

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Das zelluläre Prion-Protein
als Mediator der Scrapie-Prion-Protein- und
Amyloid β -induzierten Neurotoxizität:
Mechanismen und Entwicklung protektiver Strategien**

Ulrike Katrin Resenberger

aus

München, Deutschland

2012

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Jörg Tatzelt betreut und von Frau PD Dr. Konstanze F. Winklhofer von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 04.06.2012

Dissertation eingereicht am 11.06.2012

1. Gutachterin: PD Dr. Konstanze F. Winklhofer

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Tatzelt

Mündliche Prüfung am 19.07.2012

Für meine Eltern

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich an Herrn Prof. Dr. Jörg Tatzelt für das sehr interessante Thema meiner Doktorarbeit und die außerordentliche wissenschaftliche Betreuung richten. Sein großes Engagement und die zahlreichen Diskussionen haben mir wertvolle Anregungen für meine Arbeit gegeben.

Frau PD Dr. Konstanze Winklhofer möchte ich für die bereitwillige Übernahme der Fachvertretung und die hilfreichen Diskussionen herzlich danken. Sie hatte stets ein offenes Ohr für alle Fragen und unterstützte mich damit in vielerlei Hinsicht.

Prof. Dr. Dr. h.c. Haass danke ich für sein stetes Interesse und die wissenschaftliche Unterstützung. Zudem möchte ich dem gesamten Lehrstuhl der Stoffwechselbiochemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit danken.

Großer Dank gilt den Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. F. Ulrich Hartl, Prof. Dr. Dr. h.c. Kretzschmar, Prof. Dr. Gerd Multhaupt, Prof. Dr. Susan Lindquist, Dr. Michael Baier, Andreas Wörner, Dr. Anja Harmeier und Dr. Jessica Goodman, deren Unterstützung das Gelingen dieser Arbeit ermöglichte.

Ganz besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Tatzelt und Winklhofer. Vor allem möchte ich mich bei den „Mädels“ aus dem 7. Stock (Dani, Natalie, Maria P., Sina) und Vignesh für die gute Atmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit sowohl im und auch außerhalb des Labors bedanken. Großen Dank an Veronika, die mir im Labor tatkräftig zur Seite stand. Zudem möchte ich Anita, Geli, Mareike und Margit danken, die mich zu Beginn meiner Doktorarbeit herzlich im Labor aufgenommen haben.

Danken möchte ich auch meinen Freunden, die immer für mich da waren und mich stets bestärkten.

Mein größter Dank geht an meine Mutter und meinen Vater, die mich in allen Lebenslagen mit ihrer Kraft und Erfahrung unterstützt haben. Durch ihren Rückhalt und ihr Vertrauen ermöglichten sie mir meinen bisherigen Weg zu gehen. Ich möchte mich auch von ganzem Herzen bei meiner Schwester Petra, Ralph und Fabian bedanken, die mir viele hilfreiche Ideen und Durchhaltevermögen gegeben haben. Schließlich möchte ich Martin für seine Geduld und unermüdliche Motivation danken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Prion-Erkrankungen	1
1.1.1	Einführung	1
1.1.2	Prion-Erkrankungen bei Tieren	1
1.1.2.1	Scrapie	1
1.1.2.2	Bovine spongiforme Enzephalopathie	2
1.1.2.3	Chronisch zehrende Hirschkrankheit	4
1.1.3	Prion-Erkrankungen beim Menschen	5
1.1.3.1	Ätiologie der humanen Prion-Erkrankungen	5
1.1.3.2	Pathologie humaner Prion-Erkrankungen	9
1.2	Das Prion-Protein	10
1.2.1	Identifizierung infektiöser Prionen	10
1.2.2	Unterschiede zwischen PrP ^C und PrP ^{Sc}	12
1.2.3	Das Prion-Konzept	13
1.2.4	Biogenese und Lokalisation von PrP ^C	15
1.2.5	Struktur von PrP ^C	18
1.2.6	Die Spezies-Barriere	20
1.3	Die Funktionen von PrP^C	21
1.3.1	PrP- <i>Knockout</i> -Mäuse	21
1.3.2	Physiologische Funktion von PrP ^C	22
1.3.3	PrP ^C als stressprotektives Protein	22
1.3.4	Signaltransduktion über PrP ^C	24
1.3.5	Kupfer-Bindung	25
1.4	Fehlfaltung von PrP, infektiöse Prionen und Neurodegeneration	26
1.4.1	PrP ^{Sc} induziert in Abwesenheit von GPI-verankertem PrP ^C keine toxischen Effekte	26
1.4.2	Toxische PrP-Mutanten induzieren neuronale Dysfunktion in Abwesenheit infektiöser Prionen	29
1.5	Fehlfaltung von Proteinen als gemeinsames Merkmal verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen	30
1.5.1	Strukturelle Ähnlichkeit der fehlgefalteten Proteine	31
1.5.2	Die Übertragbarkeit der Prion-Erkrankung ist einzigartig unter den neurodegenerativen Erkrankungen	31
1.6	Die Rolle von molekularen Chaperonen in neurodegenerativen Erkrankungen	33
1.6.1	Der Zusammenhang zwischen molekularen Chaperonen und neurodegenerativen Erkrankungen	33
1.6.2	Die Rolle der Hitzeschock-Antwort im Schutz gegen proteotoxische Schäden	34
1.7	Zielsetzung	37

