO/2013/178783) [10]. We not only generated several different families

**Table 2** DAPI-uptake of microglia after icv injection of P2X7 specific nb-B mod

	DAPI negative cells (in %)	DAPI positive cells (in %)
<i>no nb in vivo + no nb ex vivo + no ATP</i>	98.6	1.4
<i>no nb in vivo + 0.5 μg ex vivo + 0.5 mM ATP</i>	83.3	16.7
<i>30 μg in vivo + no nb ex vivo + 0.5 mM ATP + 160 min circulation</i>	61.9	38.1
<i>no nb in vivo + no nb ex vivo + 0.5 mM ATP</i>	10.5	89.5

Functional analysis of P2X7 activation in microglia after icv injection of nbs was tested by checking the ATP-induced DAPI-uptake (Fig. 5C)

of murine P2X7-specific nbs but also different human P2X7-specific nbs. Nbs, recombinant single domain antibodies derived from camelid heavy chain antibodies, are a promising new technology platform. The first nb-based reagents developed by Ablynx-Sanofi have entered clinical trials and have achieved FDA approval (targeting TNF- $\alpha$ , von Willebrand factor, receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B [RANK]-ligand, and IL-6 receptor [48, 49]).

The BBB is a major obstacle for the treatment of brain disease with biologicals. Under healthy conditions, the BBB is only permeable for lipophilic molecules of up to 400 kDa [50]. In addition, the delivery of conventional antibodies to the brain is further hampered by Fc receptor-mediated efflux to the blood [51]. Therefore, nbs lacking an Fc part may reach targets behind the BBB. However, under nonpathological conditions, monovalent nbs do not attain sufficient concentrations for in vivo brain imaging [52] or therapeutic purposes [53]. In stroke, biphasic BBB breakdown is caused by activated matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-3 and MMP-9 [54, 55]. The breakdown of the BBB is initially reversible but is further increased with the release of MMP-3 and MMP-9 [56]. These findings suggest that antibodies or nbs would have easier access to the brain in ischemic stroke. However, as we can show here, only a minor portion of the intravenously injected nbs reached the brain. While macrophages from the bloodstream were quickly covered with intravenously injected nbs, when they reached the brain, microglia did not carry any nbs, and their function was unimpaired (Fig. 4). These findings are similar to observations in antibodies crossing the BBB, where a direct shuttle system such as the transferrin receptor is usually needed to enter the brain [57]. Since this problem prevents noninvasive iv administration of the nbs, it is necessary to find strategies to facilitate the transport of nbs across the BBB. For this study, we chose

to directly inject our nbs into the ventricular system of the brain, which is difficult in the mouse system because of the small volume that can be injected. We were able to modify our nbs so they could be highly concentrated without aggregating (Additional file 1: Fig. S1). In humans, nb delivery would be less of a problem since it could be accomplished by lumbar puncture and injection into the cerebral spinal fluid (CSF). Direct injection in the CSF of therapeutics is already used for other neurological diseases, such as neuronal ceroid lipofuscinosis [58]. Other promising possibilities for nb delivery to the CNS include the fusion of nbs to ligands of brain-endothelial receptors such as ApoE-LDL-receptor or to nbs directed against cell transcytosis receptors on cerebral endothelial cells [59–61].

In stroke, microglia are the first immune cells to respond, while macrophages enter the brain at later stages [32]. Therefore, it is not surprising that there was no difference in ischemic lesion size after iv nb injection, where the nbs could not pass the BBB. In contrast, after an icv injection of P2X7-specific nbs, we could reach up to 95% of the microglia. This level of P2X7R blockade was sufficient to inhibit microglial activation and improve the outcome. Our study shows that inhibition of signaling by eATP is only effective if it is done early and reaches locally expressed P2X7 in the brain.

### Limitations

Our study was a proof-of-concept study, which was not designed to simulate the clinical setting. Further studies are needed to determine whether P2X7-specific nbs improve outcomes after stroke, how they influence long-term outcomes, and if they are similarly effective in female, comorbid and old mice. Our results will have to be reproduced in other laboratories and other model systems before translation.

### Conclusion

Here, we demonstrate the importance of locally produced eATP for the damage in ischemic stroke and the potential of intracerebroventricularly injected P2X7 nbs to reduce this damage.

### Abbreviations

nbs	Nanobodies
wt	Wild-type
tg	Transgenic
tMCAO	Temporary middle cerebral artery occlusion
iv	Intravenous
ip	Intraperitoneal
icv	Intracerebroventricular
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindole
IL	Interleukin
(e)ATP	(Extracellular) adenosine triphosphate
FACS	Fluorescence-activated cell sorting

h	Hours
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
HSP	Heat shock protein
HMGB1	High-mobility group box 1 protein
NFkB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLRP3	Nod-like receptor protein 3
TLR	Toll-like receptors
TNF	Tumor necrosis factor
CNS	Central nervous system
BBG	Brilliant blue G
sdAbs	Single domain antibodies
CDR3	Complementarity determining region 3
(E)GFP	Enhanced green fluorescent protein
CH	Constant domain heavy chain
Ig	Immunoglobulin
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
CCA	Common carotid artery
ECA	External carotid artery
MRI	Magnetic resonance imaging
TTC	Triphenyl tetrazolium chloride
PBS	Phosphate-buffered saline
CD	Cluster of differentiation
BV	Brilliant violet
FLICA	Fluorochrome-labeled inhibitors of caspases
ELISA	Enzyme-linked immunoassay
PFA	Paraformaldehyde
Iba1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
NeuN	Neuronal nuclear protein
BBB	Blood–brain barrier
MFI	Mean fluorescence intensity
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
RNA	Ribonucleic acid
MFCNTF	Ciliary neurotrophic factor
RANK	Receptor activator of nuclear factor k
MMP	Matrix metalloproteinases
CSF	Cerebral spinal fluid
ApoB	Apolipoprotein B
LDL	Low density lipoprotein receptor

## Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02601-z>.

**Additional file 1: Figure S1.** The nbs used and their staining procedure. For this study, different nb constructs were used. The 13A7 nb (P2X7-specific nb; see patent WO/2013/178783; [10]) was fused to the hinge, CH2, and CH3 domains of mouse IgG2c, resulting in a heavy chain format (nb A), whereas 1c81 (P2X7-specific nb; see patent WO/2013/178783 [10]) was dimerized and fused to the albumin-specific nb Alb8 (nb B). To prevent aggregation at high concentrations, we modified nb B (nb B-mod). For recognition of these nbs in FACS, we used the following staining protocols: After binding of nb A to P2X7, cells were stained with a biotinylated anti-mouse IgG2c-fused antibody followed by streptavidin BV421 conjugation. After binding of nb B-mod, cells were stained with an anti-Alb8-nb fused to the mouse IgG1 heavy chain backbone, followed by an anti-mouse IgG1 antibody conjugated with BV421. **Figure S2.** Schematic representation of icv surgery. The cranial burr hole was drilled 1.1 mm lateral and 0.5 mm posterior to bregma. Nbs were injected 2.3 mm deep directly into the left ventricular system. As a proof-of-concept, 2 µl of 5% Evans blue was injected into the ventricular system. Two hours after injection, Evans blue was distributed equally in the whole ventricular system. **Figure S3.** Gating strategy for brain resident microglia. Flow cytometry of brain cells. Three minutes before euthanasia, a CD45-fluorochrome-conjugated antibody was injected intravenously to separate intravascular from intraparenchymal cells. Brain resident microglia were identified as CD45<sup>intemed</sup> CD11b<sup>high</sup> cells, which were not labeled by the intravenously injected CD45-fluorochrome conjugated antibody. **Figure S4.** In vitro calibration of brain homogenates from pmeLUC mice. The panel shows the in vitro calibration of brain homogenates from pmeLUC mice,

showing the luminescence response to the addition of exogenous ATP and the obliteration of luminescence in the presence of the ATP-hydrolyzing enzyme apyrase. With all the caveats due to the in vitro setting, this calibration suggests that the eATP concentration in the stroked brain may reach hundreds of micromoles/L. **Figure S5.** Negative control. In GFP-negative littermates, no P2X7 signal was found. **Figure S6.** High doses of P2X7-blocking nbs are necessary to cross the BBB efficiently. C57BL6J mice received different amounts of nb A intravenously. Four hours after iv injection mice were sacrificed and nbs bound to microglia were labeled by FACS (See MM). Full coverage of P2X7 was reached with 3200 µg, where 1000 µg and lower concentrations achieved less than 60% occupancy of microglial P2X7. These FACS data are representative images of two independent cohorts of 5 mice each. **Figure S7.** Low amounts of icv injected P2X7-blocking nb B-mod showed high P2X7 occupancy on microglia. C57BL6J mice received different amounts of P2X7-specific nbs intracerebroventricularly. 18 h after icv injection mice were sacrificed and nbs bound to microglia were labeled by FACS (See MM). Low amounts of P2X7 blocking nb B-mod were needed to show almost full occupancy of microglial P2X7 receptor. These FACS data are representative images of two independent cohorts of 5 mice each. **Figure S8.** Icv injection of P2X7-blocking nb B-mod resulted in a long time P2X7 occupancy on microglia. C57BL6J mice received 30 µg P2X7-specific nb-B mod intracerebroventricularly. Mice were sacrificed at different time points after icv injection and nbs bound to microglia were labeled by FACS (See MM). After 2.5 h microglial P2X7 showed nearly complete coverage by P2X7 nbs. This high occupancy started to decrease 14 days after the icv injection, but still nearly 40% of microglial P2X7 was occupied after 21 days post icv injection. These FACS data are representative images of two independent cohorts of 6 mice each.

## Acknowledgements

We thank Lennart Pöls and Oliver Schnapauff for excellent technical assistance. We also thank the departments of Radiology and Neuroradiology of the UKE for assistance with the MRI measurements.

## Author contributions

TM, FN, BR, MG, CP and MW designed the study. MW, CP, PL, JS, AL, AN, MG, SF, FDV and BR carried out various experiments and acquired and analyzed the data. MW, TM, MG, CG, ET, FDV, BR, AL, FN wrote the manuscript and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This research was supported by the DFG Research Unit FOR 2879 Immunostroke (projects A1 [4248778651] to TM, A3 [428663564] to TM and AL), SFB 1328 (project A13 to TM and ET, A15 to ET), the 'Hermann und Lilly Schilling Stiftung' to TM and Else-Kröner Stiftung to MW and JS, and by the Italian Association for Cancer Research (AIRC) grant no. IG 22883 to FDV.

## Availability of data and materials

The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Declarations

### Ethics approval and consent to participate

All animal experiments were approved by local animal care committees (Behörde für Justiz und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg; Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen, Hamburg Germany, permission number: 006/18). This was a purely animal study with no involvement of patients.

### Consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.



**Author details**

<sup>1</sup>Department of Neurology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany. <sup>2</sup>Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany. <sup>3</sup>Institute for Stroke and Dementia Research, University Medical Center, 81377 Munich, Germany. <sup>4</sup>SyNergy Cluster for Systems Neurology, 81377 Munich, Germany. <sup>5</sup>Walther Straub Institute of Pharmacology and Toxicology, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany. <sup>6</sup>Department of Medical Sciences, University of Ferrara, Ferrara, Italy.

Received: 17 November 2021 Accepted: 25 September 2022

Published online: 12 October 2022

**References**

- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999;22:391–7.
- Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol.* 2006;66:232–45.
- Jones KA, Maltby S, Plank MW, Kluge M, Nilsson M, Foster PS, Walker FR. Peripheral immune cells infiltrate into sites of secondary neurodegeneration after ischemic stroke. *Brain Behav Immun.* 2018;67:299–307.
- Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28:465–72.
- Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol.* 2016;16:407–20.
- Gelderblom M, Sobey CG, Kleinschnitz C, Magnus T. Danger signals in stroke. *Ageing Res Rev.* 2015;24:77–82.
- Rissiek B, Haag F, Boyer O, Koch-Nolte F, Adriouch S. P2X7 on Mouse T cells: one channel many functions. *Front Immunol.* 2015;6:204.
- Hattori M, Gouaux E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature.* 2012;485:207–12.
- Kasuya G, Yamaura T, Ma XB, Nakamura R, Takemoto M, Nagumo H, Tanaka E, Dohmae N, Nakane T, Yu Y, et al. Structural insights into the competitive inhibition of the ATP-gated P2X receptor channel. *Nat Commun.* 2017;8:876.
- Danquah W, Meyer-Schwesinger C, Rissiek B, Pinto C, Serracant-Prat A, Amadi M, Iacenda D, Knop JH, Hammel A, Bergmann P, et al. Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci Transl Med.* 2016;8:366–462.
- Munoz-Planillo R, Kuffa P, Martinez-Colon G, Smith BL, Rajendiran TM, Nunez G. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity.* 2013;38:1142–53.
- Yanagisawa D, Kitamura Y, Takata K, Hide I, Nakata Y, Taniguchi T. Possible involvement of P2X7 receptor activation in microglial neuroprotection against focal cerebral ischemia in rats. *Biol Pharm Bull.* 2008;31:1121–30.
- Janks L, Sharma CVR, Egan TM. A central role for P2X7 receptors in human microglia. *J Neuroinflamm.* 2018;15:325.
- He Y, Taylor N, Fourgeaud L, Bhattacharya A. The role of microglial P2X7: modulation of cell death and cytokine release. *J Neuroinflamm.* 2017;14:135.
- Eyo UB, Miner SA, Ahlers KE, Wu LJ, Dailey ME. P2X7 receptor activation regulates microglial cell death during oxygen-glucose deprivation. *Neuropharmacology.* 2013;73:311–9.
- Hirayama Y, Anzai N, Koizumi S. Mechanisms underlying sensitization of P2X7 receptors in astrocytes for induction of ischemic tolerance. *Glia.* 2021;69:2100–10.
- Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci.* 2012;32:6391–410.
- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature.* 2007;445:168–76.
- Hodge RD, Bakken TE, Miller JA, Smith KA, Barkan ER, Grayback LT, Close JL, Long B, Johansen N, Penn O, et al. Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature.* 2019;573:61–8.
- Cisneros-Mejorado A, Gottlieb M, Cavaliere F, Magnus T, Koch-Nolte F, Scemes E, Perez-Samartin A, Matute C. Blockade of P2X7 receptors or pannexin-1 channels similarly attenuates postischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015;35:843–50.
- Menzel S, Schwarz N, Haag F, Koch-Nolte F. Nanobody-based biologics for modulating purinergic signaling in inflammation and immunity. *Front Pharmacol.* 2018;9:266.
- Hu Y, Liu C, Muijldermans S. Nanobody-based delivery systems for diagnosis and targeted tumor therapy. *Front Immunol.* 2017;8:1442.
- Rissiek B, Koch-Nolte F, Magnus T. Nanobodies as modulators of inflammation: potential applications for acute brain injury. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:344.
- De Genst E, Saerens D, Muijldermans S, Conrath K. Antibody repertoire development in camelids. *Dev Comp Immunol.* 2006;30:187–98.
- Koch-Nolte F, Reyelt J, Schossow B, Schwarz N, Scheuplein F, Rothenburg S, Haag F, Alzogaray V, Cauerhff A, Goldbaum FA. Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in vivo. *FASEB J.* 2007;21:3490–8.
- Ingram JR, Schmidt FI, Ploegh HL. Exploiting Nanobodies' Singular Traits. *Annu Rev Immunol.* 2018;36:695–715.
- Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauerhff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F, et al. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol.* 2009;198:157–74.
- Kaczmarek-Hajek K, Zhang J, Kopp R, Grosche A, Rissiek B, Saul A, Bruzzone S, Engel T, Jooss T, Krautloher A, et al. Re-evaluation of neuronal P2X7 expression using novel mouse models and a P2X7-specific nanobody. *Elife.* 2018;7:67.
- Csoka B, Nemeth ZH, Szabo I, Davies DL, Varga ZV, Paloczi J, Falzoni S, Di Virgilio F, Muramatsu R, Yamashita T, et al. Macrophage P2X4 receptors augment bacterial killing and protect against sepsis. *JCI Insight.* 2018;3:89.
- Jager V, Bussow K, Wagner A, Weber S, Hust M, Frenzel A, Schirrmann T. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* 2013;13:52.
- Tijink BM, Laeremans T, Budde M, Stigter-van Walsum M, Dreier T, de Haard HJ, Leemans CR, van Dongen GA. Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology. *Mol Cancer Ther.* 2008;7:2288–97.
- Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, Arumugam TV, Orthey E, Gerloff C, Tolosa E, Magnus T. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke.* 2009;40:1849–57.
- Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, Velden J, Arunachalam P, Steinbach K, Orthey E, Arumugam TV, Leyboldt F, Simova O, et al. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood.* 2012;120:3793–802.
- Lourbopoulos A, Mamrak U, Roth S, Balbi M, Shrouder J, Liesz A, Hellal F, Plesnila N. Inadequate food and water intake determine mortality following stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37:2084–97.
- Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Muller C, Kluge A, Bachmann A, Fisher M, Kaps M, Bachmann G. Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke.* 2004;35:566–71.
- Grabert K, Michoel T, Karavolos MH, Clohisey S, Baillie JK, Stevens MP, Freeman TC, Summers KM, McColl BW. Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat Neurosci.* 2016;19:504–16.
- Pellegatti P, Falzoni S, Pinton P, Rizzuto R, Di Virgilio F. A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion. *Mol Biol Cell.* 2005;16:3659–65.
- Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:201–12.
- Farooqi AH, Lim MJ, Kee EC, Lee JH, Burgess JD, Chen R, Di Virgilio F, Delenclos M, McLean PJ. In vivo detection of extracellular adenosine triphosphate in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2021;38:655–64.
- Cserep C, Posfai B, Lenart N, Fekete R, Laszlo ZI, Lele Z, Orsolits B, Molnar G, Heindl S, Schwarcz AD, et al. Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions. *Science.* 2020;367:528–37.
- Di Virgilio F, Sarti AC, Grassi F. Modulation of innate and adaptive immunity by P2X ion channels. *Curr Opin Immunol.* 2018;52:51–9.