2	Ergebnisse	38
2.1	Teil 1 – Etablierung eines Hefemodells zur Generierung von rekombinantem PrP	38
2.2	Teil 2 - Das zelluläre Prion-Protein übermittelt neurotoxische Signale β-Faltblatt-reicher Konformere unabhängig von deren Primärstruktur	42
2.2.1	Etablierung eines neuartigen Modells zur Charakterisierung der Rolle von PrP ^C als Mediator neurotoxischer Signale von PrP ^{Sc}	43
2.2.1.1	Konzept	43
2.2.1.2	PrP ^C übermittelt toxische Signale von homologem und heterologem PrP ^{Sc}	45
2.2.2	PrP ^C vermittelt toxische Signale von sekretiertem oder synthetisiertem Amyloid β	51
2.2.3	PrP ^C vermittelt toxische Signale β-Faltblatt-reicher Konformere eines Hefepri- on-Proteins	59
2.2.4	PrP ^C vermittelt toxische Signale von β-Faltblatt-reichen Oligomeren eines <i>de novo</i> entworfenen Peptids (β-Peptid)	61
2.2.5	Primäre Neuronen die kein PrP ^C exprimieren sind weniger anfällig gegenüber toxischer Effekte von PrP ^{Sc} oder von dem <i>de novo</i> entworfenen β-Peptid	64
2.2.6	Modulation der toxischen Effekte β-Faltblatt-reicher Proteine	68
2.2.6.1	Die toxische Aktivität β-Faltblatt-reicher Proteine wird durch eine sekretierte Version der N-terminalen Domäne von PrP ^C verhindert	68
2.2.6.2	Ein Oligomer-spezifischer Antikörper kann die toxische Aktivität von PrP ^{Sc} und Aβ Oligomeren verhindern	71
2.2.6.3	Ein NMDA-Rezeptor-Antagonist kann die Übermittlung toxischer Signale über PrP ^C verhindern	73
2.2.7	Zusammenfassung	76
2.3	Teil 3 – Die Hitzeschock-Antwort wird von dem Scrapie-Prion-Protein und Amyloid β moduliert und greift in deren toxische Aktivität ein	77
2.3.1	Modulation der Hitzeschock-Antwort durch akute oder chronische PrP ^{Sc} - oder Aβ-Exposition	77
2.3.1.1	Die chronische PrP ^{Sc} - oder Aβ-Exposition führt zu einer gestörten Hitzeschock-Antwort	77
2.3.1.2	Eine akute PrP ^{Sc} -Exposition senkt den Schwellenwert der Hitzeschock- Antwort	83
2.3.2	Die Aktivierung der Hitzeschock-Antwort moduliert toxische Effekte von PrP ^{Sc} , Aβ und einer PrP-Mutante	86
2.3.2.1	Charakterisierung der untersuchten Zellkulturmodelle	86
2.3.2.2	Die Induktion der Hitzeschock-Antwort oder die Expression von Hsp72 kann die toxischen Effekte von PrP ^{Sc} , Aβ und einer toxischen Mutante verhindern	87
2.3.2.3	Das extrazelluläre Chaperon Clusterin hemmt die toxischen Effekte von PrP ^{Sc} und Aβ, jedoch nicht die einer toxischen PrP-Mutante	92
2.3.3	Zusammenfassung	96

3	Diskussion	97
3.1	Das zelluläre Prion-Protein ist ein Rezeptor verschiedener β -Faltblatt-reicher Liganden	97
3.2	Der GPI-Anker und die N-terminale Domäne von PrP ^C sind für die Vermittlung toxischer Signale von β -Faltblatt-reichen Proteinen essentiell	99
3.3	Welche Signalwege könnten bei den PrP ^C -vermittelten toxischen Effekten involviert sein?	101
3.4	Führen PrP ^{Sc} , A β und die PrP-Mutante PrP Δ HD zur Aktivierung gemeinsamer toxischer Signalwege?	106
3.5	Modulation der Hitzeschock-Antwort durch PrP ^{Sc} und A β	107
4	Zusammenfassung	110
5	Material	111
5.1	Biologisches Material	111
5.1.1	Immortalisierte Zelllinien	111
5.1.2	Bakterienstämme	111
5.1.3	Vektoren und Plasmide	111
5.1.4	Antikörper	111
5.1.5	Enzyme, Inhibitoren und Proteine	112
5.1.6	Standardgrößenmarker für Proteine und Nukeinsäuren	113
5.1.7	Synthetische Oligonukleotide	113
5.2	Chemikalien und Reagenzien	113
5.3	Lösungen und Puffer	115
5.4	Medien	117
5.5	Kits	118
5.6	Geräte	118
5.7	Sonstige Materialien	119
6	Methoden	120
6.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	120
6.1.1	Standard-PCR-Methode und Ligation	120
6.1.2	PCR-Bedingungen	121
6.1.3	Sequenzierung	122
6.1.4	Generierung der PrP-Konstrukte	122
6.1.4.1	PrP-Konstrukte verschiedener Spezies	122
6.1.4.2	PrP-Fc-Fusions-Konstrukte	123
6.1.5	Weitere verwendete Konstrukte	123

6.2	Bakterienkultur	124
6.2.1	Herstellung kompetenter Bakterien	124
6.2.2	Transformation kompetenter Bakterien	125
6.2.3	DNA-Präparation aus Bakterien	125
6.3	Zellkultur	125
6.3.1	Kultivierung von Zellen	125
6.3.2	Passagierung der Zellen	126
6.3.3	Ausplattieren	126
6.3.4	Transfektion	127
6.3.5	Zellernte	127
6.3.6	Isolierung und Kultivierung primärer kortikaler Neuronen	127
6.3.7	Beschichtung von Zellkulturschalen	128
6.4	Protein- und Nukleinsäureanalytik	128
6.4.1	Gesamtzelllysat	128
6.4.2	Nachweis der Löslichkeit im Lysat	128
6.4.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	129
6.4.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli	129
6.4.5	Schägger Gele	129
6.4.6	Proteintransfer auf Nitrozellulose (Western Blot)	129
6.4.7	Ponceau S-Färbung	130
6.4.8	Immundetektion der Proteine	130
6.4.9	Immunpräzipitation von PrP	131
6.4.10	Immunpräzipitation von A β	131
6.4.11	Nachweis von GPI-verankerten Oberflächenproteinen	132
6.4.12	Nachweis der Sekretion	132
6.4.13	Indirekte Immunfluoreszenz	132
6.4.14	Co-Kultivierungsexperimente der SH-SY5Y Zellen	133
6.4.15	Apoptose-Assay	133
6.4.16	Analyse der mitochondrialen Morphologie von SH-SY5Y Zellen	134
6.4.17	Behandlung mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT	134
6.4.18	Behandlung mit einem Hefeprion-Protein NM	134
6.4.19	Behandlung mit einem <i>de novo</i> entworfenen Peptid	135
6.4.20	Behandlung mit dem NMDA-Rezeptor-Antagonisten Memantin	135
6.4.21	Behandlung mit dem Oligomer-spezifischen Antikörper A11	135
6.4.22	Proteinase K-Verdau	135
6.4.23	Co-Kultivierungsexperimente und Behandlung primärer Neuronen	136
6.4.24	Bestimmung der Luziferase-Aktivität im Gesamtzelllysat	136
7	Bibliographie	138
8	Glossar	164
9	Veröffentlichungen	166

1 Einleitung

1.1 Prion-Erkrankungen

1.1.1 Einführung

Prion-Erkrankungen sind tödlich verlaufende, degenerative Erkrankungen des zentralen Nervensystems, die beim Menschen und bei einer Vielzahl von Tieren auftreten können (Prusiner 1998; Collinge 2001). Zu den charakteristischen, histopathologischen Merkmalen dieser Erkrankungen gehören astrozytäre Gliose, schwammartige Vakuolisierung des Gewebes und Ablagerungen des pathogenen Prion-Proteins in sogenannten Plaques. Aufgrund der Übertragbarkeit (engl. *transmissible*) der Prion-Erkrankungen und den schwammartigen (engl. *spongiforme*) Veränderungen des Gehirns werden sie auch als transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) bezeichnet.

Die Entstehung von Prion-Erkrankungen kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Sie können sporadisch (unbekannten Ursprungs) oder aufgrund einer pathogenen Mutation im Prion-Protein-Gen (*PRNP*) (hereditär) auftreten. Zudem kommen infektiöse Krankheitsformen vor, deren Übertragbarkeit einzigartig im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen ist. Zu den bekanntesten Prion-Erkrankungen zählen die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) und Kuru beim Menschen, Scrapie bei Schaf und Ziege, die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind und die chronisch zehrende Hirschkrankheit beim Hirsch. Im Folgenden werden die historischen Hintergründe sowie die Pathologie dieser Erkrankungen näher betrachtet.

1.1.2 Prion-Erkrankungen bei Tieren

1.1.2.1 Scrapie

Die erste dokumentierte Prion-Erkrankung ist Scrapie (Traberkrankheit), die bei Schafen und Ziegen auftritt und erstmals Mitte des 18. Jahrhunderts in Großbritannien (GB) beschrieben wurde (McGowan 1914, 1922). Im Jahr 1732 hatten Hirten auffällige Merkmale bei ihren Schafen erkannt. Neben Kratzen und

Stolpern wurden die Tiere vor allem durch starke Veränderungen ihres Verhaltens auffällig. Bereits 1759 berichtete Johann Georg Leopoldt von der Übertragbarkeit dieser Erkrankung. Cuillé und Kollegen konnten diese Vermutung experimentell belegen, indem es ihnen erstmals gelang, Schafe mit Scrapie zu infizieren (Cuillé 1936, 1938; Cuillé and Chelle 1939). Die Inkubationszeit von Scrapie beträgt 2 bis 5 Jahre, wohingegen der Tod innerhalb von 2 Wochen bis 6 Monaten nach Auftreten der ersten klinischen Symptome eintritt. Die Symptome beinhalten neben Juckreiz und Verhaltensstörungen, auch Erblindung, Ataxie, Tremor und Koordinationsprobleme. Historische Dokumentationen von Scrapie-ähnlichen Krankheiten bei Schafen deuten darauf hin, dass sich Scrapie von Spanien ausgehend, aufgrund des Merino-Schaf-Exportes, in Europa verteilte (Greig 1940; Parry 1983; Detwiler 2001). Ab 1920 stieg die Zahl der Scrapie-erkrankten Suffolk-Schafe in GB stark an. Ihr Export scheint deutlich an der weltweiten Verteilung der Erkrankung beteiligt gewesen zu sein (Hourrigan and al. 1979). Mittlerweile ist Scrapie in beinahe jedem Land mit Schafhaltung vertreten. Obwohl die Schafszucht in GB im hohen Maß von dieser infektiösen Erkrankung betroffen war, wurde die Meldepflicht klinischer Verdachtsfälle dort erst 1993 eingeführt. Mittlerweile ist die Meldepflicht in vielen Ländern in das Tierseuchengesetz aufgenommen worden.

In Norwegen wurde 1998 erstmals eine neuartige, atypische Scrapie Form (Nor98 Scrapie) identifiziert, die sich symptomatisch, insbesondere durch das Ausbleiben des Juckreizes, von der klassischen Form unterscheidet (Benestad et al. 2003; Tranulis et al. 2011). Mittlerweile wurde diese Form in beinahe allen europäischen Ländern, mit einem Fall auf den Falkland-Inseln und einem in den USA, beschrieben (Benestad et al. 2008).

1.1.2.2 Bovine spongiforme Enzephalopathie

Die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) (Rinderwahnsinn) wurde erstmals 1986 als eine neuartige Prion-Erkrankung beim Rind in GB beschrieben (Wells et al. 1987). BSE ist eine langsam voranschreitende und tödliche Erkrankung, die beim Hausrind und bei exotischen Wiederkäuern in zoologischen Gärten auftreten kann. Die Ursache der BSE-Epidemie konnte auf die Verfütterung von kontaminiertem Tiermehl zurückgeführt werden, da dieses unter anderem Scrapie-infiziertes Schafhirngewebe enthielt und dem Mischfutter

beigefügt wurde. Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Umstellung des Tiermehl-Herstellungsverfahrens wesentlich zu der Übertragung von Scrapie-Prionen auf das Rind beigetragen hat. Es wird vermutet, dass das ältere Verfahren aufgrund anderer Lösungsmittel und Hitzebehandlungen zu einer geringeren Prion-Last im Tiermehl führte, und daher, auch bei Jahrzehntelanger Fütterung, die Erkrankung nicht übertragen wurde (Wilesmith et al. 1991). Die Inkubationszeit kann zwischen 2 bis 8 Jahren betragen. Die klinischen Anzeichen sind Tremor, Gang-Abnormitäten insbesondere der Hinterläufe, Überempfindlichkeit auf Lärm und Verhaltensstörungen wie Übererregbarkeit und selten Aggressivität (Braun et al. 1997). Von 1986 bis 2000 wurden etwa 178.000 BSE-Fälle in GB registriert (Donnelly et al. 2002). Als Reaktion auf die BSE-Epidemie wurde 1988 die Meldepflicht klinischer BSE-Verdachtsfälle gesetzlich festgelegt und die Schlachtung verdächtiger oder erkrankter Tiere angeordnet. Der Epidemie-Höhepunkt wurde in GB mit über 37.000 BSE-Fällen im Jahr 1992 erreicht (Abb. 1). Obwohl die gemeldeten Fälle in GB seitdem jährlich abnahmen, stieg die Zahl an BSE-Fällen außerhalb Großbritanniens an und erreichte 2002 ihr Maximum mit über 1.000 BSE-Fällen.

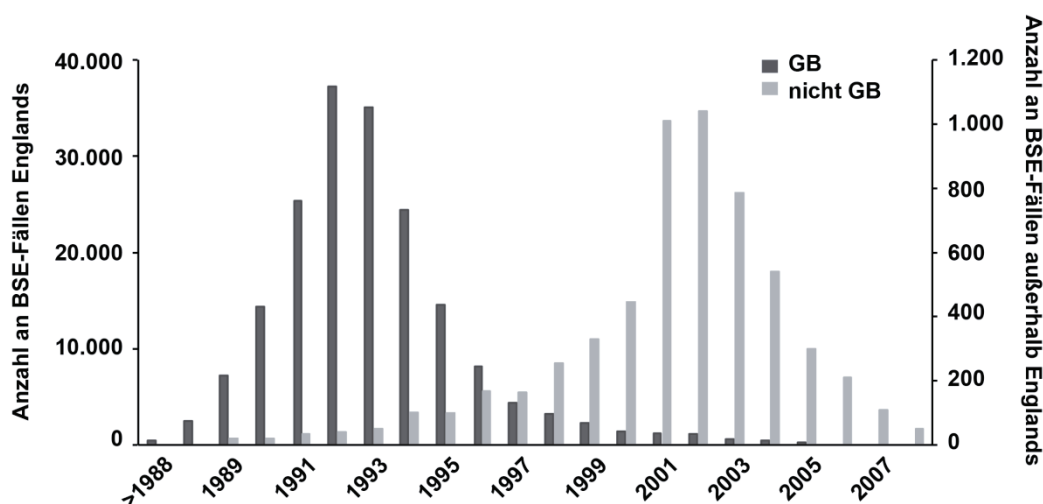


Abb. 1. Schematische Darstellung der Anzahl der BSE-Fälle in England (GB) oder außerhalb von England (nicht-GB). (Aguzzi and Calella 2009)

Im Jahr 1995 wurde in GB der erste Todesfall eines Menschen aufgrund einer neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD) bekannt (Will et al. 1996). Untersuchungen konnten zeigen, dass diese neuartige Erkrankung durch

den Verzehr BSE-kontaminierter Nahrungsmittel verursacht wurde. Näheres über die nvCJD wird im Abschnitt 1.1.3.1 beschrieben.