42. Linden J, Koch-Nolte F, Dahl G. Purine release, metabolism, and signaling in the inflammatory response. *Annu Rev Immunol*. 2019;37:325–47.
43. Skaper SD. Ion channels on microglia: therapeutic targets for neuroprotection. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2011;10:44–56.
44. Franke H, Gunther A, Grosche J, Schmidt R, Rossner S, Reinhardt R, Faber-Zuschratter H, Schneider D, Illes P. P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004;63:686–99.
45. Arbeloa J, Perez-Samartin A, Gottlieb M, Matute C. P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia. *Neurobiol Dis*. 2012;45:954–61.
46. Kang SS, Keasey MP, Hagg T. P2X7 receptor inhibition increases CNTF in the subventricular zone, but not neurogenesis or neuroprotection after stroke in adult mice. *Transl Stroke Res*. 2013;4:533–45.
47. Jiang L-H, Mackenzie AB, North RA, Surprenant A. Brilliant Blue G Selectively Blocks ATP-Gated Rat P2X7 Receptors. *Mol Pharmacol*. 2000;58:82–8.
48. Ulrichts H, Silence K, Schoolmeester A, de Jaegere P, Rossenu S, Roodt J, Priem S, Lauwereys M, Casteels P, Van Bockstaele F, et al. Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared with currently marketed antiplatelet drugs. *Blood*. 2011;118:757–65.
49. Scully M, Cataland SR, Peyvandi F, Coppo P, Knobl P, Kremer Hovinga JA, Metjian A, de la Rubia J, Pavenski K, Callewaert F, et al. Caplacizumab treatment for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 2019;380:335–46.
50. Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32:1959–72.
51. Cooper PR, Ciambone GJ, Kliwinski CM, Maze E, Johnson L, Li Q, Feng Y, Hornby PJ. Efflux of monoclonal antibodies from rat brain by neonatal Fc receptor FcRn. *Brain Res*. 2013;1534:13–21.
52. Nabuurs RJ, Rutgers KS, Welling MM, Metaxas A, de Backer ME, Rotman M, Bacskaï BJ, van Buchem MA, van der Maarel SM, van der Weerd L. In vivo detection of amyloid-beta deposits using heavy chain antibody fragments in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *PLoS ONE*. 2012;7: e38284.
53. Caljon G, Cavellers V, Lahoutte T, Stijlemans B, Ghassabeh GH, Van Den Abbeele J, Smolders I, De Baetselier P, Michotte Y, Muyldermans S, et al. Using microdialysis to analyse the passage of monovalent nanobodies through the blood-brain barrier. *Br J Pharmacol*. 2012;165:2341–53.
54. Ludewig P, Sedlacik J, Gelderblom M, Bernreuther C, Korkusuz Y, Wagener C, Gerloff C, Fiehler J, Magnus T, Horst AK. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 inhibits MMP-9-mediated blood-brain-barrier breakdown in a mouse model for ischemic stroke. *Circ Res*. 2013;113:1013–22.
55. Yang Y, Rosenberg GA. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke*. 2011;42:3323–8.
56. Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernandez-Guillamon M, Lo EH, Montaner J. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke*. 2008;39:1121–6.
57. Lee HJ, Engelhardt B, Lesley J, Bickel U, Pardridge WM. Targeting rat anti-mouse transferrin receptor monoclonal antibodies through blood-brain barrier in mouse. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;292:1048–52.
58. Worgall S, Sondhi D, Hackett NR, Kosofsky B, Kekatpure MV, Neyzi N, Dyke JP, Ballon D, Heier L, Greenwald BM, et al. Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA. *Hum Gene Ther*. 2008;19:463–74.
59. Sarkar G, Curran GL, Mahlum E, Decklever T, Wengenack TM, Blahnik A, Hoesley B, Lowe VJ, Poduslo JF, Jenkins RB. A carrier for non-covalent delivery of functional beta-galactosidase and antibodies against amyloid plaques and IgM to the brain. *PLoS ONE*. 2011;6: e28881.
60. Muruganandam A, Tanha J, Narang S, Stanimirovic D. Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transigrate across human blood-brain barrier endothelium. *FASEB J*. 2002;16:240–2.
61. Abulrob A, Sprong H. The blood-brain barrier transigrating single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J Neurochem*. 2005;95:1201–14.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



## 2 Einleitung

Der Schlaganfall stellt statistisch mit 6,6 Mio. Toten und 12,2 Mio. Neuerkrankungen pro Jahr die zweithäufigste Todesursache und die dritthäufigste Ursache für Behinderungen weltweit dar (Collaborators, 2019; V. L. Feigin et al., 2022; Sacco et al., 2013). Zurzeit leben weltweit 101 Mio. Menschen mit den Folgen eines erlebten Schlaganfalls; eine von vier Personen über 25 Jahren erleidet in ihrem Leben einen Schlaganfall (Owolabi et al., 2022). Folgeschwer sind insbesondere arterielle Schlaganfälle, die im Fokus dieser Arbeit stehen.

Klinisch äußern sich arterielle Schlaganfälle vor allem durch einen plötzlichen Verlust der neurologischen Funktion von Hirn, Retina oder des Rückenmarks aufgrund einer Ischämie oder einer intrazerebralen Blutung (99 %) (Benjamin et al., 2019; Zerna, Thomalla, Campbell, Rha, & Hill, 2018). Seltener (1 %, v.a. in der Perinatalphase) und auch weniger akut kann ein venöses Geschehen infolge einer zentralen Venenthrombose Ursache der neurologischen Funktionsstörung sein (Dunbar & Kirton, 2019; Pare & Kahn, 2012). Dies wird in vorliegender Arbeit nicht weiter in den Blick genommen. Arterielle Schlaganfallsyndrome zeichnen sich vor allem durch ihr plötzliches Auftreten ab. Sie lassen sich in eine ischämische und eine hämorrhagische Entität unterscheiden.

Heutzutage stellen sich zwei konkrete Hauptfragen in der Schlaganfallbehandlung. Einerseits fehlen Bildgebungen, um Ischämien und Blutungen in Echtzeit zu detektieren und deren Verlauf ebenso zu beobachten. Des Weiteren ist der Pathomechanismus bisher noch nicht vollkommen verstanden. Ein genaueres Verständnis des Pathomechanismus ermöglicht eine zielgerichtete Therapie des Schlaganfalls und seiner Folgen.

Diese Hauptfragen stellten für mich die Basis meiner Forschungsthemen dar.

Mit 10 – 15 % stellt die intrazerebrale Blutung (ICB) nicht die häufigste Schlaganfallentität dar, jedoch ist sie mit einer extrem hohen Morbidität und Mortalitätsrate sowie einer schlechteren Prognose als ihr ischämisches Analogon verbunden (Valery L. Feigin, Lawes, Bennett, Barker-Collo, & Parag, 2009; Weimar & Kleine-Borgmann, 2017). Sowohl für die ischämische Entität als auch für die ICB sind vertrauenswürdige und praktische Methoden zum kontinuierlichen, nicht-invasiven Monitoring der zerebralen Perfusion und des intrakraniellen Hämatoms notwendig. Im Jahr 2017 konnten in diesem Zusammenhang Ludewig et al. zeigen, dass bei einem ischämischen Schlaganfall eine qualitativ mit dem MRT vergleichbare Echtzeit-Darstellung des Perfusionsdefizits mittels **Magnetpartikelbildgebung (MPI)** möglich ist, und somit die MPI als potentielle moderne Bildgebung aufführen (Ludewig et al., 2017). Die MPI ist ein strahlungsfreies tomographisches Bildgebungsverfahren, welches superparamagnetische Eisenoxidpartikel (SPIOs) nutzt, um dreidimensionale volumetrische Bilder mit einer hohen zeitlichen Auflösung darzustellen (Gleich & Weizenecker, 2005). Bis jetzt unklar ist jedoch, ob mithilfe des MPIs auch eine Echtzeit-Darstellung einer ICB möglich ist. Um eine adäquate Darstellung der Blutung im MPI zu ermöglichen, müssen sich die SPIOs in der

Blutung anreichern. Diesem Thema habe ich einen Teil meiner Doktorarbeit gewidmet. Folgend auf die experimentelle Induktion einer intrazerebralen Blutung im murinen Modell erfolgte die intravenöse Applikation von SPIOs, woraufhin die entstehende Blutung in der MPI nachvollzogen wurde.

Mit 62 % stellt die arterielle Ischämie den größten Anteil der arteriellen Schlaganfallsyndrome dar (V. L. Feigin et al., 2022). Wie schon vorher angeführt, ist leider bis heute die vollständige **Pathophysiologie** des Schlaganfalls nicht ganzheitlich verstanden.

Die Folgen eines ischämischen Schlaganfalls stellen sich nach heutigem Stand wie folgt dar. Pathophysiologisch führt die fokale Beeinträchtigung der Hirndurchblutung zu einer mangelnden Zufuhr von für die Hirnzellen überlebenswichtigen Substraten wie Sauerstoff und Glukose und somit zu einer Beeinträchtigung der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase und ihres Ionengradienten (Martin, Lloyd, & Cowan, 1994). In der Folge kommt es zu einem Zusammenbruch des Ionengradienten mit Depolarisierung von insbesondere Neuronen und Gliazellen mit anschließender Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren wie Glutamat, welches eine Depolarisation umgebender Zellen wieder neu initiiert (Dirnagl, Iadecola, & Moskowitz, 1999; Katsura, Kristian, & Siesjo, 1994). Die daraus resultierende Exzitationswelle verursacht durch die Aktivierung von proteolytischen Enzymen und einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine Schädigung von intra- und extrazellulären Strukturen (Huang, Upadhyay, & Tamargo, 2006; Orellana-Urzu, Rojas, Libano, & Rodrigo, 2020).

Diese initiale Schädigung des hypoxischen Gewebes stellt den Beginn einer sterilen Entzündung dar, welche die ursprüngliche Hirnschädigung und die neurologische Funktionsfähigkeit negativ beeinflusst (Dirnagl et al., 1999; Huang et al., 2006).

In diesem hypoxischen Gewebe werden folgend zahlreiche Mediatoren freigesetzt, die Zellen wie Mikroglia des umliegenden Gewebes aktivieren und zur Infiltration anderer Immunzellen wie neutrophiler Granulozyten führen (Jones et al., 2018). Zu jenen Mediatoren gehören vor allem Adenosintriphosphat (ATP) sowie Nicotinamodadeninnucleotid (NAD), Hitzeschockproteine (HSP) und das High-Mobility-Group-Box-1-Protein (HMGB1). Durch die Bindung an spezifische Rezeptoren von Zellen des angeborenen Immunsystems können diese Faktoren eine Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen auslösen, welche die Entzündungskaskade im Weiteren verstärken (Broz & Dixit, 2016; Di Virgilio, 2007). Wichtige Vertreter jener Signalkaskaden sind der ATP/P2X7 Signalweg oder der Nuklearfaktor-Kappa-Light-Chain- Enhancer of Activated B Cells (NF $\kappa$ B) (Gelderblom, Sobey, Kleinschnitz, & Magnus, 2015).

Der **P2X7-Rezeptor** ist ein homotrimerer, liganden-aktivierter nicht-selektiver Kationenkanal, welcher sowohl auf Zellen des ZNS als auch auf Zellen des Immunsystems exprimiert ist

(Rissiek, Haag, Boyer, Koch-Nolte, & Adriouch, 2015). Morphologisch besteht er aus drei gleichartigen Polypeptid-Untereinheiten mit jeweils zwei Transmembrandomänen (Hattori & Gouaux, 2012; Kasuya et al., 2017). Im zentralen Nervensystem (ZNS) zeigt er die höchste Expressionsdichte auf Mikroglia, weniger auf Astrozyten und Oligodendrozyten (Hirayama, Anzai, & Koizumi, 2021; Janks, Sharma, & Egan, 2018; Yanagisawa et al., 2008; Zamanian et al., 2012).

Infolge der Aktivierung des P2X7 Kanals durch extrazelluläres ATP (eATP) formen die drei Untereinheiten einen für Ionen durchlässigen Kanal, woraufhin  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle einströmen und  $\text{K}^+$  aus der Zelle herausströmen. Neben der Initialisierung der  $\text{Ca}^{2+}$  Signalkaskade bedingt der  $\text{K}^+$ -Ausstrom durch den P2X7-Kanal die Formation des Nod-like receptor protein 3 (NLRP3)-Inflammasomkomplexes. Im Zuge der Aktivierung des Inflammasomkomplexes kommt es zu einer Spaltung der pro-Caspase 1 zur aktiven Caspase 1, welche selbst wiederum die Vorstufen pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 in deren biologisch aktive Form spaltet (Broz & Dixit, 2016; Danquah et al., 2016; Munoz-Planillo et al., 2013). Anschließend werden diese proinflammatorischen Zytokine freigesetzt und bewirken ebenfalls eine Verstärkung des sterilen Entzündungsreizes (Broz & Dixit, 2016).

Speziell IL-1 $\beta$  scheint in diesem Zusammenhang pleiotrope Effekte zu haben. Durch die Funktion als Chemokin und als Zytokin lockt IL-1 $\beta$  einerseits Zellen wie neutrophile Granulozyten in die Region der Ischämie, andererseits aktiviert es weitere Zellen des angeborenen Immunsystems wie Mikroglia und führt zur Freisetzung von potenziell neurotoxischen Mediatoren wie dem Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und iNOS mit konsekutiv induzierter Apoptose der Neuronen (Jia et al., 2022; Zhu et al., 2022). Die Menge der intrazellulär gespeicherten Interleukin-Vorstufen hängt zudem noch von weiteren Signalen durch Toll-like-Rezeptoren (TLRs) oder TNF-Rezeptoren ab sowie von einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (Liu et al., 2015; Zhu et al., 2022).

Der Einfluss des P2X7-Rezeptors auf die Läsionsgröße des experimentell evozierten ischämischen Schlaganfalls konnte schon in der Vergangenheit durch verschiedene Studien gezeigt werden. So ist belegt, dass im experimentellen Setting P2X7-KO Mäuse kleinere Läsionsgrößen nach der induzierten Ischämie zeigten im Vergleich zu Mäusen des genetischen Wildtyps (Cisneros-Mejorado et al., 2015). Zudem zeigte dieselbe Studie, dass eine unspezifische Blockade des P2X7-Kanals mit einem niedermolekularen Inhibitor wie Brilliant Blue G (BBG) die Folgen des ischämischen Schlaganfalls abschwächt. Jedoch ist BBG aufgrund seiner unspezifischen Bindung an P2X-Rezeptoren und seiner Toxizität kein adäquater Kandidat für eine klinische Anwendung.