1.1.2.3 Chronisch zehrende Hirschkrankheit

Die Symptome der chronisch zehrenden Hirschkrankheit (engl. *chronic wasting disease*, CWD) wurden erstmals Ende der Sechzigerjahre bei in Gefangenschaft lebenden Maultierhirschen (*Odocoileus hemionus hemionus*) erkannt und im Jahr 1978 nach histopathologischer Analyse des Hirnmaterials als eine TSE diagnostiziert (Williams and Young 1980; Williams and Miller 2002). Bislang wurde die Erkrankung ausschließlich im nördlichen Teil der USA, in Kanada und bei importierten Tieren in Südkorea festgestellt. Die CWD tritt bei verschiedenen Hirscharten, wie beispielsweise dem nordamerikanischen Rothirsch (*Cervus elaphus nelsoni*), dem Schwarzwedelhirsch (*Odocoileus hemionus columbianus*) und dem Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus*), und selten bei Elchen (*Alces alces shirasi*) auf (Baeten et al. 2007; Williams and Young 1980, 1982; Gilch et al. 2011). Epidemiologische und experimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass die horizontale Übertragung der CWD durch den Kontakt zu infizierten Tieren oder zu einer kontaminierten Umwelt möglich ist (Tamguney et al. 2006; Seelig et al. 2010; Mathiason et al. 2009; Balachandran et al. 2010). Somit sind Gras oder Wasser, die durch Sekrete oder Exkremente der Hirsche kontaminiert wurden, wesentlich an der Übertragung beteiligt.

Da CWD als einzige Prion-Erkrankung auch bei wildlebenden Tieren auftritt, ist die Ausbreitung der Erkrankung schwer zu verhindern. Die Ursache der infektiösen Erkrankung ist noch nicht eindeutig geklärt, jedoch kann die Übertragung der Erkrankung durch Verfütterung von kontaminiertem Tiermehl, wie im Fall von BSE, wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Es wäre möglich, dass die Erkrankung spontan bei einem Hirsch entstanden und sich anschließend verbreitet hat. Da die Zahl infizierter Tiere in den USA und Kanada stets zunimmt, stellt CWD ein potentielles Risiko für Mensch und Tier in diesen Regionen dar. Die Trans-Spezies-Übertragung von CWD auf Mensch, Rind oder Schaf wurde in Studien kontrovers diskutiert, jedoch liegt noch keine Evidenz vor, dass CWD auf den Menschen übertragbar ist (Hamir et al. 2005; Hamir et al. 2006; Hamir et al. 2007; Belay et al. 2004; Tamguney et al. 2006; Williams and Miller 2002).

Neben den bereits beschriebenen Prion-Erkrankungen sind weitere TSE bei anderen Tierarten bekannt. Diese TSE wurden in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1. Übersicht über die Prion-Erkrankungen der Tiere.

Name der Prion-Erkrankung	Jahr, Ort der ersten Beschreibung	Referenz	Ursache	Betroffene Tierarten
Scrapie	1732, Großbritannien	(McGowan 1922)	Infektion, Genetisch	Schaf, Ziege
Transmissible Nerz Enzephalopathie (TME)	1974, USA	(Hartsough and Burger 1965)	Infektion (Futter)	Nerz
Chronisch zehrende Hirschkrankheit (CWD)	1978, USA	(Williams and Young 1980)	Infektion	Hirsch
Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)	1986, Großbritannien	(Wells et al. 1987)	Infektion (Futter)	Rind
Exotische Huftier Enzephalopathie (EUE)	1988, Großbritannien	(Jeffrey and Wells 1988) (Kirkwood et al. 1990)	Infektion (Futter)	Huftier
Feline spongiforme Enzephalopathie (FSE)	1990, Großbritannien	(Leggett et al. 1990) (Pearson et al. 1991)	Infektion (Futter)	Haus- und Wildkatze

1.1.3 Prion-Erkrankungen beim Menschen

1.1.3.1 Ätiologie der humanen Prion-Erkrankungen

Im Laufe des letzten Jahrhunderts konnten beim Menschen mehrere Prion-Erkrankungen identifiziert werden, die durch Neurodegeneration, strukturelle Veränderungen des Gehirns und dem damit verbundenen Verlust allgemeiner Gehirnfunktionen, charakterisiert sind (Tabelle 2). Sie können in drei ätiologische Kategorien eingeteilt werden: sporadisch (unbekannten Ursprungs), vererbbar (hereditär) oder übertragbar (infektiös).

Etwa 85% der humanen Prion-Erkrankungen treten ohne erkennbare Ursache als sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJD) mit einer Inzidenz von einem Fall pro 1 Million Einwohner auf (Wadsworth et al. 2003). Bereits in den Jahren 1920 und 1921 wurde die sCJD von den Neurologen Hans G. Creutzfeldt und Alfons Jakob erstmals beschrieben (Creutzfeldt 1920; Jakob 1921). Die Ursache ist bislang unbekannt, jedoch könnten somatische Mutationen im Prion-Protein-

Gen (*PRNP*) oder eine spontane Konformationsänderung des Prion-Proteins ein möglicher Grund sein (Collinge 1997). Im Jahr 1999 wurde eine weitere sporadische Prion-Erkrankung entdeckt, die aufgrund der klinischen Symptome als sporadische fatale Insomnie (SFI) bezeichnet wurde (Parchi et al. 1999; Mastrianni et al. 1999).

Tabelle 2. Übersicht über die humanen Prion-Erkrankungen.

Name der Prion-Erkrankung	Jahr, Ort der ersten Beschreibung	Referenz	Ätiologie
Sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJD)	1920, Deutschland	(Creutzfeldt 1920) (Jakob 1921)	Unbekannt
Familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJD)	1924, Deutschland	(Kirschbaum 1924) (Kirschbaum 1968)	Mutation im PrP-Gen
Gerstmann-Sträussler-Schenker Syndrom (GSS)	1936, Österreich	(Gerstmann et al. 1936)	Mutation im PrP-Gen
Kuru	1957, Papua-Neuguinea	(Gajdusek and Zigas 1957) (Hadlow 1959) (Gajdusek et al. 1966)	Ritueller Kannibalismus
Iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (iCJD)	1974, USA	(Duffy et al. 1974)	Infektion durch ärztliche Behandlung
Fatale Familiäre Insomnie (FFI)	1986, Italien	(Lugaresi et al. 1986)	Mutation im PrP-Gen
Neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD)	1996, Großbritannien	(Will et al. 1996)	Infektion
Sporadische Fatale Insomnie (SFI)	1999, USA	(Parchi et al. 1999) (Mastrianni et al. 1999)	Unbekannt

Ungefähr 15% der humanen Prion-Erkrankungen sind vererbbar, wobei bislang alle auf autosomal-dominante, pathogene Mutationen in *PRNP* zurückzuführen sind. Abbildung 2 gibt einen Überblick der über 50 *PRNP*-Mutationen, die mit Prion-Erkrankungen assoziiert sind (Collinge 1997; Wadsworth et al. 2003). Die familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJD), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom (GSS) oder die fatale familiäre Insomnie (FFI) sind drei Untergruppen der familiären Prion-Erkrankungen, die sich anhand ihres klinischen Erscheinungsbildes unterscheiden lassen (Kirschbaum 1924, 1968; Gerstmann et al. 1936; Lugaresi et al. 1986; Collins et al. 2001).

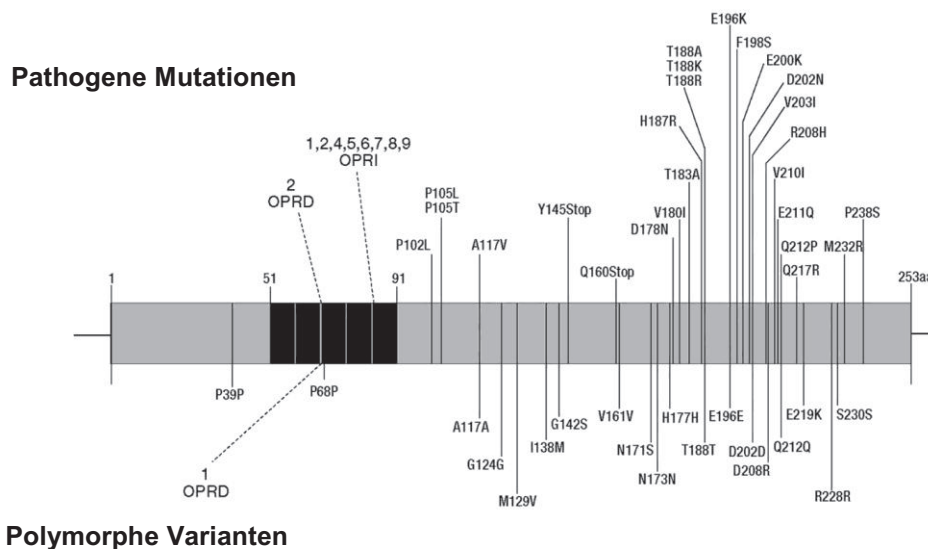


Abb. 2. Pathogene Mutationen und Polymorphismen des humanen Prion-Proteins.

Schematische Darstellung der PrP-kodierenden Sequenz. Oberhalb der Sequenz befinden sich pathogene Mutationen und unterhalb der Sequenz polymorphe Varianten des humanen Prion-Proteins. OPRD, Octapeptidrepeat-Deletion; OPRI, Octapeptidrepeat-Insertion (Wadsworth et al. 2003).

Die dritte ätiologische Kategorie sind übertragbare Prion-Erkrankungen und treten im Vergleich zu der sporadischen oder hereditären Form sehr selten auf. Die erste dokumentierte Erkrankung dieser Art ist Kuru, die sich auf den Stamm der Fore in Papua Neuguinea beschränkte. Es handelt sich hierbei um eine Erkrankung, die aufgrund von rituellem Kannibalismus innerhalb dieses Stammes übertragen wurde. Gemäß Berichten wurden die ersten Kuru-Fälle auf Anfang des 20. Jahrhunderts datiert (Gajdusek and Zigas 1957; Collinge 2001). Kurz nach der ersten Beschreibung dieser Erkrankung, erkannte William J. Hadlow Ähnlichkeiten in Epidemiologie, klinischen Zeichen und neuropathologischen Merkmalen zwischen Scrapie und Kuru (Hadlow 1959). 1966 konnte die Übertragbarkeit von Kuru experimentell bewiesen werden, indem Schimpansen mit Kuru infiziert wurden (Gajdusek et al. 1966). Somit wurde ein halbes Jahrhundert nach der ersten experimentellen Infektion von Schafen mit Scrapie (Cuillé 1936, 1938; Cuillé and Chelle 1939), die Übertragbarkeit einer humanen Erkrankung auf Schimpansen demonstriert. Die Übertragung humaner Prion-Erkrankungen gewann an Bedeutung, als bekannt wurde, dass die medizinische Behandlung mit menschlichen Wachstumshormonen, die Implantation eines

Dura-mater-Transplantats oder eine Hornhauttransplantation die Ursache für eine Infektion mit Prion-Erkrankungen sein kann (iatrogene CJD, iCJD). Des Weiteren kann die Krankheit durch Verwendung von kontaminierten Operationsbesteck oder Apparaturen übertragen werden (Wadsworth et al. 2003; Brown et al. 2000; Koch et al. 1985; Duffy et al. 1974). Bislang sind etwa 180 iCDJ-Fälle weltweit dokumentiert worden.

Die bekannteste infektiöse Prion-Erkrankung beim Menschen ist die neue Variante der CJD. 1995 trat der erste Todesfall aufgrund der nvCDJ auf (Will et al. 1996). Untersuchungen deuten darauf hin, dass die nvCDJ durch die Übertragung von BSE-Prionen auf den Menschen hervorgerufen wurde (Bruce et al. 1997; Scott et al. 1999; Collinge and Rossor 1996; Collinge et al. 1996). In den Jahren nach dem Höhepunkt der BSE-Epidemie, stieg die Zahl der nvCJD-Fälle insbesondere in GB an (Abb. 3).