Eine spezifische Bindung an den P2X7-Rezeptor können **Nanobodies (Nbs)** gewährleisten, ohne weitere Nebeneffekte zu zeigen. Nanobodies sind benannt nach ihrer geringen Größe mit 2,5 nm Durchmesser, 4 nm Höhe und einem Volumen von 12 kDa (Hu, Liu, &

Muyldermans, 2017). Sie sind Einzeldomän-Antikörper, welche von der schweren Kette der Kameliden-Antikörper abgeleitet sind. Im Gegensatz zu den niedermolekularen Inhibitoren wie BBG zeigen Nbs eine geringe Toxizität bei hoher Spezifität dadurch geringere Nebeneffekte. Zudem erlauben sie eine weitaus potentere Inhibition des P2X7-Kanals (Danquah et al., 2016; Menzel, Schwarz, Haag, & Koch-Nolte, 2018; Rissiek, Koch-Nolte, & Magnus, 2014). Mit ihrer langen komplementären complementarity-determining-region 3 (CDR3) Region ist es Nbs möglich, an kleine Bereiche von Membranproteinen zu binden, welche normalen Antikörpern oft nicht zugänglich sind (De Genst, Saerens, Muyldermans, & Conrath, 2006; Koch-Nolte et al., 2007). Weitere Vorteile von Nbs gegenüber konventionellen Antikörpern sind ihre hohe Stabilität, ihre bessere Löslichkeit sowie ihre schnelle und zielgerichtete in vivo Distribution. Zudem sind sie einfach und ökonomisch produzierbar (Ingram, Schmidt, & Ploegh, 2018). Neben der Möglichkeit, Nb-Multimere zu bilden, können Nbs auch mit anderen Konstrukten, wie zum Beispiel der Fc-Domäne eines konventionellen Antikörpers, fusioniert werden. Hierdurch lassen sich ihre Eigenschaften mit der Fc-vermittelten Effektorfunktion, einschließlich Fc-Rezeptorbindung, verlängerter Halbwertszeit und Komplementaktivierung verbinden. Somit können Nbs als potentiell Therapeutikum viel spezifischer an die Pathophysiologien einzelner Entitäten angepasst werden als herkömmliche Antikörper (Kaczmarek-Hajek et al., 2018).

In dem Hauptteil meiner Doktorarbeit beschäftige ich mich mit dem Effekt von P2X7-spezifischen Nbs auf die Läsionsgröße des ischämischen Schlaganfalls. Hierzu gehört ebenfalls eine genauere Analyse der Biodistribution mit verschiedenen Methoden der Administration sowie das Detektieren der Nbs auf verschiedenen Zellen.

## 3 Methoden

### **Tiere**

Alle Tierversuche in dieser Studie wurden von den lokalen Behörden genehmigt und Tiere wurden nach der Leitlinie für die Haltung von Labortieren gehalten (NIH Publication No. 83-123, erneuert 1996). Nur 12 bis 18 Wochen alte männliche Mäuse wurden für diese Studie verwendet. Wildtypen wurden von Charles River (Bar Harbor, ME 04609, USA) erworben. Die Züchtung der pmeLUC transgenen und P2X7- enhanced green fluorescent protein (EGFP) transgenen Mäusen wurde bereits in der Literatur beschrieben (Csoka et al., 2018; Kaczmarek-Hajek et al., 2018).

### **Experimentelle Induktion einer intrazerebralen Blutung**

Die intrazerebrale Blutung wurde nach dem etablierten Kollagenase-Injektionsmodell induziert. Es wurde ein kraniales Loch mit einem Durchmesser von 1 mm 2,3 mm lateral, 0,2 mm anterior zu Bregma und 3,7 mm tief in das linke Striatum eingeführt. Nach einer Reexpansionszeit von 5 Minuten wurden 0,5 µl bakterieller Kollagenase (0,075 Units) mit einer Laufrate von 0,5 µl/min injiziert mit einer folgenden Distributionszeit von 10 Minuten.

### **Magnetpartikelbildung**

Die 2005 durch Gleich und Weizenecker vorgestellte Magnetpartikelbildung ist eine auf Tracer basierende Bildgebung, die durch externe Magnetfelder feldfreie Punkte entlang einer 3D-Bildgebungsbahn zur räumlichen Kodierung mit einer zeitlichen Auflösung von 21,54 ms pro Bildgebungsvolumen nutzt. Wir nutzten für die MPI Experimente einen präklinischen tomographischen MPI-Scanner (Bruker, Deutschland) sowie die SPIOs Perimag und Synomag-D (Micromod GmbH, Deutschland) als Tracer. Der Tracer wurde intravenös über eine programmierbare Spritzenpumpe (Aladdin, World Precisions Instruments, USA) injiziert. Konzentration und Volumen der injizierten SPIOs können aus der Originalpublikation entnommen werden (siehe Suppl. Abb. 1 aus Szwargulski et al., 2020). Als morphologische Referenz der MPI-Messung führten wir zusätzlich postmortale MRT-Messungen des Kopfes mit einem 1-T-Kleintier-MRT durch (Bruker BioSpin MRI, Ettlingen, Deutschland).

### **Histologie zur Darstellung der SPIOs im Hirn im Zuge der MPI-Messung bei ICB**

Zur Visualisierung der SPIOs im Hirn wurden die Hirne in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend in koronare 10 µm Schnitte geschnitten. Anschließend erfolgte eine Färbung mit einem Eisenfärbungskit nach Anleitung des Herstellers (HT20-1KT, Sigma-Aldrich, USA).

### **Produktion der P2X7-spezifischen Nbs**

Den P2X7-Rezeptor blockierende Nanobodies 13A7 und 1c81 wurden in pCSE2.5 Expressionsvektoren kloniert (Danquah et al., 2016; Kaczmarek-Hajek et al., 2018; Tijink et al., 2008). Für den verwendeten Nb A wurde 13A7 an die konstante Domäne der schweren Kette des Maus-Immunglobulin IgG2c fusioniert. Für den verwendeten Nb B wurde 1c81 dimerisiert und mit einem Albumin-spezifischen Nb Alb8 (mAb77) fusioniert, wodurch ein bispezifisches heterotrimes Nanobody-Konstrukt mit einer verlängerten Halbwertszeit entstand. Um eine hohe Konzentrierbarkeit ohne Aggregation des Nb B zu realisieren, wurden weitere Modifikationen hinzugefügt, sodass sich der daraus entstandene Nb B-mod, ohne zu aggregieren, auf bis zu 15 g/L konzentrieren ließ. Konstrukte wurden anschließend in HEK-6E Zellen produziert und aus dem Zellüberstand durch Affinitätschromatographie an einer Protein-G-Sepharosesäule aufgereinigt. Der Puffer wurde anschließend über eine PD-10-Säule ausgetauscht. Eine genaue Darstellung der unterschiedlich verwendeten Nbs ist im Anhang der Publikation dargestellt (siehe Suppl. Abbl. 1 aus Wilmes et al., 2022).

### **tMCAO-Operation und Analyse der Läsionsgröße**

Zur Induzierung eines ischämischen Schlaganfalls wurde das bereits beschriebene Modell der temporären Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) mit einer Okklusionszeit von 40 Minuten verwendet (Gelderblom et al., 2009; Gelderblom et al., 2012). Die Qualität der Okklusion würde über ein Laser-Doppler Monitor überwacht (moorVMS-LDF; Moor Instruments, UK). Mäuse mit einer Okklusionsrate unter 80% wurden aus der Studie herausgenommen. Die Größe des ischämischen Parenchyms würde mit Hilfe einer Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid Färbung sowie einer Magnetresonanztomographie eines 7-Tesla Kleintier-MRTs (ClinScan Bruker, Ettlingen, Deutschland) bestimmt und anschließend via NIH ImageJ berechnet.

### **In vivo ATP-Messung nach tMCAO-OP mittels pmeLUC-Tg Mäusen**

Zur Darstellung der in vivo ATP-Freisetzung nach der Induktion eines ischämischen Schlaganfalls wurde pmeLUG-transgenen Mäusen drei Stunden vor der Okklusionsbehandlung 150 mg/kg luciferin (Promega) intraperitoneal injiziert und dies vor jeder weiteren Messung wiederholt. Die in vivo ATP-Freisetzung wurde anschließend mittels einer Ganzkörper-Luminometrie unter Verwendung des IVIS Perkin Elmer in-vivo-Bildgebungssystems registriert.

### **Histologie zur Darstellung des P2X7-Kanals auf murinen Mikroglia**

Zur histologischen Visualisierung des P2X7-Kanals auf murinen Mikroglia wurden P2X7-EGFP Mäuse genutzt. Hierzu wurden die Mäuse mit 4 % PFA fixiert und anschließend histologische Schnitte angefertigt. Zur Identifizierung der Mikroglia wurde ein Anti-IbA1 Antikörper (Fujifilm



Wako Pure Chemical Corporation) genutzt, wobei zum Nachweis von Neuronen ein Anti-Neuronales Nukläres Protein (NeuN) – Antikörper (Thermo Fisher Scientific) verwendet wurde. Eine Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI (Thermo Fischer Scientific).

### **Intravenöse und intrazerebroventrikuläre Administration von Nbs**

Zur Administration von P2X7-spezifischen Nbs wurden zwei verschiedene Wege genutzt. Zur Bestimmung des Einflusses von i.v. injizierten P2X7-Nbs auf die Läsionsgröße wurde der Nb A 100 µg in 100 µl phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) intravenös injiziert, andererseits wurde der Nb B-mod bzw. ein isotypischer Kontrollnanobody mit 30 µg in 2 µl PBS mit 60 mg/ml Trehalose und 0,4 mg/ml Tween-20 intrazerebroventrikulär injiziert. Bei anschließender genauer Bestimmung der Biodistribution der Nbs nach i.v. Gabe wurden verschiedene Konzentrationen der Nbs bis hin zu 3200 µg jeweils in 100 µl intravenös appliziert. Zur intrakraniellen Administration wurde ein kraniales Loch mit einem Durchmesser von 0,9 mm 1,1mm lateralen, 0,5 mm posterior zu Bregma und 2,3 mm tief in den linken Ventrikel eingeführt. Nach einer Reexpansionszeit von 5 Minuten wurden verschiedene Mengen von P2X7-Nbs von 1 µg bis 100 µg in 2 Minuten über 1 µl/min injiziert mit einer folgenden Distributionszeit von 10 Minuten. Bei der in vivo Analyse der Läsionsgröße nach vorheriger intrazerebroventrikulärer Applikation von P2X7-Nbs wurden 30 µg der Nbs über 2 Minuten mit einer Konzentration von 15 µg/ µl injiziert.

### **FACS-Analyse**

Die Durchflusszytometrie ermöglichte die Quantifizierung der in vitro und in vivo Aktivierung von stimulierten Mikroglia sowie eine Hemmung jener Aktivierung infolge einer Zugabe von P2X7-spezifischen Nbs. In diesem Zusammenhang wurden die Porenformation mit konsekutiver DAPI-Aufnahme, ein Calciumeinstrom mithilfe von Fluo4, eine Aktivierung der Caspase 1 durch das FAM-FLICA Detektionssystem sowie eine IL-1β Freisetzung mit und ohne Zugabe von P2X7-spezifischen Nbs dargestellt. Zudem konnte mithilfe der Durchflusszytometrie eine Distribution der Nanobodies beziehungsweise deren Bindung an Mikroglia im Hirn oder an renale T-Zellen in vivo illustriert werden. Eine ausführliche Darstellung der Präparation sowie der verwendeten Antikörper und der Gating-Strategie, insbesondere die Detektion der Nbs auf Mikroglia (Wilmes et al., 2022) und der renalen T-Zellen (Pinto-Espinoza et al., 2022), kann aus der Publikation entnommen werden.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 8. Die Analyse einzelner Gruppen untereinander erfolgte durch den T-Test mit einem P-Wert von <0,5 als Zeichen der statistischen Signifikanz.

Eine erweiterte Darstellung aller Methoden und der verwendeten Materialien kann den originalen Publikationen entnommen werden.

## 4 Ergebnisse

Im folgenden Teil werde ich die Ergebnisse der wissenschaftlichen Publikationen darstellen, an denen ich als Erstautor beziehungsweise Co-Autor gearbeitet habe. Eine Aufteilung wird je nach Themengebiet und Paper erfolgen.

Szwargulski, P., **Wilmes, M.**, et al. (2020). ***Monitoring intracranial cerebral hemorrhage using multicontrast real-time magnetic particle imaging***. ACS Nano

Im folgenden Teil werde ich die Ergebnisse der wissenschaftlichen Publikation „Monitoring intracranial cerebral hemorrhage using multicontrast real-time magnetic particle imaging“ aus dem Forschungsjournal „ACS Nano“ (Szwargulski et al., 2020) vorstellen.

### **Detektion der ICB mittels MPI**

Zu Beginn untersuchten wir den optimalen Tracer sowie dessen Applikationsverfahren für einen schnellen Nachweis der intrakraniellen Blutung (siehe Arbeitsablauf Suppl. Abb. 1 in Szwargulski et al., 2020). Perimag (Micromod GmbH, Deutschland) mit einer Halbwertszeit im Blut von 30 Minuten wurde entweder als großer Bolus von 200 µl sechs Mal alle 10 Minuten oder kontinuierlich für eine Stunde mit einer Kommulativdosis von 600 µl injiziert. Die Bildrekonstruktion erfolgte während der Datenerfassung, dauerte 8 Sekunden pro Bild und konnte während der Untersuchung direkt eingesehen werden. In jedem Fall konnte eine Blutung nach spätestens 90 Minuten eindeutig nachgewiesen werden. Insgesamt unterschieden sich je nach Tracer und Applikationsmodus die Zeitpunkte der frühesten Erkennung der Blutung. Bei einer Injektion eines großen Einzelbolus Perimag betrug die Zeit 10 Minuten bis zu den ersten Blutungszeichen. Bei der Gabe von wiederholten Boli dauerte dies 19 Minuten beziehungsweise 23 Minuten in der Gruppe mit einer kontinuierlichen Injektion. Trotz unterschiedlicher Injektionsschemata konnte in keinem Injektionsmodell eine dauerhaft konstante Konzentration des Tracers erreicht werden (siehe Suppl. Abb. 2 in Szwargulski et al., 2020). Eine digitale Subtraktion der Daten verbesserte die Darstellung der intrakraniellen Blutung nicht. Eine Detektion der Blutung ohne vorherige Kenntnis über die Blutungslokalisierung war mit dem kurzzyklisierenden Tracer Perimag vor 60 Minuten nicht möglich. Im Vergleich dazu zeigte der mit einer Halbwertszeit von 60 Minuten im Blut lang zirkulierende Tracer Synomag-D bessere Ergebnisse. Nach Injektion gleicher Mengen des Tracers im Vergleich zum Vorherigen zeigte sich ein Signalanstieg nach unter 3 Minuten, um die intrakranielle Blutung sichtbar zu machen (siehe Abb. 1 in Szwargulski et al., 2020). Aufgrund der dreidimensionalen Darstellung und präzisen quantitativen Erkennung von koaguliertem Blut und einer hohen zeitlichen Auflösung konnte die Ausdehnung der ICB

engmaschig verfolgt werden. Die maximale Ausdehnungsrate lag bei etwa vier Minuten und dauerte bis ca. 100 Minuten nach der Kollagenase-Injektion an. Aufgrund der Farbkodierung zwischen neuen und alten Tracer in der ICB konnte eine Unterscheidung innerhalb der Blutung erfolgen (siehe Abb. 1c in Szwargulski et al., 2020). Eine Stunde nach der letzten MPI-Bildgebung erfolgte die Opferung der Tiere für die ex-vivo Magnetresonanztomographie (MRT). Im verwendeten Kollagenasemodell wurde in der Vergangenheit eine Zunahme des Hämatoms bis zu 24 Stunden beschrieben, was die geringen Unterschiede zwischen den letzten MPI- und MRT-Bildern erklärt (Manaenko, Chen, Zhang, & Tang, 2011; Rosenberg, Mun-Bryce, Wesley, & Kornfeld, 1990). In der weiteren Folge bestätigte sich durch Präparation der intrakraniellen Blutung, dass das im MPI erzeugte Signal mit dem extravasierten Tracer übereinstimmte (siehe Abb. 2a in Szwargulski et al., 2020). Eine für die Klinik wichtige Bestimmung des Volumens des intrakraniellen Hämatoms konnte durch das MPI ebenfalls genau erfolgen und stellte sich in nachfolgender MRT- und in histologischen Kontrolle in vergleichbarer Größe und Form dar (siehe Abb. 2 b/c in Szwargulski et al., 2020).

### **Kombination verschiedener Tracer ermöglicht die Überwachung der Hämatomzunahme sowie des zerebralen Blutflusses**

Nach klinischen Gesichtspunkten ist die Bildgebung in der intrakraniellen Blutung nicht nur wichtig, um das Hämatom einschätzen zu können, sondern auch, um eine noch weiterhin bestehende zerebrale Perfusion zu begutachten. Hierzu wurden die beiden Tracer miteinander kombiniert. Nach der initialen Auslösung der ICB und Bildgebung mittels Synomag-D erfolgte die Gabe eines zweiten Perimag-Bolus. Kurz vor dem Perimag-Bolus wurde eine Basisaufnahme genommen, die in der Folge nach der Gabe des Primag Bolus zur digitalen Subtraktion diente, um das Signal des Synomag-D in der Blutzirkulation zu unterdrücken. Es konnte die Blutung eindeutig identifiziert werden, während der flüssige Perimag-Bolus im Hirn die zerebrale Perfusion markierte und eine Bestimmung von Perfusionsparameterkarten erlaubte (siehe Abb. 4 in Szwargulski et al., 2020).