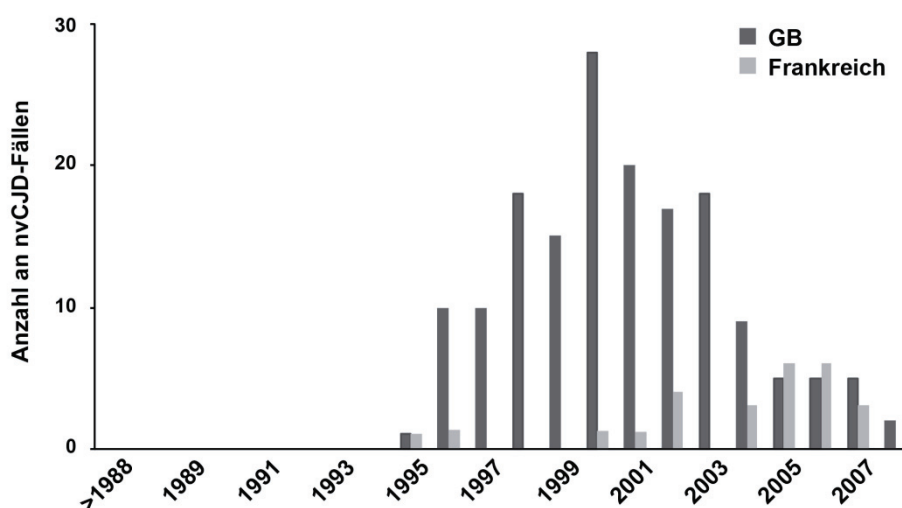


Abb. 3. Schematische Darstellung der Anzahl der nvCJD-Fälle in England (GB) und Frankreich. (Aguzzi and Calella 2009)

Bis April 2012 sind in GB 176 Fälle, in Frankreich 25 Fälle, und in der Summe weltweit 225 nvCJD-Fälle aufgetreten (siehe National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit Website www.cjd.ed.ac.uk/vcjdworld.html). Da die Inkubationszeit infektiöser Prion-Erkrankungen sehr lang sein kann, bleibt abzuwarten, ob in Zukunft eine nvCJD-Epidemie in GB oder in anderen Ländern ausbrechen wird.

1.1.3.2 Pathologie humaner Prion-Erkrankungen

Humane Prion-Erkrankungen unterschiedlicher Ätiologie sind mit einer Vielzahl von klinischen Symptomen assoziiert. Aufgrund der pathogenen Umstrukturierung des Gehirns der Patienten kommt es unter anderem zu psychischen, sensorischen und motorischen Veränderungen sowie Demenz, wobei die Intensität des jeweiligen Symptoms zwischen den Erkrankungen erheblich variieren kann (Wadsworth et al. 2003; Collinge 2001; Collins et al. 2001). Wesentliche Unterscheidungsmerkmale der humanen TSE sind die eben genannten Variationen der Symptome, das Alter, in dem sich die Krankheit manifestiert und die Krankheitsdauer nach Ausbruch der Erkrankung bis zum Eintritt des Todes. Die Unterschiede des klinischen Krankheitsbildes sind jedoch nicht für eine eindeutige Diagnosestellung ausreichend. Dies ist bislang erst nach dem Tod anhand der histopathologischen Veränderungen und dem Nachweis des pathogenen Prion-Proteins (PrP) möglich. Die charakteristischen neuropathologischen Merkmale der TSE sind spongiforme Vakuolisierung des Hirngewebes, astrozytäre Gliose und die Ablagerung von PrP in sogenannten Amyloid-Plaques (Abb. 4) (Glatzel and Aguzzi 2001).

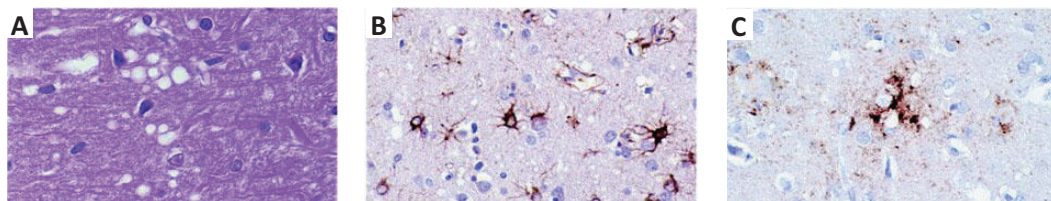


Abb. 4. Charakteristische neuropathologische Merkmale der TSE.

Die graue Substanz eines CJD-Patienten-Gehirns wurde auf spongiforme Vakuolisierung (A), astrozytäre Gliosis (B) und Ablagerung von PrP-Amyloid-Plaques (C) untersucht. Gezeigt werden Gehirnschnitte, die unter Verwendung des Hematoxylin-Eosin Farbstoffs (A), eines Antikörpers gegen das Saure Gliafaserprotein (GFAP) (B) oder eines anti-PrP Antikörpers (C) gefärbt wurden (Glatzel and Aguzzi 2001).

Diese Veränderungen sind charakteristisch für die jeweilige Prion-Erkrankung und können somit zur Diagnose herangezogen werden. PrP-Plaques beispielsweise treten in verschiedenen Formen und Größen auf (Abb. 5). So können je nach Ätiologie der Erkrankung und Genotyp des Patienten diffuse oder

scharf abgegrenzte Plaques in unterschiedlicher Häufigkeit vor kommen (Brandner et al. 2008).

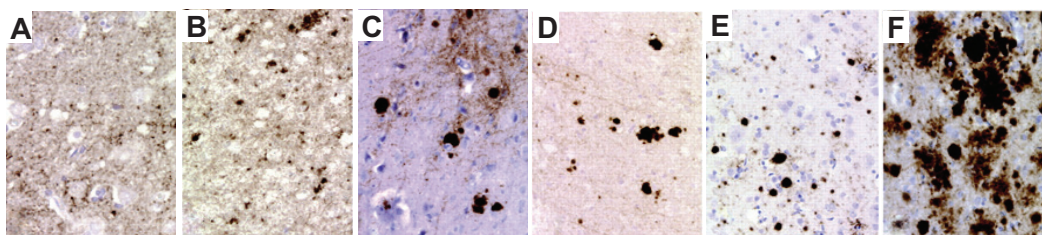


Abb. 5. Vergleich der PrP-Amyloid-Plaques in sCJD, iCJD und vCJD.

Gezeigt werden Gehirnschnitte von Patienten, die an unterschiedlichen Prion-Erkrankungen verstorben sind. (A, B) sCJD, (C) iCJD, hervorgerufen durch die Behandlung mit kontaminierten Wachstumshormonen, (D) Kuru, (E, F) vCJD (Brandner et al. 2008).

1.2 Das Prion-Protein

1.2.1 Identifizierung infektiöser Prionen

Ein einzigartiges Merkmal der Prion-Erkrankungen im Vergleich zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen ist deren Übertragbarkeit. Prion-Erkrankungen wurden ursprünglich als viral-bedingte Erkrankungen beschrieben, wobei die lange Inkubationszeit durch einen „langsamen“ Virus begründet wurde (*slow virus theory*) (Sigurdsson 1954). Dies entsprach der damaligen Ansicht, dass ausschließlich Nukleinsäuren in der Lage sind, biologische Information zu replizieren und diese zu übertragen. Aus diesem Grund wurde auch bei der humanen Prion-Erkrankung Kuru vermutet, dass sie durch „langsame Viren“ hervorgerufen wird (Hadlow 1959). Eine Bestrahlung von Gehirnextrakten Scrapie-infizierter Mäuse mit ultraviolettem Licht oder ionisierender Strahlung führte jedoch nicht zu der Inaktivierung des infektiösen Agens (Alper et al. 1966; Alper et al. 1967; Latarjet et al. 1970). Diese Beobachtung war der erste Hinweis, dass die Replikation des infektiösen Agens nicht von Nukleinsäuren abhängig ist. Die Theorie wurde von John Stanley Griffith erweitert, indem er postulierte, dass das infektiöse Agens aus einem sich selbst verbreitenden Protein besteht und frei von Nukleinsäuren ist (Griffith 1967).