### **SPIO-Extravasate werden automatisch aus dem Hirnparenchym entfernt**

Aufgrund der potentiellen Nebenwirkungen der Tracer nach der Extravasation in das Hirnparenchym (Guo, Yang, & Zhang, 2018) stellte sich die Frage, wie homogen sich die Tracer in der ICB anlagern, sowie wie lange das Extravasat im Hirnparenchym verbleibt. Hierzu färbten wir die Tracer 4 Stunden nach der Injektion mit Berliner Blau an, welches in den ersten Stunden der Blutung vor allem die Tracer im Eisen (III)-Zustand jedoch nicht an Hämoglobin gebundenes Eisen im Eisen (II)-Zustand anfärbt. Es stellte sich keine übermäßige Ansammlung von Tracern mit einer homogenen Verteilung innerhalb der ICB dar. Eine Verlaufsbildgebung nach 21 Tagen zeigte ebenfalls eine abfallende Tracermenge (siehe Abb. 5 in Szwargulski et al., 2020).

**Wilmes, M., et al. (2022). Blocking P2X7 by intracerebroventricular injection of P2X7-specific nanobodies reduces stroke lesions.** Journal of Neuroinflammation

Im folgenden Teil werden die Ergebnisse der wissenschaftlichen Publikationen "Blocking P2X7 by intracerebroventricular injection of P2X7-specific nanobodies reduces stroke lesions", veröffentlicht im Forschungsjournal "Journal of Neuroinflammation" (Wilmes et al., 2022) vorstellen. Alle Abbildungen beziehen sich auf die Publikation und deren Legenden sind dort zu entnehmen.

**Extrazelluläres ATP wird in Folge eines ischämischen Schlaganfalles freigesetzt**

Als Erstes analysierten wir die eATP Freisetzung infolge einer tMCAO-Operation mit Hilfe von eATP erkennenden pmeLUC transgenen Mäusen. Diese Mäuse exprimieren ubiquitär eine Luciferase auf der extrazellulären Seite ihrer Plasmamembran, welche durch extrazelluläres ATP aktiviert wird (Csoka et al., 2018; Pellegatti, Falzoni, Pinton, Rizzuto, & Di Virgilio, 2005). Mit diesem System lassen sich geringe Änderungen der extrazellulären ATP-Konzentration im mikromolaren Bereich selektiv nachweisen, da die exprimierte Luciferase gegenüber anderen Nukleotiden unempfindlich ist (Pellegatti et al., 2005). Unmittelbar nach der tMCAO-Operation wurde ein Kontrollbild genommen (siehe Abb. 1 in Wilmes et al., 2022). Bereits 90 Minuten nach der Okklusion der zentralen Hirnarterie konnte eine Freisetzung von extrazellulärem ATP durch eine Zunahme der Lumineszenz in der ischämischen Hemisphäre gemessen werden. Nach 24 Stunden konnte weiterhin ein starkes Signal in der ischämischen Hemisphäre gemessen werden (s. Abb. 1 in Wilmes et al., 2022). Eine grobe Abschätzung der eATP-Konzentration wurde mithilfe eines in vitro Konzentrationsgradienten vorgenommen (s. Suppl. Abb. 4 in Wilmes et al., 2022).

**Eine verstärkte P2X7-Expression erhöhte die Läsionsgröße des ischämischen Schlaganfalls**

Zunächst zeigten immunhistochemische Färbungen von P2X7-EGFP transgenen Mäusen, dass der P2X7-Kanal vor allem auf Iba1-positiven Zellen im Hirn exprimiert wird, wobei NeuN positive Zellen jene hohe EGFP-Expression nicht zeigten. Diese Erkenntnisse, dass vor allem Mikroglia den P2X7-Kanal im ZNS exprimieren, konnten ebenfalls durch den Allen Brain Atlas für Mäuse und Menschen (Hodge et al., 2019; Lein et al., 2007) bestätigt werden (siehe Tab. 1 in Wilmes et al., 2022).

Um anschließend den Einfluss einer verstärkten Expression von P2X7 auf die Läsionsgröße der ischämischen Hemisphäre zu bestimmen, verglichen wir die Läsionsgröße von P2X7 überexprimierenden transgenen Mäusen (P2X7-tg) mit deren Wildtyp-Wurfgeschwistern (wt) infolge einer tMCAO-Operation. Hier konnten wir zeigen, dass P2X7-transgene Mäuse eine

signifikant größere Läsionsgröße der ischämischen Hemisphäre aufwiesen als deren wildtyp Wurfgeschwister.

### **P2X7-spezifische Nanobodies hemmen den mikroglialen P2X7-Rezeptor in vitro**

Zum Nachweis der Effektivität der P2X7 spezifischen Nbs zur Blockierung aktivierter Mikroglia in vitro inkubierten Nbs mit durch ATP-stimulierten Mikroglia. Hier zeigten wir, dass sich durch Zugabe von P2X7-spezifische Nbs (1 µg/µl) im Vergleich zur verwendeten Isotypkontrolle der durch ATP induzierte Calcium-Einstrom sowie eine DAPI-Aufnahme durch induzierte Porenbildung verringerte (siehe Abb. 3A und B in Wilmes et al., 2022). Zusätzlich konnte durch die P2X7-Nbs eine signifikant geringere Caspase-1 Aktivierung durch das FAM-FLICA Detektionssystem gezeigt werden (siehe Abb. 3C in Wilmes et al., 2022). Zudem zeigten durch LPS/ATP stimulierte Mikroglia nach vorheriger Inkubation mit P2X7-spezifischen Nbs eine geringere IL-1β-Freisetzung (siehe Abb. 3D in Wilmes et al., 2022). Diese Erkenntnis zeigte bei weiterer in vitro Analyse sogar eine Dosisabhängigkeit, sodass wir beobachteten, dass schon geringe Dosen an Nbs eine suffiziente Hemmung der IL-1β-Freisetzung erzielten (siehe Abb. 3E in Wilmes et al., 2022).

### **Intravenöse Injektion von P2X7-spezifischen Nanobodies beeinflusst die ischämische Läsionsgröße nicht**

Nachdem wir den Effekt einer Blockade des P2X7-Kanals auf Mikroglia zeigten, fokussierten wir uns im nächsten Schritt auf den in vivo Einsatz der Nbs nach i.v. Injektion zur Bestimmung des Einflusses auf die Läsionsgröße nach der tMCAO-Operation mit einer Okklusionszeit von 40 Minuten. Wir injizierten Wildtypmäusen intravenös 100 µg des Nb B oder einer Isotypkontrolle kurz vor der tMCAO-Operation. Die ischämische Läsionsgröße wurde 24 Stunden nach der initialen Ischämie in zwei unabhängigen Kohorten einerseits per Histologie und andererseits per Magnetresonanztomographie (MRT) bestimmt. In beiden Ansätzen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Läsionsgröße zwischen Nb-Behandlung und Isotypkontrolle. Um nun zu verfolgen, ob die Nbs zur effektiven Blockade im ZNS die Blut-Hirn-Schranke (BHS) suffizient passieren konnten, injizierten wir fluochrom-markierte Nbs. Hier zeigte sich, dass nach einer Injektion von 100 µg intravenös injizierten fluochrom-markierten Nbs die Nbs nur an in das ZNS immigrierten Makrophagen nachgewiesen werden konnten, diese jedoch nicht an Mikroglia gefunden werden konnten. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Nbs nur mit Einschränkungen die BHS überqueren. Um dies zu quantifizieren, führten wir eine Analyse der nötigen Menge an i.v. gegebenen Nbs durch, um eine effektive Überquerung der BHS zu erreichen. Hierbei zeigte sich, dass sehr hohe Dosen notwendig sind, um die BHS zu überqueren und die hirnsässigen Mikroglia zu besetzen (siehe Suppl. Abb. 4B in Wilmes et al., 2022).

## **Intrazerebroventrikuläre Injektion von P2X7-spezifischen Nanobodies verringert die ischämische Läsionsgröße**

Da nachweislich Nbs nur insuffizient die BHS überqueren, haben wir die intrazerebroventrikuläre Injektion als Methode ausgesucht, um die BHS zu umgehen und somit den Effekt der P2X7-spezifischen Nbs auf die Läsionsgröße des ischämischen Schlaganfalls unabhängig von der BHS-Penetration zu beurteilen. Schon in der Literatur war dieser Weg als adäquate Administration von Nbs ins Hirn beschrieben (Gomes et al., 2018). Hierzu injizierten wir 30 µg des Nb B-mod in 2 µl (15 µg/µl) im Vergleich zu einer Isotypkontrolle in Wildtypmäuse direkt vor der tMCAO-Operation. In einer vorherigen Quantifizierung der benötigten Menge, um eine Bindung der Nbs an die Mikroglia im ZNS zu erzielen, zeigten wir, dass ca. 30 µg von P2X7-Nbs nötig sind, um über 99 % der Mikroglia zu besetzen (siehe Suppl Abb. 7 in Wilmes et al., 2022). Somit beobachteten wir, dass für die intrazerebroventrikuläre Injektion im Vergleich zur intravenösen Injektion nur 1/100 der Dosis notwendig ist, um eine gleiche Besetzung der Mikroglia mit P2X7-spezifischen Nbs zu erzielen. Mit dem Nb B-mod behandelte Mäuse zeigten 24 Stunden nach der tMCAO-Operation signifikant geringere Läsionsgrößen als Mäuse, die mit der Isotypkontrolle behandelt wurden (siehe Abb. 5A in Wilmes et al., 2022). Per FACS wurde die Qualität der Injektionen jeder Maus überwacht. Hier zeigte sich ein starkes Signal des P2X7-Nbs gebunden an die Mikroglia, wobei die Isotypkontrolle kein Signal zeigte (siehe Abb. 5B in Wilmes et al., 2022). Dieses Signal konnte durch die ex vivo Zugabe der P2X7-spezifischen Nbs nicht weiter erhöht werden. Zur funktionellen Analyse der P2X7-Aktivierung der Mikroglia testeten wir die ATP-induzierte DAPI-Aufnahme (siehe Abb. 5C in Wilmes et al., 2022). 160 Minuten nach der intrazerebroventrikulären (icv.) Injektion von 30 µg Nb B-mod wurden Mikroglia isoliert und durch ATP aktiviert. Wir zeigten, dass die Injektion von 30 µg Nb B-mod ca. 61,9 % der Mikroglia vor einer P2X7-Aktivierung durch 0,5 mM ATP und damit vor der DAPI-Aufnahme schützten. Die Positivkontrolle mit 0,5 mM ATP und in Abwesenheit von Nb B-mod zeigte eine DAPI-Aufnahme in 89,5 % der Mikroglia, wobei die Negativkontrolle ohne ATP-Zugabe und ohne Nbs eine DAPI-Aufnahme in 1,4% der Mikroglia zeigte (siehe Tab. 2 in Wilmes et al., 2022).

Pinto-Espinoza, C., Guillou, C., Rissiek, B., **Wilmes, M.**, et al. (2022). **Effective targeting of microglial P2X7 following intracerebroventricular delivery of nanobodies and nanobody-encoding AAVs.** *Frontiers in Pharmacology*

Im folgenden Teil werden die von mir miterhobenen Ergebnisse der wissenschaftlichen Publikationen "Effective targeting of microglial P2X7 following intracerebroventricular delivery of nanobodies and nanobody-encoding AAVs", veröffentlicht im Forschungsjournal "Frontiers in Pharmacology" (Pinto-Espinoza et al., 2022) vorgestellt. Alle Abbildungen beziehen sich auf die Publikation und deren Legenden sind dort zu entnehmen.

### **Injektion von hohen Dosen i.v. injizierter P2X7-Nbs sind zur vollständigen Blockierung des mikroglialen P2X7-Rezeptors nötig**

Aufgrund der bekannten Integrität der BHS treten nur sehr geringe Raten von i.v. injizierten Antikörpern in das Hirn über (Abuqayyas & Balthasar, 2013). Um den Übertritt der P2X7-spezifischen Nbs nach i.v. Injektion über die BHS ins Hirn zu überprüfen und zusätzlich den Einfluss des isoelektrischen Punktes (iP) der Nbs auf den BHS-Übertritt zu untersuchen, wurden zwei Nb-Konstrukte mit unterschiedlichem iP und in unterschiedlichen Mengen intravenös injiziert. Es wurden Mäusen 1,5 mg/kg oder 150 mg/kg P2X7-spezifische Nbs injiziert und nach vier Stunden die Besetzung von Mikroglia und nierenspezifischen T-Gedächtniszellen überprüft. Hier zeigte sich, dass nur sehr hohe Dosen zur vollständigen Besetzung an den P2X7-Rezeptor auf Mikroglia ausreichen, wobei zur kompletten Bindung an den P2X7-Rezeptor der renalen T-Gedächtniszellen schon mit dem 1/100 dieser hohen Dosis erzielt werden kann (siehe Abb. 3 in Pinto-Espinoza et al., 2022). Zusätzlich zeigte die Untersuchung der Effektivität der P2X7-Blockade der in vivo gebundenen Nbs mittels ATP-induzierter DAPI Aufnahme eine dosisabhängige Hemmung, wobei nur durch die Injektion einer sehr hohen Dosis eine fast vollständige Blockade der P2X7-vermittelten DAPI-Aufnahme erzielt wurde (siehe Abb. 3 in Pinto-Espinoza et al., 2022)

### **Injektion von niedrigen Dosen icv. injizierter P2X7-Nbs erzielt eine vollständige Blockade der mikroglialen P2X7-Rezeptoren**

Auf der Grundlage, dass nur sehr hohe Dosen von P2X7-spezifischen Nbs eine adäquate Passage der BHS erzielen können und dass in der Literatur bekannt war, dass die intrazerebroventrikuläre Injektion ein beschriebener Ansatz ist, um eine adäquate Administration von Nbs in Hirn zu erreichen (Gomes et al., 2018), fehlte folgend noch eine genaue Bestimmung der benötigten Dosis, die bei der icv. Injektion nötig war, um die vollständige Besetzung der Mikroglia im Hirn zu erzielen. Es wurden absteigende Dosen von 5 mg/kg bis 0,05 mg/kg in 2 µl zerebroventrikulär injiziert. 18 Stunden nach der Injektion wurden die Mikroglia auf in vivo gebundene P2X7-Nbs analysiert. Es zeigte sich, dass schon

0,15 mg/kg zur nahezu vollständigen Bindung der Mikroglia ausreichen und analog dazu dies bei einer Injektion von 0,5 mg/kg erreicht wurde. Ebenso reichte eine Injektion von 0,5 mg/kg aus, um die ATP-induzierte DAPI-Aufnahme der Mikroglia vollständig zu blockieren (siehe Abb. 4 in Pinto-Espinoza et al., 2022).

**Nach icv. Injektion binden P2X7-Nbs innerhalb von 10 Minuten an die Mikroglia und sind bis 28 Tage nach der Injektion noch teilweise nachweisbar.**

Nachdem die Dosisabhängigkeit der icv. Injektion gezeigt wurde, stand noch der zeitliche Verlauf der Bindung der Nbs an die Mikroglia in Frage. Hierzu injizierten wir Mäusen icv. 1,5 mg/kg des P2X7-spezifischen Nbs in 2 µl und analysierten die Besetzung der P2X7-Rezeptoren der Mikroglia zu verschiedenen Zeitpunkten von 10 Minuten bis 28 Tagen. Es zeigte sich bereits nach 10 Minuten post Injektion eine vollständige Bindung an den P2X7-Rezeptor der Mikroglia, welche 3 Tage nach Injektion weiterhin bestand. In den folgenden Tagen konnte bis Tag 28 eine progrediente Abnahme der Besetzung der mikroglialen P2X7-Rezeptoren beobachtet werden (siehe Abb. 6 in Pinto-Espinoza et al., 2022), jedoch war interessant zu sehen, dass nach 28 Tagen immer noch an fast 50 % der Mikroglia der P2X7-Nb gebunden war. In denselben Tieren wurde ebenfalls die Bindung der P2X7-Nbs an die P2X7 hoch exprimierenden renalen T-Gedächtniszellen analysiert, um zu überprüfen, ab wann die ins ventrikuläre System injizierten Nbs in die systemische Zirkulation übergehen. Hier konnten wir sehen, dass nach 10 Minuten noch keine Bindung der renalen T-Gedächtniszellen erfolgte, diese jedoch nach 80 Minuten vollständig besetzt waren. Nach 7 Tagen waren noch 75 % dieser Zellen mit den Nbs besetzt, jedoch war ab dem Tag 14 dies auf ein sehr niedriges Niveau gesunken, was auf eine Entfernung aus der systemischen Zirkulation schließen ließ (siehe Abb. 6 in Pinto-Espinoza et al., 2022). In der funktionalen Analyse zeigte sich wie erwartet eine langfristige Blockade der ATP-induzierten DAPI-Aufnahme durch Mikroglia bis zu Tag 17 nach der intrazerebroventrikulären Injektion (siehe Abb. 6 in Pinto-Espinoza et al., 2022).



## 5 Diskussion

In dem Diskussionsteil meiner Doktorarbeit werde ich die Erkenntnisse der einzelnen Publikationen diskutieren und sie miteinander verbinden.

Hierzu gehe ich als Erstes auf die Publikation Szwargulski, Wilmes et al., 2020 ein.

In dieser Publikation konnten wir zeigen, dass die Magnetpartikelbildgebung eine zuverlässige und schnelle Echtzeitdarstellung einer intrakraniellen Blutung eines experimentellen ICB-Modells ermöglicht. Mittels MPI ist eine intrakranielle Blutung jedoch nur zu erkennen, wenn eine aktive Blutung vorliegt und somit der Tracer als Extravasat in das Hirnparenchym eindringt. Wir wählten einen klinikähnlichen Ansatz, indem wir den Tracer 30 Minuten nach Induktion der Blutung injizierten. Hierunter konnten wir innerhalb weniger Minuten eine intrakranielle Blutung erkennen sowie eine aktive Blutung bis 100 Minuten nach der Induktion beobachten. Zusätzlich war es möglich, durch die Kombination von zwei verschiedenen Tracern eine Überwachung sowohl des intrazerebralen Hämatoms als auch der zerebralen Perfusion durchzuführen. Durch die hohe zeitliche Auflösung des MPIs war dies in Echtzeit realisierbar. Bislang steht in der Klinik noch keine adäquate, nicht-invasive Methode zur zuverlässigen und kontinuierlichen Überwachung der Ganzhirnperfusion am Patientenbett zur Verfügung. Diese Lücke kann durch das MPI geschlossen werden. Durch eine permanente nicht-invasive Überwachung in Echtzeit ermöglicht das MPI zusätzlich ein schnelleres Eingreifen im Falle einer Verschlechterung der Situation, wie im Beispiel einer Sekundärblutung in Form der Initiierung einer chirurgischen Entlastung. Zudem ist es durch die kleine Bauweise eines MPI-Scanners möglich, diesen direkt am Patientenbett zu nutzen und zu bedienen. Hierzu wurde bereits in der Vergangenheit ein mobiler menschlicher Kopfscanner entwickelt, welcher am Patientenbett durch eine normale Steckdose betrieben werden kann (Graeser et al., 2019).

Ein weiterer Vorteil der MPIs ist die Unterscheidung zwischen flüssigem und koaguliertem Blut innerhalb der ICB mittels Multikontrast-MPI, was mit anderen Bildgebungsverfahren noch nicht möglich ist. Diese Unterscheidung ist insbesondere in der chirurgischen Therapie wichtig, da eine Operation während einer aktiven Blutung mit einer höheren Rate an Nachblutungen und einer höheren Sterblichkeit verbunden ist (Morgenstern, Demchuk, Kim, Frankowski, & Grotta, 2001). Hier könnte das MPI zur Feststellung des frühesten möglichen Therapiefensters dienen, welches mit weniger schweren postoperativen Komplikationen verbunden ist.

Wie schon vorher erwähnt, beinhaltet das Multikontrast-MPI die Möglichkeit, sowohl die intrakranielle Blutung als auch die zerebrale Perfusion zu überwachen. Da es im Zuge der ICB mit Ausdehnung des Hämatoms zu einer Erhöhung des intrakraniellen Druckes kommen kann, führt dies häufig zu einer Verminderung der zerebralen Perfusion mit vermehrten

Sekundärschäden. Durch eine kontinuierliche Überwachung sowohl der ICB als auch der zerebralen Perfusion kann mittels MPI bei Beeinträchtigung der Perfusion schnellstmöglich mittels Anpassung der Therapie darauf reagiert werden und so können weitere Schäden vermieden werden. Ebenso kann infolge der hohen räumlichen Auflösung und Messung des Hämatomvolumens inklusive Beachtung einer potenziellen Mittellinienverschiebung eine frühe operative Indikation adäquat gestellt werden.

Noch zu überwindende Grenzen der MPI stellt einerseits die Unterscheidung zwischen alter und frischer Blutung, andererseits die potenzielle Toxizität der Tracer als Extravasat im Hirnparenchym dar. Mit heutigen Mitteln ist es für das MPI schwierig, alte Blutungen darzustellen, da in diesem Fall kein Tracer in das hämorrhagische Gewebe eingedrungen ist. Hier wäre zwar noch ein Perfusionsdefizit zu erkennen, jedoch eine genaue Unterscheidung zwischen hämorrhagischem und ischämischem Schlaganfall nicht möglich. Die Frage nach der Toxizität der Tracer ist in der Vergangenheit aufgekommen, da bei Patienten nach wiederholter Gadoliniumanwendung zerebrale Ablagerungen festgestellt wurden (Kanda, Ishii, Kawaguchi, Kitajima, & Takenaka, 2014). Im Vergleich zu Gadolinium sind MPI-Tracer jedoch biologisch abbaubar. Demnach konnten wir eine stetige Abnahme des Tracersignals im Hirnparenchym über die Zeit feststellen, was auf einen lokalen Abbau oder eine Entfernung der SPIOs aus dem Hirnparenchym hindeutet. Vermutlich werden die SPIOs von Makrophagen oder Mikroglia phagozytiert und verdaut (siehe Suppl. Abb. 7 in Szwargulski et al., 2020), gefolgt vom Einbau des abgebauten Eisens in Hämoglobin (Gu et al., 2011; Y. X. Wang, 2011). Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Partikel lokal abgebaut werden und Reste im Parenchym verbleiben. Hier bieten sich weitere Studien an, um eine Neurotoxizität und Toxizität auf die Integrität der BHS durch die SPIOs zu untersuchen.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Publikation die MPI als moderne Echtzeitbildgebung für die ICB vorstellen. Zusammen mit vorherigen Studien bezüglich der MPI-Bildgebung für den ischämischen Schlaganfall (Graeser et al., 2019; Ludewig et al., 2017) ist das MPI für beide Hauptentitäten des Schlaganfalls, die intrakraniellen Blutung und die Ischämie, eine Möglichkeit der schnellen Erkennung und Echtzeitüberwachung, welche sogar mittels mobiler Scanner kontinuierlich am Patientenbett durchführbar ist.

Im Weiteren werde ich die Ergebnisse der Publikation Wilmes et al. 2022 zusammen mit den von mir miterhobenen Ergebnissen aus der Publikation Pinto-Espinosa et al. 2022 diskutieren.

Im Zuge der Studie Wilmes et al., 2022 zeigen wir, dass es früh nach der Induktion des ischämischen Ereignisses zu einer Freisetzung von eATP kommt und eine Blockade des ATP-Rezeptors P2X7 durch spezifische Nbs den durch die Ischämie verursachten Parenchymschaden reduziert. Jedoch müssen die Nbs zur Umgehung der Blut-Hirn-Schranke

intrazerebroventrikulär injiziert werden, um somit den P2X7-Rezeptor der hirnständigen Zellen zu erreichen.

Seit längerer Zeit tauchen in der Literatur immer mehr Hinweise auf, dass eine sterile Entzündung die Folge eines Schlaganfalls ist. Nach dem initial ischämischen Ereignis kommt es zu einer Freisetzung einer Vielzahl von Mediatoren, die im Parenchym schon vorhandene oder immigrierende Immunzellen aktivieren können. In diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung sind sogenannte Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs), welche als endogene Gefahrensignale eine Aktivierung des Inflammasoms und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen durch angeborene Immunzellen initiieren (Di Virgilio, 2007; Junger, 2011). In transgenen Mäusen mit einer exprimierten Luciferase auf der äußeren Seite der Zellmembranen konnten wir zeigen, dass eATP, analog zu traumatischen Hirnverletzungen (Faroqi et al., 2021), sehr früh nach der Initiierung einer ischämischen Gewebeschädigung freigesetzt wird. Dieses Signal persistiert im weiteren Verlauf über 24 Stunden, was auf eine weitergehend kontinuierliche eATP-Freisetzung des ischämischen Areals hindeutet. Somit liegt es nah, dass insbesondere eATP und dessen Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Auslösung der sterilen Entzündungsreaktion nach einem Schlaganfall spielen. Hierbei ist die proinflammatorische Reaktion der Mikroglia sehr wahrscheinlich infolge einer Aktivierung des P2X7-Kanals induziert (Cserep et al., 2020; Di Virgilio, Sarti, & Grassi, 2018; Linden, Koch-Nolte, & Dahl, 2019).

Der P2X7-Kanal ist im Gehirn vor allem auf Gliazellen exprimiert. Dies wird durch Expressionsdaten des Allen Brain Atlas für Mäuse (Lein et al., 2007) und Menschen (Hodge et al., 2019) unterstützt, wobei diese zeigen, dass der P2X7-Rezeptor bei Menschen und Nagetieren insbesondere auf Mikroglia exprimiert wird (siehe Tab. 1 in Wilmes et al., 2022).

Im Gegensatz hierzu zeigen Astrozyten eine geringere Expressionsrate der P2X7-RNA auf. Unterschiede der Expression lassen sich bei Oligodendrozyten finden, wobei der menschliche P2X7-Rezeptor eine starke Expressionsdichte zeigt, dies jedoch nicht bei Nagetieren zu finden ist. Dies unterstützt die Ansicht, dass bei Nagetieren eine Blockade des P2X7 insbesondere einen Einfluss auf die Mikroglia hat.

Infolge eines ischämischen Schlaganfalls kommt es zu einer verstärkten Expression des P2X7-Kanals auf Mikroglia (Franke et al., 2004; Skaper, 2011), was zum Zelltod jener Zellen führen kann (Eyo, Miner, Ahlers, Wu, & Dailey, 2013). Diese Erhöhung der Expressionsdichte konnte jedoch nicht auf Astrozyten gezeigt werden (Zamanian et al., 2012). In der Vergangenheit konnten sowohl wir als auch andere Gruppen zeigen, dass Mäuse ohne Expression des P2X7-Kanals kleinere Gewebeverluste infolge einer tMCAO-Operation haben, sowie dass eine Blockade des P2X7-Kanals mit unspezifischen Blockern wie BBG die Läsionsgröße der Ischämie verringern (Arbeloa, Perez-Samartin, Gottlieb, & Matute, 2012;

Cisneros-Mejorado et al., 2015). Zudem zeigte eine Hemmung des NLRP3-Inflammasoms ebenfalls einen geringeren Gewebeschaden nach zerebraler Ischämie, jedoch zeigte eine zusätzliche Blockade des P2X7-Kanals keinen additiven Effekt (Cisneros-Mejorado et al., 2015). Insgesamt werden diese Annahmen noch kontrovers diskutiert. So beobachteten Yanagisawa und Kollegen eine Vergrößerung des ischämischen Gewebeschadens infolge einer Blockade des P2X7-Kanals (Yanagisawa et al., 2008). Ähnliche Ergebnisse zeigten Kang et al. (Kang, Keasey, & Hagg, 2013), welche infolge einer Blockade des P2X7-Kanals einen Effekt auf die Expression des ciliaren neurotrophen Faktors (CNTF) beschrieben, jedoch keinen Effekt auf die Läsionsgröße der Ischämie beobachteten. In diesem Zusammenhang stellt die Verwendung von BBG eine mögliche Erklärung dar, da niedermolekulare Inhibitoren oft toxisch und weniger spezifisch sind als Nbs. Insbesondere zeigt BBG keine eindeutige Affinität nur zum P2X7-Kanal (Jiang, Mackenzie, North, & Surprenant, 2000) und ist somit durch seine dosisabhängigen Off-target Effekte bekannt. Um eine spezifische Bindung und Blockade des P2X7-Kanals zu gewährleisten, verwandten wir spezifische Nbs. In der Entwicklung jener spezifischen Nbs konnten in unserer Gruppe sowohl human spezifische als auch murin spezifische P2X7 blockierende Nbs generiert und patentiert werden. Durch ihre vielfältigen Vorteile (siehe Einleitung) stellen Nbs eine vielversprechende neue Technologieplattform dar, welche auch heute schon Einzug in die Klinik hielten. Die ersten therapeutischen Nbs gegen unter anderem den TNF- und IL-6 Rezeptor wurden von Ablynx-Sanofi entwickelt und haben inzwischen eine FDA-Zulassung erhalten (Scully et al., 2019; Ulrichs et al., 2011).

Ein zu überwindendes Hindernis in der systemischen Administration von Biologika, welche das Hirn erreichen sollen, stellt die Blut-Hirn-Schranke (BHS) dar. Unter physiologischen Bedingungen stellt die BHS durch ihre eingeschränkte Permeabilität nur für lipophile Moleküle bis 400 kDa (Pardridge, 2012) und einen kontinuierlichen Fc-Rezeptor-gekoppelten Efflux in das Blut hinein (Cooper et al., 2013) seine zu überquerende Barriere dar. Aus diesem Grund haben Nbs, welche keinen Fc-Anteil exprimieren, eine bessere Möglichkeit, ihre Ziele hinter der BHS zu erreichen. Jedoch können auch unter pathophysiologischen Bedingungen mit eingeschränkter BHS monovalente Nbs keine ausreichende Konzentration für eine in vivo-Bildgebung des Gehirns (Nabuurs et al., 2012) oder für therapeutische Zwecke (Caljon et al., 2012) im Hirn erreichen. In der pathologischen Konstellation eines ischämischen Schlaganfalls kommt es zu einem biphasischen Zusammenbruch der BHS durch eine Aktivierung der Matrix-Metalloproteasen (MMP)-2, -3, und -9 (Ludewig et al., 2013; Yang & Rosenberg, 2011) Zunächst ist dies noch reversibel, wird jedoch im Weiteren vor allem durch die MMP-3 und MMP-9 verstärkt (Rosell et al., 2008). Diese Erkenntnisse lassen eigentlich darauf schließen, dass Antikörper oder Nbs durch den Zusammenbruch der BHS im Zuge des ischämischen Schlaganfalls einen leichteren Zugang zum Gehirn haben könnten. Dies konnten wir jedoch in

unserer Studie nicht bestätigen. So erreicht nach intravenöser Applikation nur ein kleiner Anteil der intravenös applizierten Nbs das Hirnparenchym. Jedoch konnten wir unsere P2X7-spezifischen Nbs auf aus dem Blutstrom ins Hirnparenchym immigrierenden Makrophagen detektieren. Diese konnten aber nicht auf hirnständigen Mikroglia nachgewiesen werden und ihre Funktion war ebenfalls nicht beeinträchtigt (siehe Abb. 4 in Wilmes et al., 2022). In einer tieferen Analyse der Integrität der BHS bezüglich des Übertritts von Nbs konnten wir feststellen, dass sehr hohe Dosen einer i.v. Injektion nötig sind, um den P2X7-Kanal auf Mikroglia im Hirn vollständig zu erreichen (siehe Suppl. Abb. 6 in Wilmes et al., 2022 und Abb. 3 in Pinto-Espinoza et al., 2022). Diese Erkenntnisse stehen im Einklang damit, dass bei einer reinen intravenösen Injektion von Antikörpern oder Nbs ein Shuttle-System wie zum Beispiel der Transferrin-Rezeptor nötig ist, um eine adäquate Passage der BHS in das Hirnparenchym zu gewährleisten (Lee, Engelhardt, Lesley, Bickel, & Pardridge, 2000). Aus diesem Grund war es für uns notwendig, Wege zu finden, die eine Umgehung der BHS ermöglichen. In dieser Studie wählten wir den Weg einer direkten Injektion des Nbs in das ventrikuläre Liquorsystem. Da aufgrund der geringen Größe des ventrikulären Systems nur geringe Volumina injiziert werden können, mussten wir unsere Nbs so modifizieren, dass eine hohe Konzentration erreicht werden kann, ohne Proteinaggregate zu bilden (siehe Suppl. Abb. 1 in Wilmes et al., 2022). In einer Analyse der Dosis, die notwendig ist, um die Mikroglia im Hirn adäquat zu besetzen, konnten wir feststellen, dass schon sehr geringe Dosen hierzu ausreichen (siehe Suppl. Abb. 7 in Wilmes et al., 2022, Abb. 4 in Pinto-Espinoza et al., 2022). Durch eine effektive intrazerebroventrikuläre Injektion von P2X7-spezifischen Nbs konnten wir bis zu 95% der Mikroglia erreichen. Im Vergleich zur intravenösen Gabe war hier nur 1 % der Dosis nötig, um eine gleiche Bindung an die Mikroglia zu erzielen (siehe Suppl. 7 in Wilmes et al., 2022). Somit reichte für die intrazerebroventrikuläre Injektion im Vergleich zur intravenösen Injektion weniger als 1/100 der Dosis aus, um eine gleiche Besetzung der Mikroglia im Hirn zu erreichen. Interessanterweise stellte sich in der Analyse der Kinetik der Distribution der Nbs nach intrazerebroventrikulärer Injektion heraus, dass bereits 10 Minuten nach icv. Injektion alle Mikroglia im Hirn ausreichend mit P2X7-Nbs besetzt waren. Dies blieb bis zu einer Woche nach der Injektion gleich, nahm in der Folge sukzessive ab, bis unter 50 % nach 21 Tagen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die in das ZNS injizierten Nbs nach ca. einer Stunde in die systemische Zirkulation übertreten (siehe Suppl. Abb. 8 in Wilmes et al., 2022 und Abb. 5 in Pinto-Espinoza et al., 2022). Somit gehen Nbs zwar schnell aus dem ZNS in den systemischen Kreislauf über, jedoch ist ein Übergang aus dem systemischen Kreislauf in das Hirnparenchym stark eingeschränkt, was für eine effektive Entfernung von Nbs aus dem ZNS zur Beibehaltung der Homöostase spricht.