Im Jahr 1982 konnte ein Proteinase K (PK)-resistentes Glykoprotein identifiziert werden, das gemeinsam mit dem infektiösen Agens aus Scrapie-infizierten Hamster-Gehirnen aufgereinigt wurde (Bolton et al. 1982). Aufgrund seines Molekulargewichts von 27 bis 30 kDa wurde es Prion-Protein (PrP) 27-30 genannt. Daraufhin führte Prusiner den neuartigen Begriff **Prion** (Akronym für *proteinaceous infectious particle*) ein, der das übertragbare Agens deutlich von Viroiden und Viren abgrenzt. Zudem stellte er die Hypothese auf, dass das infektiöse Agens ein Protein ist, das sich in Abwesenheit von Nukleinsäuren vermehren kann (Protein-*only*-Hypothese) (Prusiner 1982; Prusiner 1997).

Die Sequenzierung der N-terminalen Primärstruktur des PrP27-30 (Prusiner et al. 1984) ermöglichte es zwei voneinander unabhängigen Forschungsgruppen das Prion-Protein-Gen (*PRNP*) zu identifizieren (Oesch et al. 1985; Chesebro et al. 1985). Da das Prion-Protein konstitutiv exprimiert wird und die Expression per se nicht zu der Entstehung einer Prion-Erkrankung führt, wurde es als zelluläres Prion-Protein (PrP^C) bezeichnet. Zudem konnte gezeigt werden, dass die PrP-Primärstruktur in nicht-infizierten und Scrapie-infizierten Hamster-Gehirnen identisch ist und die PrP-mRNA-Mengen sich während einer Scrapie-Infektion nicht verändern (Basler et al. 1986; Weissmann et al. 1996; Collinge 2001; Prusiner et al. 1998). Daraus wurde gefolgert, dass bei einer Prion-Erkrankung neben PrP^C eine fehlgefaltete, pathogene Scrapie-PrP-Form (PrP^{Sc}) vorkommt, deren PK-resistenter Kern das PrP27-30 ist (Prusiner et al. 1984; Basler et al. 1986; Oesch et al. 1985; Meyer et al. 1986; Locht et al. 1986).

PrP^{Sc} stellt die Hauptkomponente infektiöser Prionen in Menschen und Tieren dar (Prusiner 1991; Aguzzi and Polymenidou 2004). In zusätzlichen Studien wurde die Anwesenheit weiterer Bestandteile von Prionen näher betrachtet. Es konnten zwar Polynukleotide neben PrP^{Sc} in dem infektiösen Agens identifiziert werden, jedoch sind sie nicht länger als 25 Nukleotide und weisen variable Sequenzen auf. Diese Resultate argumentieren gegen eine essentielle Rolle von Nukleinsäuren bei der Übertragung infektiöser Prionen (Safar et al. 2005). Des Weiteren beinhalten Prionen Lipide und Polysaccharide (Klein et al. 1998; Appel et al. 1999; Dumpitak et al. 2005), deren Relevanz noch nicht geklärt ist.

1.2.2 Unterschiede zwischen PrP^C und PrP^{Sc}

Obwohl die Primärstruktur und post-translationale, chemische Modifikationen von PrP^C und PrP^{Sc} gleich sind (Stahl et al. 1993), weisen sie deutliche Unterschiede in Bezug auf ihre biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften auf. Das PrP^C ist sensitiv gegenüber einem proteolytischen Verdau, löslich in milden Detergenzien und besitzt vorwiegend α -helikale Sekundärstrukturen (Oesch et al. 1985; Meyer et al. 1986). Im Gegensatz dazu ist PrP^{Sc} teilweise PK-resistent, unlöslich in nicht-ionischen Detergenzien und weist einen erhöhten Anteil an β -Faltblatt-reichen Strukturen auf (Meyer et al. 1986) (Caughey et al. 1991; Pan et al. 1993). Außerdem tendiert PrP^{Sc} zur Ausbildung von schwerlöslichen Aggregaten. Obwohl die Struktur von PrP^C anhand NMR- und Kristallstruktur-Analysen aufgeklärt werden konnte, war es bislang nicht möglich die Struktur von PrP^{Sc} zu ermitteln (Donne et al. 1997; Riek et al. 1996; James et al. 1997; Zahn et al. 2000; Riek et al. 1997; Antonyuk et al. 2009; Lu et al. 2007). Trotzdem konnten mittels Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (Pan et al. 1993) und Circular dichroismus-Spektroskopie (Safar et al. 1993) der α -helikale und β -Faltblatt Anteil von PrP^{Sc} bestimmt werden. Im Vergleich zu PrP^C weist PrP^{Sc} einen deutlich höheren Anteil an β -Faltblatt-reichen Strukturen auf. In Tabelle 3 wurden die dargestellten Unterscheidungsmerkmale nochmals zusammengefasst.

Tabelle 3. Wesentliche Unterscheidungsmerkmale von PrP^C und PrP^{Sc}.

PrP ^C	PrP ^{Sc}
Protease-sensitiv	Partiell Protease-resistent
Löslich in milden Detergenzien	Unlöslich in nicht-ionischen Detergenzien
α -helikale Anteil: ~ 40% des Proteins β -Faltblatt: ~ 3% des Proteins (Hornemann et al. 1997; Riek et al. 1996; Knaus et al. 2001; Antonyuk et al. 2009)	α -helikale Anteil: ~ 30% des Proteins β -Faltblatt: ~ 40% des Proteins (Pan et al. 1993; Safar et al. 1993)

1.2.3 Das Prion-Konzept

Das zentrale molekulare Ereignis bei der Vermehrung von Prionen ist die Konversion der Konformation von PrP^C zu PrP^{Sc}. Da PrP^C ein hochkonserviertes Protein ist, wird angenommen, dass alle TSE bei Mensch und Tier auf demselben Mechanismus beruhen. Gemäß der Protein-*only*-Hypothese gibt es zwei Modelle, die die Konformationsänderung von PrP^C zu PrP^{Sc} und den folgenden Aggregationsprozess beschreiben (Aguzzi and Calella 2009; Surewicz and Apostol 2011).