Insgesamt stellt eine Injektion in den Liquorraum beim Menschen eine geringere Herausforderung dar, da dies schon im Zuge einer häufig praktizierten Lumbalpunktion

durchgeführt werden kann. Außerdem ist jene Methode der Administration von Therapeutika in der Klinik schon für einige neurologische Erkrankungen wie zum Beispiel der neuronalen Lipofuscinose etabliert (Worgall et al., 2008). Zusätzlich stellen heutzutage neue Methode der Transmission von Nbs in das ZNS wie die Fusion mit Liganden von Hirndothelzellrezeptoren wie ApoE-LDL-Rezeptoren oder mit Nbs spezifisch gegen Transzytoserezeptoren von Hirndothelzellen vielversprechende Möglichkeiten dar (Abulrob, Sprong, Van Bergen en Henegouwen, & Stanimirovic, 2005; Muruganandam, Tanha, Narang, & Stanimirovic, 2002; Sarkar et al., 2011).

In der pathologischen Konstellation eines ischämischen Schlaganfalls sind Mikroglia die ersten immunologischen Zellen, welche aktiviert werden, wobei Makrophagen erst später in das ZNS immigrieren (Gelderblom et al., 2012). Auf dieser Grundlage lässt sich erklären, wieso wir keinen Unterschied in der Läsionsgröße nach der reinen intravenösen Administration von Nbs, welche die Mikroglia nicht suffizient erreichen, beobachten konnten. Bei einer intrazerebroventrikulären Gabe der Nbs jedoch ist es möglich, bis zu 95% der Mikroglia zu erreichen und folgend durch eine effektive Hemmung der mikroglialen Aktivierung eine Verringerung der Läsionsgröße zu erzielen.

Zusammenfassend können wir in unserer Studie zeigen, welche Wirkung die nach einem ischämischen Schlaganfall ausgelöste lokale Freisetzung von eATP auf die Läsionsgröße hat. Zudem zeigen wir, dass wir durch eine spezifische Hemmung dieses eATP-Signals durch die Blockade des ATP-Rezeptors P2X7 eine Verminderung der Läsionsgröße erzielen können. Diese spezifische Blockade können P2X7-spezifische Nbs gewährleisten, jedoch müssen sie aufgrund einer unzureichenden Penetration der BHS direkt in das Liquorsystem injiziert werden.

Insgesamt muss hier aber berücksichtigt werden, dass unsere Studie eine Proof-of-Concept Studie darstellt, die vollständig mit der klinischen Situation übereinstimmt. Da in dieser Studie eine Injektion der P2X7-Nbs vor der tMCAO-Operation vorgenommen wurde, wollten wir das volle Potential einer vollständigen Blockade untersuchen. In weiterführenden Settings sollten die Nbs nach der initialen Ischämie gegeben werden, um ein Setting zu gewährleisten, welches der klinischen Situation eher entspricht. Zudem sollten weibliche, komorbide und ältere Mäuse ebenfalls in diese Studien einbezogen werden. Zudem müssen unsere Ergebnisse in anderen Laboren und mit anderen Modellsystemen reproduziert werden, bevor sie in die klinische Phase übergehen können.

In der Zusammenschau der Erkenntnisse der verschiedenen Publikationen konnten wir einerseits zeigen, dass das MPI eine moderne Echtzeitüberwachung der Schlaganfallentitäten bietet und dass eine Administration P2X7-Nbs in den Liquorraum als früher Therapieansatz beim ischämischen Schlaganfall in einer Verringerung der Läsionsgröße resultiert. Aufgrund

einer eingeschränkten Überwindung der BHS durch die P2X7-Nbs müssen sie aber direkt in das Liquorsystem injiziert werden, um adäquat die Mikroglia zu blockieren. Eine intravenöse Injektion ist aufgrund der benötigten hohen Mengen beim Menschen nicht möglich. Jedoch ist hier zu beachten, dass nicht jeder Schlaganfallpatient für eine Liquorpunktion geeignet ist. Da ein ischämischer Schlaganfall epidemiologisch häufig bei Patienten auftritt, die schon a priori antikoaguliert sind, kann eine sofortige Liquorpunktion hier oftmals nicht erfolgen. Einen Ausweg aus diesem Dilemma könnte eine Kombination aus der MPI zusammen mit den P2X7-Nbs bieten. Neben der reinen Bildgebung ermöglicht das MPI ebenfalls eine kontrollierte Navigation der SPIOs an eine gewünschte Stelle. Hier konnten Griese et al. 2020 in einem Bifurkationsmodell zeigen, dass sich durch Manipulation der MPI-Felder eine gerichtete Bewegung der SPIOs induzieren lässt (Griese et al., 2020). Zudem konnten Wang et al. im gleichen Jahr zeigen, dass es möglich ist, SPIOs an monoklonale Antikörper zu binden (L. Wang et al., 2020). Durch eine Fusion von SPIOs an P2X7-spezifische Nanobodies wäre eine intravenöse Gabe des Therapeutikums eine Möglichkeit. Das Problem der intravenösen Injektion allgemein besteht darin, dass das Therapeutikum nur zu geringem Anteil an den gewünschten Ort gelangt, dort aber die gewünschte Wirkung voll leisten soll. Wir konnten jedoch zeigen, dass, wenn die Konzentration der Nbs in der systemischen Zirkulation und auch analog an der BHS hoch genug ist, ein adäquater Übertritt der P2X7-Nbs über die BHS gelingt. Im Zuge der Kombination von SPIOS und P2X7-Nbs mit der MPI könnte nun die Konzentration der Nbs lokal an der BHS hochgehalten werden und somit einen Übertritt über die BHS gewährleisten. Jedoch müssten weitere Studien zur Kombination und lokalen Dissoziation von Nanobodies und SPIOs beziehungsweise deren Fusionsprodukten im ZNS entwickelt werden.

## 6 Referenzen

- Abulrob, A., Sprong, H., Van Bergen en Henegouwen, P., & Stanimirovic, D. (2005). The blood-brain barrier transmigration of single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J Neurochem*, *95*(4), 1201-1214.
- Abuqayyas, L., & Balthasar, J. P. (2013). Investigation of the role of FcγR and FcRn in mAb distribution to the brain. *Mol Pharm*, *10*(5), 1505-1513.
- Arbeloa, J., Perez-Samartin, A., Gottlieb, M., & Matute, C. (2012). P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia. *Neurobiol Dis*, *45*(3), 954-961.
- Benjamin, E. J., Muntner, P., Alonso, A., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., Das, S. R., Delling, F. N., Djousse, L., Elkind, M. S. V., Ferguson, J. F., Fornage, M., Jordan, L. C., Khan, S. S., Kissela, B. M., Knutson, K. L., Kwan, T. W., Lackland, D. T., Lewis, T. T., Lichtman, J. H., Longenecker, C. T., Loop, M. S., Lutsey, P. L., Martin, S. S., Matsushita, K., Moran, A. E., Mussolino, M. E., O'Flaherty, M., Pandey, A., Perak, A. M., Rosamond, W. D., Roth, G. A., Sampson, U. K. A., Satou, G. M., Schroeder, E. B., Shah, S. H., Spartano, N. L., Stokes, A., Tirschwell, D. L., Tsao, C. W., Turakhia, M. P., VanWagner, L. B., Wilkins, J. T., Wong, S. S., Virani, S. S., American Heart Association Council on, E., Prevention Statistics, C., & Stroke Statistics, S. (2019). Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, *139*(10), e56-e528.
- Broz, P., & Dixit, V. M. (2016). Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*, *16*(7), 407-420.
- Caljon, G., Caveliers, V., Lahoutte, T., Stijlemans, B., Ghassabeh, G. H., Van Den Abbeele, J., Smolders, I., De Baetselier, P., Michotte, Y., Muyldermans, S., Magez, S., & Clinckers, R. (2012). Using microdialysis to analyse the passage of monovalent nanobodies through the blood-brain barrier. *Br J Pharmacol*, *165*(7), 2341-2353.
- Cisneros-Mejorado, A., Gottlieb, M., Cavaliere, F., Magnus, T., Koch-Nolte, F., Scemes, E., Perez-Samartin, A., & Matute, C. (2015). Blockade of P2X7 receptors or pannexin-1 channels similarly attenuates postischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab*, *35*(5), 843-850.
- Collaborators, G. B. D. S. (2019). Global, regional, and national burden of stroke, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*, *18*(5), 439-458.
- Cooper, P. R., Ciambone, G. J., Kliwinski, C. M., Maze, E., Johnson, L., Li, Q., Feng, Y., & Hornby, P. J. (2013). Efflux of monoclonal antibodies from rat brain by neonatal Fc receptor, FcRn. *Brain Res*, *1534*, 13-21.
- Cserep, C., Posfai, B., Lenart, N., Fekete, R., Laszlo, Z. I., Lele, Z., Orsolits, B., Molnar, G., Heindl, S., Schwarcz, A. D., Ujvari, K., Kornyei, Z., Toth, K., Szabadits, E., Sperlagh, B., Baranyi, M., Csiba, L., Hortobagyi, T., Magloczky, Z., Martinecz, B., Szabo, G., Erdelyi, F., Szipocs, R., Tamkun, M. M., Gesierich, B., Duering, M., Katona, I., Liesz, A., Tamas, G., & Denes, A. (2020). Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions. *Science*, *367*(6477), 528-537.
- Csoka, B., Nemeth, Z. H., Szabo, I., Davies, D. L., Varga, Z. V., Paloczi, J., Falzoni, S., Di Virgilio, F., Muramatsu, R., Yamashita, T., Pacher, P., & Hasko, G. (2018). Macrophage P2X4 receptors augment bacterial killing and protect against sepsis. *JCI Insight*, *3*(11).
- Danquah, W., Meyer-Schwesinger, C., Rissiek, B., Pinto, C., Serracant-Prat, A., Amadi, M., Iacenda, D., Knop, J. H., Hammel, A., Bergmann, P., Schwarz, N., Assuncao, J.,



- Rothier, W., Haag, F., Tolosa, E., Bannas, P., Boue-Grabot, E., Magnus, T., Laeremans, T., Stortelers, C., & Koch-Nolte, F. (2016). Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci Transl Med*, 8(366), 366ra162.
- De Genst, E., Saerens, D., Muyldermans, S., & Conrath, K. (2006). Antibody repertoire development in camelids. *Dev Comp Immunol*, 30(1-2), 187-198.
- Di Virgilio, F. (2007). Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci*, 28(9), 465-472.
- Di Virgilio, F., Sarti, A. C., & Grassi, F. (2018). Modulation of innate and adaptive immunity by P2X ion channels. *Curr Opin Immunol*, 52, 51-59.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., & Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, 22(9), 391-397.
- Dunbar, M., & Kirton, A. (2019). Perinatal Stroke. *Semin Pediatr Neurol*, 32, 100767.
- Eyo, U. B., Miner, S. A., Ahlers, K. E., Wu, L. J., & Dailey, M. E. (2013). P2X7 receptor activation regulates microglial cell death during oxygen-glucose deprivation. *Neuropharmacology*, 73, 311-319.
- Faroqi, A. H., Lim, M. J., Kee, E. C., Lee, J. H., Burgess, J. D., Chen, R., Di Virgilio, F., Delenclos, M., & McLean, P. J. (2021). In Vivo Detection of Extracellular Adenosine Triphosphate in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*, 38(5), 655-664.
- Feigin, V. L., Brainin, M., Norrving, B., Martins, S., Sacco, R. L., Hacke, W., Fisher, M., Pandian, J., & Lindsay, P. (2022). World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. *Int J Stroke*, 17(1), 18-29.
- Feigin, V. L., Lawes, C. M. M., Bennett, D. A., Barker-Collo, S. L., & Parag, V. (2009). Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *The Lancet Neurology*, 8(4), 355-369.
- Franke, H., Gunther, A., Grosche, J., Schmidt, R., Rossner, S., Reinhardt, R., Faber-Zuschratte, H., Schneider, D., & Illes, P. (2004). P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats. *J Neuropathol Exp Neurol*, 63(7), 686-699.
- Gelderblom, M., Leypoldt, F., Steinbach, K., Behrens, D., Choe, C. U., Siler, D. A., Arumugam, T. V., Orthey, E., Gerloff, C., Tolosa, E., & Magnus, T. (2009). Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke*, 40(5), 1849-1857.
- Gelderblom, M., Sobey, C. G., Kleinschnitz, C., & Magnus, T. (2015). Danger signals in stroke. *Ageing Res Rev*, 24(Pt A), 77-82.
- Gelderblom, M., Weymar, A., Bernreuther, C., Velden, J., Arunachalam, P., Steinbach, K., Orthey, E., Arumugam, T. V., Leypoldt, F., Simova, O., Thom, V., Friese, M. A., Prinz, I., Holscher, C., Glatzel, M., Korn, T., Gerloff, C., Tolosa, E., & Magnus, T. (2012). Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood*, 120(18), 3793-3802.
- Gleich, B., & Weizenecker, J. (2005). Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles. *Nature*, 435(7046), 1214-1217.
- Gomes, J. R., Cabrito, I., Soares, H. R., Costelha, S., Teixeira, A., Wittelsberger, A., Stortelers, C., Vanlandschoot, P., & Saraiva, M. J. (2018). Delivery of an anti-transferrin Nanobody to the brain through intranasal administration reveals transferrin expression and secretion by motor neurons. *J Neurochem*, 145(5), 393-408.
- Graeser, M., Thieben, F., Szwargulski, P., Werner, F., Gdaniec, N., Boberg, M., Griese, F., Moddel, M., Ludewig, P., van de Ven, D., Weber, O. M., Woywode, O., Gleich, B., & Knopp, T. (2019). Human-sized magnetic particle imaging for brain applications. *Nat Commun*, 10(1), 1936.

- Griese, F., Knopp, T., Gruettner, C., Thieben, F., Muller, K., Loges, S., Ludewig, P., & Gdaniec, N. (2020). Simultaneous Magnetic Particle Imaging and Navigation of large superparamagnetic nanoparticles in bifurcation flow experiments. *Journal of Magnetism and magnetic Materials*, 498.
- Gu, J., Xu, H., Han, Y., Dai, W., Hao, W., Wang, C., Gu, N., Xu, H., & Cao, J. (2011). The internalization pathway, metabolic fate and biological effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the macrophage-like RAW264.7 cell. *Sci China Life Sci*, 54(9), 793-805.
- Guo, B. J., Yang, Z. L., & Zhang, L. J. (2018). Gadolinium Deposition in Brain: Current Scientific Evidence and Future Perspectives. *Front Mol Neurosci*, 11, 335.
- Hattori, M., & Gouaux, E. (2012). Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature*, 485(7397), 207-212.
- Hirayama, Y., Anzai, N., & Koizumi, S. (2021). Mechanisms underlying sensitization of P2X7 receptors in astrocytes for induction of ischemic tolerance. *Glia*, 69(9), 2100-2110.
- Hodge, R. D., Bakken, T. E., Miller, J. A., Smith, K. A., Barkan, E. R., Graybuck, L. T., Close, J. L., Long, B., Johansen, N., Penn, O., Yao, Z., Eggermont, J., Höllt, T., Levi, B. P., Shehata, S. I., Aebermann, B., Beller, A., Bertagnolli, D., Brouner, K., Casper, T., Cobbs, C., Dalley, R., Dee, N., Ding, S. L., Ellenbogen, R. G., Fong, O., Garren, E., Goldy, J., Gwinn, R. P., Hirschstein, D., Keene, C. D., Keshk, M., Ko, A. L., Lathia, K., Mahfouz, A., Maltzer, Z., McGraw, M., Nguyen, T. N., Nyhus, J., Ojemann, J. G., Oldre, A., Parry, S., Reynolds, S., Rimorin, C., Shapovalova, N. V., Somasundaram, S., Szafer, A., Thomsen, E. R., Tieu, M., Quon, G., Scheuermann, R. H., Yuste, R., Sunkin, S. M., Lelieveldt, B., Feng, D., Ng, L., Bernard, A., Hawrylycz, M., Phillips, J. W., Tasic, B., Zeng, H., Jones, A. R., Koch, C., & Lein, E. S. (2019). Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature*, 573(7772), 61-68.
- Hu, Y., Liu, C., & Muyldermans, S. (2017). Nanobody-Based Delivery Systems for Diagnosis and Targeted Tumor Therapy. *Front Immunol*, 8, 1442.
- Huang, J., Upadhyay, U. M., & Tamargo, R. J. (2006). Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol*, 66(3), 232-245.
- Ingram, J. R., Schmidt, F. I., & Ploegh, H. L. (2018). Exploiting Nanobodies' Singular Traits. *Annu Rev Immunol*, 36, 695-715.
- Janks, L., Sharma, C. V. R., & Egan, T. M. (2018). A central role for P2X7 receptors in human microglia. *J Neuroinflammation*, 15(1), 325.
- Jia, H., Qi, X., Fu, L., Wu, H., Shang, J., Qu, M., Yang, C., & Wang, J. (2022). NLRP3 inflammasome inhibitor ameliorates ischemic stroke by reprogramming the phenotype of microglia/macrophage in a murine model of distal middle cerebral artery occlusion. *Neuropathology*, 42(3), 181-189.
- Jiang, L.-H., Mackenzie, A. B., North, R. A., & Surprenant, A. (2000). Brilliant Blue G Selectively Blocks ATP-Gated Rat P2X7 Receptors. *Molecular Pharmacology*, 58(1), 82-88.
- Jones, K. A., Maltby, S., Plank, M. W., Kluge, M., Nilsson, M., Foster, P. S., & Walker, F. R. (2018). Peripheral immune cells infiltrate into sites of secondary neurodegeneration after ischemic stroke. *Brain Behav Immun*, 67, 299-307.
- Junger, W. G. (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol*, 11(3), 201-212.
- Kaczmarek-Hajek, K., Zhang, J., Kopp, R., Grosche, A., Rissiek, B., Saul, A., Bruzzone, S., Engel, T., Jooss, T., Krautloher, A., Schuster, S., Magnus, T., Stadelmann, C., Sirko, S., Koch-Nolte, F., Eulenburg, V., & Nicke, A. (2018). Re-evaluation of neuronal P2X7 expression using novel mouse models and a P2X7-specific nanobody. *Elife*, 7.

- Kanda, T., Ishii, K., Kawaguchi, H., Kitajima, K., & Takenaka, D. (2014). High signal intensity in the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted MR images: relationship with increasing cumulative dose of a gadolinium-based contrast material. *Radiology*, 270(3), 834-841.
- Kang, S. S., Keasey, M. P., & Hagg, T. (2013). P2X7 receptor inhibition increases CNTF in the subventricular zone, but not neurogenesis or neuroprotection after stroke in adult mice. *Transl Stroke Res*, 4(5), 533-545.
- Kasuya, G., Yamaura, T., Ma, X. B., Nakamura, R., Takemoto, M., Nagumo, H., Tanaka, E., Dohmae, N., Nakane, T., Yu, Y., Ishitani, R., Matsuzaki, O., Hattori, M., & Nureki, O. (2017). Structural insights into the competitive inhibition of the ATP-gated P2X receptor channel. *Nat Commun*, 8(1), 876.
- Katsura, K., Kristian, T., & Siesjo, B. K. (1994). Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans*, 22(4), 991-996.
- Koch-Nolte, F., Reyelt, J., Schossow, B., Schwarz, N., Scheuplein, F., Rothenburg, S., Haag, F., Alzogaray, V., Cauerhff, A., & Goldbaum, F. A. (2007). Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in vivo. *FASEB J*, 21(13), 3490-3498.
- Lee, H. J., Engelhardt, B., Lesley, J., Bickel, U., & Pardridge, W. M. (2000). Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 292(3), 1048-1052
- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A. F., Boguski, M. S., Brockway, K. S., Byrnes, E. J., Chen, L., Chen, L., Chen, T. M., Chin, M. C., Chong, J., Crook, B. E., Czaplinska, A., Dang, C. N., Datta, S., Dee, N. R., Desaki, A. L., Desta, T., Diep, E., Dolbeare, T. A., Donelan, M. J., Dong, H. W., Dougherty, J. G., Duncan, B. J., Ebbert, A. J., Eichele, G., Estin, L. K., Faber, C., Facer, B. A., Fields, R., Fischer, S. R., Fliss, T. P., Frensley, C., Gates, S. N., Glattfelder, K. J., Halverson, K. R., Hart, M. R., Hohmann, J. G., Howell, M. P., Jeung, D. P., Johnson, R. A., Karr, P. T., Kawal, R., Kidney, J. M., Knapik, R. H., Kuan, C. L., Lake, J. H., Laramie, A. R., Larsen, K. D., Lau, C., Lemon, T. A., Liang, A. J., Liu, Y., Luong, L. T., Michaels, J., Morgan, J. J., Morgan, R. J., Mortrud, M. T., Mosqueda, N. F., Ng, L. L., Ng, R., Orta, G. J., Overly, C. C., Pak, T. H., Parry, S. E., Pathak, S. D., Pearson, O. C., Puchalski, R. B., Riley, Z. L., Rockett, H. R., Rowland, S. A., Royall, J. J., Ruiz, M. J., Sarno, N. R., Schaffnit, K., Shapovalova, N. V., Sivisay, T., Slaughterbeck, C. R., Smith, S. C., Smith, K. A., Smith, B. I., Sodt, A. J., Stewart, N. N., Stumpf, K. R., Sunkin, S. M., Sutram, M., Tam, A., Teemer, C. D., Thaller, C., Thompson, C. L., Varnam, L. R., Visel, A., Whitlock, R. M., Wohnoutka, P. E., Wolkey, C. K., Wong, V. Y., Wood, M., Yaylaoglu, M. B., Young, R. C., Youngstrom, B. L., Yuan, X. F., Zhang, B., Zwingman, T. A., & Jones, A. R. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 445(7124), 168-176.
- Linden, J., Koch-Nolte, F., & Dahl, G. (2019). Purine Release, Metabolism, and Signaling in the Inflammatory Response. *Annu Rev Immunol*, 37, 325-347.
- Liu, B., Hu, B., Shao, S., Wu, W., Fan, L., Bai, G., Shang, P., & Wang, X. (2015). CD163/Hemoglobin Oxygenase-1 Pathway Regulates Inflammation in Hematoma Surrounding Tissues after Intracerebral Hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 24(12), 2800-2809.
- Ludewig, P., Gdaniec, N., Sedlacik, J., Forkert, N. D., Szwargulski, P., Graeser, M., Adam, G., Kaul, M. G., Krishnan, K. M., Ferguson, R. M., Khandhar, A. P., Walczak, P., Fiehler, J., Thomalla, G., Gerloff, C., Knopp, T., & Magnus, T. (2017). Magnetic Particle Imaging for Real-Time Perfusion Imaging in Acute Stroke. *ACS Nano*, 11(10), 10480-10488.

- Ludewig, P., Sedlacik, J., Gelderblom, M., Bernreuther, C., Korkusuz, Y., Wagener, C., Gerloff, C., Fiehler, J., Magnus, T., & Horst, A. K. (2013). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 inhibits MMP-9-mediated blood-brain-barrier breakdown in a mouse model for ischemic stroke. *Circ Res*, *113*(8), 1013-1022.
- Manaenko, A., Chen, H., Zhang, J. H., & Tang, J. (2011). Comparison of different preclinical models of intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*, *111*, 9-14.
- Martin, R. L., Lloyd, H. G., & Cowan, A. I. (1994). The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci*, *17*(6), 251-257.
- Menzel, S., Schwarz, N., Haag, F., & Koch-Nolte, F. (2018). Nanobody-Based Biologics for Modulating Purinergic Signaling in Inflammation and Immunity. *Front Pharmacol*, *9*, 266.
- Morgenstern, L. B., Demchuk, A. M., Kim, D. H., Frankowski, R. F., & Grotta, J. C. (2001). Rebleeding leads to poor outcome in ultra-early craniotomy for intracerebral hemorrhage. *Neurology*, *56*(10), 1294-1299.
- Munoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martinez-Colon, G., Smith, B. L., Rajendiran, T. M., & Nunez, G. (2013). K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*, *38*(6), 1142-1153.
- Muruganandam, A., Tanha, J., Narang, S., & Stanimirovic, D. (2002). Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium. *FASEB J*, *16*(2), 240-242.
- Nabuurs, R. J., Rutgers, K. S., Welling, M. M., Metaxas, A., de Backer, M. E., Rotman, M., Bacsikai, B. J., van Buchem, M. A., van der Maarel, S. M., & van der Weerd, L. (2012). In vivo detection of amyloid-beta deposits using heavy chain antibody fragments in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *PLoS One*, *7*(6), e38284.
- Orellana-Urzuá, S., Rojas, I., Libano, L., & Rodrigo, R. (2020). Pathophysiology of Ischemic Stroke: Role of Oxidative Stress. *Curr Pharm Des*, *26*(34), 4246-4260.
- Owolabi, M. O., Thrift, A. G., Mahal, A., Ishida, M., Martins, S., Johnson, W. D., Pandian, J., Abd-Allah, F., Yaria, J., Phan, H. T., Roth, G., Gall, S. L., Beare, R., Phan, T. G., Mikulik, R., Akinyemi, R. O., Norrving, B., Brainin, M., Feigin, V. L., & Stroke Experts Collaboration, G. (2022). Primary stroke prevention worldwide: translating evidence into action. *Lancet Public Health*, *7*(1), e74-e85.
- Pardridge, W. M. (2012). Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*, *32*(11), 1959-1972.
- Pare, J. R., & Kahn, J. H. (2012). Basic neuroanatomy and stroke syndromes. *Emerg Med Clin North Am*, *30*(3), 601-615.
- Pellegatti, P., Falzoni, S., Pinton, P., Rizzuto, R., & Di Virgilio, F. (2005). A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion. *Mol Biol Cell*, *16*(8), 3659-3665.
- Pinto-Espinoza, C., Guillou, C., Rissiek, B., Wilmes, M., Javidi, E., Schwarz, N., Junge, M., Haag, F., Liaukouskaya, N., Wanner, N., Nicke, A., Stortelers, C., Tan, Y. V., Adriouch, S., Magnus, T., & Koch-Nolte, F. (2022). Effective targeting of microglial P2X7 following intracerebroventricular delivery of nanobodies and nanobody-encoding AAVs. *Front Pharmacol*, *13*, 1029236.
- Rissiek, B., Haag, F., Boyer, O., Koch-Nolte, F., & Adriouch, S. (2015). P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions. *Front Immunol*, *6*, 204.
- Rissiek, B., Koch-Nolte, F., & Magnus, T. (2014). Nanobodies as modulators of inflammation: potential applications for acute brain injury. *Front Cell Neurosci*, *8*, 344.
- Rosell, A., Cuadrado, E., Ortega-Aznar, A., Hernandez-Guillamon, M., Lo, E. H., & Montaner, J. (2008). MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-

- brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke*, 39(4), 1121-1126.
- Rosenberg, G. A., Mun-Bryce, S., Wesley, M., & Kornfeld, M. (1990). Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*, 21(5), 801-807.
- Sacco, R. L., Kasner, S. E., Broderick, J. P., Caplan, L. R., Connors, J. J., Culebras, A., Elkind, M. S., George, M. G., Hamdan, A. D., Higashida, R. T., Hoh, B. L., Janis, L. S., Kase, C. S., Kleindorfer, D. O., Lee, J. M., Moseley, M. E., Peterson, E. D., Turan, T. N., Valderrama, A. L., Vinters, H. V., American Heart Association Stroke Council, C. o. C. S., Anesthesia, Council on Cardiovascular, R., Intervention, Council on, C., Stroke, N., Council on, E., Prevention, Council on Peripheral Vascular, D., Council on Nutrition, P. A., & Metabolism. (2013). An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 44(7), 2064-2089.
- Sarkar, G., Curran, G. L., Mahlum, E., Decklever, T., Wengenack, T. M., Blahnik, A., Hoesley, B., Lowe, V. J., Poduslo, J. F., & Jenkins, R. B. (2011). A carrier for non-covalent delivery of functional beta-galactosidase and antibodies against amyloid plaques and IgM to the brain. *PLoS One*, 6(12), e28881.
- Scully, M., Cataland, S. R., Peyvandi, F., Coppo, P., Knobl, P., Kremer Hovinga, J. A., Metjian, A., de la Rubia, J., Pavenski, K., Callewaert, F., Biswas, D., De Winter, H., Zeldin, R. K., & Investigators, H. (2019). Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med*, 380(4), 335-346.
- Skaper, S. D. (2011). Ion channels on microglia: therapeutic targets for neuroprotection. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 10(1), 44-56.
- Szwargulski, P., Wilmes, M., Javidi, E., Thieben, F., Graeser, M., Koch, M., Gruettner, C., Adam, G., Gerloff, C., Magnus, T., Knopp, T., & Ludewig, P. (2020). Monitoring Intracranial Cerebral Hemorrhage Using Multicontrast Real-Time Magnetic Particle Imaging. *ACS Nano*, 14(10), 13913-13923.
- Tijink, B. M., Laeremans, T., Budde, M., Stigter-van Walsum, M., Dreier, T., de Haard, H. J., Leemans, C. R., & van Dongen, G. A. (2008). Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology. *Mol Cancer Ther*, 7(8), 2288-2297.
- Ulrichs, H., Silence, K., Schoolmeester, A., de Jaegere, P., Rossenu, S., Roodt, J., Priem, S., Lauwereys, M., Casteels, P., Van Bockstaele, F., Verschueren, K., Stanssens, P., Baumeister, J., & Holz, J. B. (2011). Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared with currently marketed antiplatelet drugs. *Blood*, 118(3), 757-765.
- Wang, L., Yin, H., Bi, R., Gao, G., Li, K., & Liu, H. L. (2020). ENO1-targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for detecting pancreatic cancer by magnetic resonance imaging. *J Cell Mol Med*, 24(10), 5751-5757.
- Wang, Y. X. (2011). Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quant Imaging Med Surg*, 1(1), 35-40.
- Weimar, C., & Kleine-Borgmann, J. (2017). Epidemiology, Prognosis and Prevention of Non-Traumatic Intracerebral Hemorrhage. *Curr Pharm Des*, 23(15), 2193-2196.
- Wilmes, M., Pinto Espinoza, C., Ludewig, P., Stabernack, J., Liesz, A., Nicke, A., Gelderblom, M., Gerloff, C., Falzoni, S., Tolosa, E., Di Virgilio, F., Rissiek, B., Plesnilla, N., Koch-Nolte, F., & Magnus, T. (2022). Blocking P2X7 by intracerebroventricular injection of P2X7-specific nanobodies reduces stroke lesions. *J Neuroinflammation*, 19(1), 256.
- Worgall, S., Sondhi, D., Hackett, N. R., Kosofsky, B., Kekatpure, M. V., Neyzi, N., Dyke, J. P., Ballon, D., Heier, L., Greenwald, B. M., Christos, P., Mazumdar, M., Souweidane, M. M., Kaplitt, M. G., & Crystal, R. G. (2008). Treatment of late infantile neuronal

- ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA. *Hum Gene Ther*, 19(5), 463-474.
- Yanagisawa, D., Kitamura, Y., Takata, K., Hide, I., Nakata, Y., & Taniguchi, T. (2008). Possible involvement of P2X7 receptor activation in microglial neuroprotection against focal cerebral ischemia in rats. *Biol Pharm Bull*, 31(6), 1121-1130.
- Yang, Y., & Rosenberg, G. A. (2011). Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke*, 42(11), 3323-3328.
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., & Barres, B. A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci*, 32(18), 6391-6410.
- Zerna, C., Thomalla, G., Campbell, B. C. V., Rha, J. H., & Hill, M. D. (2018). Current practice and future directions in the diagnosis and acute treatment of ischaemic stroke. *Lancet*, 392(10154), 1247-1256.
- Zhu, H., Hu, S., Li, Y., Sun, Y., Xiong, X., Hu, X., Chen, J., & Qiu, S. (2022). Interleukins and Ischemic Stroke. *Front Immunol*, 13, 828447.

## 7 Zusammenfassung

### a. Szwargulski, Wilmes, et al. 2020, ACS Nano

#### **Abstract:**

Magnetic particle imaging (MPI) is an innovative radiation-free tomographic imaging method providing excellent temporal resolution, contrast, sensitivity, and safety. Mobile human MPI prototypes suitable for continuous bedside monitoring of whole-brain perfusion have been developed. However, for the clinical translation of MPI, a crucial gap in knowledge still remains: while MPI can visualize the reduction in blood flow and tissue perfusion in cerebral ischemia, it is unclear whether MPI works in intracranial hemorrhage. Our objective was to investigate the capability of MPI to detect intracranial hemorrhage in a murine model. Intracranial hemorrhage was induced through the injection of collagenase into the striatum of C57BL/6 mice. After the intravenous infusion of a long-circulating MPI-tailored tracer consisting of superparamagnetic iron oxides, we detected the intracranial hemorrhage in less than 3 min and could monitor hematoma expansion in real time. Multicontrast MPI can distinguish tracers based on their physical characteristics, core size, temperature, and viscosity. By employing in vivo multicontrast MPI, we were able to differentiate areas of liquid and coagulated blood within the hematoma, which could provide valuable information in surgical decision making. Multicontrast MPI also enabled simultaneous imaging of hemorrhage and cerebral perfusion, which is essential in the care of critically ill patients with increased intracranial pressure. We conclude that MPI can be used for real-time diagnosis of intracranial hemorrhage.

#### **Zusammenfassung:**

Die Magnetpartikelbildgebung (MPI) ist ein modernes, strahlenfreies, tomographisches Bildgebungsverfahren. Sie bietet eine hervorragende zeitliche Auflösung, Kontrastempfindlichkeit und Sicherheit. Es wurden mobile MPI-Prototypen für den Menschen entwickelt, die sich für die kontinuierliche Überwachung der Durchblutung des gesamten Hirns am Krankenbett eignen. Für die klinische Anwendung des MPIs besteht jedoch noch eine entscheidende Wissenslücke: Während die MPI bei zerebraler Ischämie die Abnahme des Blutflusses und der Gewebedurchblutung sichtbar machen kann, ist unklar, ob die MPI bei intrakraniellen Blutungen funktioniert. Unser Ziel war es, die Fähigkeit der MPI zum Nachweis intrakranieller Blutungen im Mausmodell zu untersuchen. Intrakranielle Blutungen wurden durch die Injektion von Kollagenase in das Striatum von C57BL/6 Mäusen induziert. Nach intravenöser Infusion eines lang zirkulierenden Tracers, der aus superparamagnetischen Eisenoxiden besteht, konnten wir die intrakranielle Blutung in weniger als drei Minuten nachweisen und die Ausdehnung des Hämatoms in Echtzeit verfolgen. Das Multikontrast-MPI kann Tracer an verschiedenen Parametern unterscheiden. Durch den Einsatz der

Multikontrast-MPI in vivo konnten wir Bereiche mit flüssigem und koaguliertem Blut innerhalb des Hämatoms unterscheiden, was wertvolle Informationen für die chirurgische Entscheidungsfindung liefern kann. Zusätzlich ermöglicht es eine gleichzeitige Darstellung der intrakraniellen Blutung und der zerebralen Perfusion, was insbesondere in der Therapie kritisch kranker Patienten mit erhöhtem Hirndruck unerlässlich ist. Aufgrund dieser Erkenntnisse kommen wir zu dem Schluss, dass die MPI in Zukunft zur Echtzeit-Diagnose einer intrakraniellen Blutung in Betracht gezogen werden sollte.



## b. Wilmes et al., 2022, Journal of Neuroinflammation

### **Background:**

Previous studies have demonstrated that purinergic receptors could be therapeutic targets to modulate the inflammatory response in multiple models of brain diseases. However, tools for the selective and efficient targeting of these receptors are lacking. The development of new P2X7-specific nanobodies (nbs) has enabled us to effectively block the P2X7 channel.

**Methods:** Temporary middle cerebral artery occlusion (tMCAO) in wild-type (wt) and P2X7 transgenic (tg) mice was used to model ischemic stroke. Adenosine triphosphate (ATP) release was assessed in transgenic ATP sensor mice. Stroke size was measured after P2X7-specific nbs were injected intravenously (iv) and intracerebroventricularly (icv) directly before tMCAO surgery. In vitro cultured microglia were used to investigate calcium influx, pore formation via 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) uptake, caspase 1 activation and interleukin (IL)-1 $\beta$  release after incubation with the P2X7-specific nbs.

**Results:** Transgenic ATP sensor mice showed an increase in ATP release in the ischemic hemisphere compared to the contralateral hemisphere or the sham-treated mice up to 24 h after stroke. P2X7-overexpressing mice had a significantly greater stroke size 24 h after tMCAO surgery. In vitro experiments with primary microglial cells demonstrated that P2X7-specific nbs could inhibit ATP-triggered calcium influx and the formation of membrane pores, as measured by Fluo4 fluorescence or DAPI uptake. In microglia, we found lower caspase 1 activity and subsequently lower IL-1 $\beta$  release after P2X7-specific nb treatment. The intravenous injection of P2X7-specific nbs compared to isotype controls before tMCAO surgery did not result in a smaller stroke size. As demonstrated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) after stroke, iv injected nbs bound to brain-infiltrated macrophages but not to brain resident microglia, indicating insufficient crossing of the blood-brain barrier of the nbs. Therefore, we directly icv injected the P2X7-specific nbs or the isotype nbs. After icv injection of 30  $\mu$ g of P2X7 specific nbs, P2X7 specific nbs bound sufficiently to microglia and reduced stroke size.

**Conclusion:** Mechanistically, we can show that there is a substantial increase of ATP locally after stroke and that blockage of the ATP receptor P2X7 by icv injected P2X7-specific nbs can reduce ischemic tissue damage.

**Einleitung:** In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass purinerge Rezeptoren potentielle therapeutische Ansätze darstellen könnten, um die Entzündungsreaktion in verschiedenen Modellen von Hirnerkrankungen zu beeinflussen. Bis jetzt fehlen jedoch Werkzeuge, um diese Rezeptoren selektiv und effizient zu adressieren. Mit der Entwicklung neuer P2X7-spezifischer Nanobodies und deren direkter Injektion in das zerebrale Liquorsystem konnten wir nun den P2X7-Kanal von hirneigenen Zellen direkt und effektiv blockieren.

**Methoden:** Zur Simulierung eines ischämischen Schlaganfalls wurde ein etabliertes murines Modell des temporären Verschlusses der mittleren Hirnarterie (tMCAO) von 40 Minuten bei Wildtypen (wt) und P2X7-transgenen (tg) Mäusen verwendet. Die extrazelluläre Freisetzung von Adenosintriphosphat (ATP) wurde mit Hilfe von transgenen ATP-Sensor-Mäusen gemessen. P2X7-spezifische Nanobodies wurden unmittelbar vor der tMCAO intravenös (iv) oder intrazerebroventrikulär (icv.) injiziert und die Größe des Schlaganfalls mithilfe eines 7-Tesla MRTs beziehungsweise einer triphenyl tetrazolium chlorid (TTC) Färbung ermittelt und anschließend über die NIH ImageJ Software berechnet. Nach Inkubation in vitro kultivierten Mikroglia mit P2X7-spezifischen Nanobodies wurden der Kalziumeinstrom, die Porenbildung mithilfe von 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Aufnahme, die Caspase-1-Aktivierung und die Freisetzung von Interleukin (IL)-1 gemessen.

**Ergebnisse:** In bis zu 24 Stunden nach einem Schlaganfall zeigten transgene ATP-Sensor Mäuse eine erhöhte ATP-Freisetzung in der ischämischen Hemisphäre im Vergleich zur kontrolateralen Hemisphäre derselben Maus oder zu scheinbehandelten Mäusen. Zusätzlich wiesen P2X7-überexprimierende Mäuse 24 Stunden nach der tMCAO-Operation einen signifikant größeren ischämischen Parenchymverlust auf als ihre wt-Wurfgeschwister. In vitro Experimente mit primären Mikrogliazellen zeigten, dass P2X7-spezifische Nanobodies den durch ATP-induzierten Kalziumeinstrom und die Membranporenbildung, gemessen durch die Fluo4-Fluoreszenz oder DAPI-Aufnahme, hemmen können. Des Weiteren fanden wir infolge einer Inkubation von Mikroglia mit P2X7-spezifischen Nanobodies eine verminderte Caspase-1-Aktivität sowie eine verminderte IL-1 $\beta$ -Freisetzung. Außerdem führte eine intravenöse Injektion von P2X7-spezifischen Nbs im Vergleich zur Injektion einer Isotyp-Kontrolle vor der tMCAO-Operation zu keiner Reduktion der Schlaganfallsgröße. Mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) konnten wir zeigen, dass die injizierten Nbs nach dem Schlaganfall an hirninfiltrierende Makrophagen, jedoch nicht an hirnsässige Mikroglia banden, was auf eine ineffektive Überwindung der BHS durch die Nanobodies hindeutet. Aus diesem Grund haben wir die P2X7-spezifischen Nanobodies oder isotypische Kontrollen direkt per intrazerebroventrikulärer Injektion in das Liquorsystem injiziert. Nach icv. Injektion von 30  $\mu$ g P2X7-spezifischer Nanobodies banden jene ausreichend an Mikroglia und reduzierten die Läsionsgröße signifikant.

**Zusammenfassung/Diskussion:** Insgesamt konnten wir in dieser Studie zeigen, dass es infolge eines ischämischen Schlaganfalles zu einem signifikanten lokalen Anstieg von ATP in der ischämischen Hemisphäre kommt, sowie dass die Blockade des ATP-Rezeptors P2X7 durch intrazerebroventrikulär injizierte P2X7-spezifische Nanobodies den ischämischen Gewebeschaden reduzieren kann.

c. Pinto-Espinoza, Guillou, Rissiek, Wilmes, et al., 2022, *Frontiers in Pharmacology*

**Abstract:**

The P2X7 ion channel is a key sensor for extracellular ATP and a key trigger of sterile inflammation. Intravenous injection of nanobodies that block P2X7 has shown to be beneficial in mouse models of systemic inflammation. P2X7 has also emerged as an attractive therapeutic target for inflammatory brain diseases. However, little is known about the ability of nanobodies to cross the BBB. Here we evaluated the ability of P2X7-specific nanobodies to reach and to block P2X7 on microglia following intravenous or intracerebral administration. For this study, we reformatted and sequence-optimized P2X7 nanobodies for higher stability and elevated isoelectric point. Following injection of nanobodies, we monitored the occupancy and blockade of microglial P2X7 in vivo using ex vivo flow cytometry. Our results show that P2X7 on microglia was within minutes completely occupied and blocked by intracerebroventricularly injected nanobodies, even at low doses. In contrast, very high doses were required to achieve similar effects when injected intravenously. Our results provide new insights into the conditions for the delivery of nanobodies to microglial P2X7.

**Zusammenfassung**

Der Ionenkanal P2X7 ist ein wichtiger Rezeptor und Sensor für extrazelluläres ATP sowie ein zentraler Auslöser einer sterilen Inflammation. Die intravenöse Injektion von Nanobodies, welche P2X7 blockieren, hat sich in Mausmodellen für systemische Entzündungen in der Literatur als nützlich erwiesen. Des Weiteren zeigte sich der P2X7-Rezeptor als potenzielles therapeutisches Ziel bei entzündlichen Erkrankungen des ZNS dargestellt. Insgesamt ist jedoch über die Fähigkeit von Nanobodies, die BHS zu überwinden, wenig bekannt. In dieser Studie haben wir die Fähigkeit von P2X7-spezifischen Nanobodies untersucht, den P2X7-Rezeptor der Mikroglia nach intravenöser sowie nach intrazerebroventrikulärer Injektion zu erreichen und zu blockieren. Für diese Studie wurden P2X7-Nanobodies optimiert und die Besetzung von Mikroglia nach intravenöser oder intrazerebroventrikulärer Injektion per Durchflusszytometrie untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der P2X7-Rezeptor auf Mikroglia durch intrazerebroventrikulär injizierte Nanobodies selbst bei niedrigen Dosen innerhalb von wenigen Minuten vollständig besetzt und blockiert wird. Im Gegensatz dazu waren für die intravenöse Injektion sehr hohe Dosen erforderlich, um vergleichbare Effekte zu erreichen.

## 8 Eigenanteil

Im folgenden Teil meiner Doktorarbeit werde ich meinen Eigenanteil an den genannten Publikationen gegliedert nach den einzelnen Publikationen darlegen.

Als Erstes werde ich hierzu auf meinen Eigenanteil an der Erstellung des Papers „Monitoring intracranial cerebral hemorrhage using multicontrast real-time magnetic particle imaging“ von Szwargulski, Wilmes, et al. aus dem Jahr 2020 im Journal ACS Nano darstellen. In diesem Paper war ich insbesondere an den in vivo Experimenten, hierbei speziell an den Kollagenaseinjektionen, beteiligt. Zudem war ich als Co-Autor in das Verfassen der Publikation einbezogen.

Als nächstes werde ich auf die Publikation „Blocking P2X7 by intracerebroventricular injection of P2X7-specific nanobodies reduces stroke lesions“ von Wilmes et al. aus dem Jahr 2022 im Journal of Neuroinflammation eingehen. Die in vivo Experimente wurde von PL, CP, FDV BR und mir durchgeführt. Das murine Stroke-Model wurde durch Oliver Schnappauf durchgeführt. Die Analyse von eATP mit Hilfe des IVIS-Bildgebungssystems wurden von PL und FDV durchgeführt. Die in vitro Experimente wurden von BR und mir, die Histologie von NPL durchgeführt. Die Analyse der Daten und Erstellung der Figuren erfolgte hauptsächlich durch PL, BR, TM und mich. Beim Verfassen dieses Manuskripts war ich federführend und wurde vor allem durch TM und andere Co-Autoren unterstützt.

Abschließend werde ich meine Mitarbeit an der Publikation „Effective targeting of microglia P2X7 following intracerebroventricular delivery of nanobodies and nanobody-encoding AAVs“ von Pinto-Espinoza, Guillou, Rissiek, Wilmes et al., aus dem Jahr 2022 im Frontiers in Pharmacology darlegen. In dieser Publikation war ich vor allem an der Durchführung der in vivo Experimente, insbesondere der Experimente mit einer intrazerebroventrikulären und intravenösen Injektion, beteiligt. Des Weiteren lag ein Teil meiner Mitarbeit in der Datenanalyse. Darüber hinaus war ich als Co-Autor am Manuskript beteiligt.

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei allen Menschen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben. Besonderer Dank gilt hierbei meinem Doktorvater und Mentor Prof. Dr. Tim Magnus, der mich in jeder Phase meines Studiums und meiner Doktorarbeit sowohl mental als durch die Ebnung vieler Wege und Eröffnung zahlreicher Möglichkeiten sehr unterstützt hat. Des Weiteren möchte ich allen Mitgliedern des ERSI-Labors für ihre Hilfe bei meinen ersten wissenschaftlichen Erfahrungen danken, hierbei sind insbesondere Dr. Björn Rissiek, Dr. Peter Ludewig, Dr. Carolina Pinto-Espinoza, Dr. Ehsan Javidi sowie Oliver Schnappauf, Lennart Kuchenbecker-Pöls und Ellen Orthey zu erwähnen. Außerdem gilt ein Dank allen Co-Autoren, insbesondere denen, die mit mir an der Publikation im Journal of Neuroinflammation gearbeitet und mir somit meine erste Erst-Autorschaft ermöglicht haben.

Besonderer Dank gilt selbstverständlich meiner Familie und hierbei insbesondere meiner Mutter Claudia Wilmes für all ihre tatkräftige Unterstützung und unterstützenden Worte. Zudem danke ich meinem Vater Franz Wilmes, meinem Bruder Marc Wilmes, meinen Großeltern Beate und Josef Eickhoff und meiner Freundin Leonie Neef für ihre emotionale Unterstützung. Zuletzt danke ich meinen Kommilitonen und Freunden Mohamad Zhalka, Mourad Marouf, Tshen-Liang Cheung, Fabian Pallasch, Sanaz Ashrafi und Alexander Maletzki für ihre Hilfe/Begleitung während meines Studiums und insbesondere in der Zeit der Doktorarbeit.

## 10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....

Maximilian Wilmes

### Publikationen:

Szwargulski P., **Wilmes M.**, ..., Ludwig P., „Monitoring intracranial cerebral hemorrhage using multicontrast real-time magnetic particle imaging.“, **ASC Nano**, 14:13913 – 13923 (2020)

**Wilmes M.**, et al. "Blocking P2X7 by intracerebroventricular injection of P2X7-specific nanobodies reduces stroke lesions." **Journal of Neuroinflammation** 19.1 (2022): 1-14.

Pinto-Espinoza C., ..., **Wilmes M.**, ..., et al. "Effective targeting of microglial P2X7 following intracerebroventricular delivery of nanobodies and nanobody-encoding AAVs." **Frontiers in Pharmacology** 13 (2022).