Prusiner und Kollegen legten erstmals das *template-assistance*-Modell beziehungsweise *heterodimer-refolding*-Modell dar (Abb. 6) (Prusiner 1991). Nach diesem Modell interagiert PrP^{Sc} mit PrP^C, bildet ein heterodimeres Zwischenprodukt aus und initiiert dadurch die Konformationsänderung von PrP^C (Prusiner et al. 1990a; Meier et al. 2003). Das Heterodimer dient somit als Vorlage (engl. *template*) für die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc}. PrP^{Sc} ist thermodynamisch stabiler als PrP^C, jedoch wird die spontane Konversion von PrP^C in Abwesenheit von PrP^{Sc} durch eine hohe Energiebarriere verhindert. Neugebildetes PrP^{Sc} kann wiederum an PrP^C binden und dessen Konversion induzieren. Aus diesem Grund handelt es sich hierbei um einen autokatalytischen Prozess. Da bislang kein PrP^C/PrP^{Sc}-Komplex isoliert werden konnte, ist es immer noch unklar, ob PrP^C einen oder mehrere PrP^{Sc}-Moleküle während des Konversionsprozesses bindet.

Aufgrund des hydrophoben Charakters von PrP^{Sc} tendiert es dazu, Aggregate (Prionen) unterschiedlicher Größe auszubilden, die als infektiöses Agens die Erkrankung übertragen. Bislang gibt es jedoch noch keinen experimentellen Beweis für die Existenz eines stabilen PrP^{Sc} Monomers. Aus diesem Grund wird vermutet, dass die Konversion eng mit dem Aggregationsprozess verbunden ist (Swietnicki et al. 2000; Morillas et al. 2001; Caughey and Lansbury 2003).

Das zweite Modell ist das *seeding*- oder *nucleation-polymerization*-Modell (McKinley et al. 1991; Jarrett and Lansbury 1992, 1993). Unter normalen Bedingungen besteht ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen PrP^C und seiner Isoform PrP^{Sc}, wobei das Gleichgewicht deutlich auf der Seite von PrP^C liegt und somit nur minimale Mengen an PrP^{Sc} vorhanden sind. Aus diesem

Grund ist in dieser Hypothese das infektiöse Agens nicht PrP^{Sc}, sondern ein Keim (engl. *seed*), der durch Aufeinandertreffen mehrerer PrP^{Sc}-Moleküle gebildet wird. Dieser stabile oligomere Keim ermöglicht das Anlagern weiterer Monomere, stabilisiert die PrP^{Sc}-Konformation und verlagert dadurch das Gleichgewicht auf dessen Seite. Die initiale Ausbildung des Keims läuft sehr langsam und mit geringer Wahrscheinlichkeit ab. Im Gegensatz dazu ist die Anlagerung von PrP^{Sc}-Monomeren an einen bereits bestehenden infektiösen Keim schnell und führt zu einem Amyloid, dessen Fragmentierung weitere infektiöse Keime entstehen lässt. Diese können ebenfalls PrP^{Sc}-Monomere anlagern und beschleunigen damit die Vermehrung des infektiösen Agens.

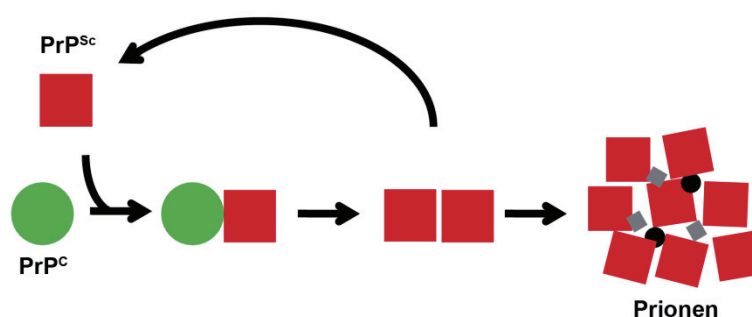


Abb. 6. Schematische Darstellung des Prion-Konzepts (*template-assistance-Modell*).

Bei Interaktion von PrP^C (grüner Kreis) mit seiner pathogenen Isoform PrP^{Sc} (rotes Quadrat) konvertiert die Konformation von PrP^C zu der β -Faltblatt-reichen Struktur des PrP^{Sc} (autokatalytischer Prozess). PrP^{Sc}-Moleküle aggregieren zu Prionen, die im geringen Maß Einschlüsse von Lipiden und Polysacchariden aufweisen.

Ein Beleg für die Protein-*only*-Hypothese ist ein neuartiges *in vitro*-Modell namens *Protein Misfolding Cyclic Amplification* (PMCA), anhand dessen die Amplifikation von geringen Mengen des fehlgefalteten PrP^{Sc} möglich ist (Saborio et al. 2001; Castilla et al. 2005; Castilla et al. 2006; Mestel 1996). Die PMCA besteht aus mehreren Zyklen, wobei jeder Zyklus aus zwei Phasen, die Inkubations- und die Ultraschallbehandlungs-Phase, besteht. Während der ersten Phase wird eine geringe Menge an PrP^{Sc} mit einem Überschuss an PrP^C inkubiert. Hierfür werden als PrP-Quellen meist Gehirn-Homogenate infizierter beziehungsweise nicht-infizierter Tiere verwendet. Durch eine anschließende Ultraschallbehandlung werden die entstandenen PrP^{Sc}-Aggregate fragmentiert

und dadurch die Anzahl der Konversions-Keime erhöht. Die mehrmalige Wiederholung von diesem Zyklus führt zu einer für weitere Analysen ausreichenden Menge an fehlgefaltetem PrP^{Sc}-Konformer (Surewicz and Apostol 2011). Castilla und Kollegen konnten zeigen, dass die Inokulation des PMCA-Produkts in Hamster-Gehirnen zu einer klassischen Scrapie-Prion-Erkrankung führt. Somit konnte erstmals die Infektiosität der Prionen in einem zellfreien System amplifiziert werden (Castilla et al. 2005; Castilla et al. 2008). Diese neue Technologie stellt eine Möglichkeit dar, dem Konversionsprozess unterliegende Mechanismen sowie damit interferierende therapeutische Ansätze mit geringem Zeit- und Kostenaufwand zu analysieren. Des Weiteren könnte die PMCA in der Diagnostik der Prion-Erkrankungen zum Einsatz kommen, da bereits geringe Mengen an PrP^{Sc} in peripherem Gewebe wie beispielsweise lymphatische Organe oder Blut nachweisbar wären (Brown et al. 2001; Aguzzi 2000; Wadsworth et al. 2001).

Interessanterweise deuten Daten, die anhand der PMCA-Methode und in transgenen Mäusen generiert wurden, darauf hin, dass die Anwesenheit von zusätzlichen zellulären Faktoren für die effiziente Vermehrung benötigt werden (Telling et al. 1995; Saborio et al. 1999). Beispiele hierfür sind Polyanionen wie Poly(A)-RNA und Fettsäuren (Deleault et al. 2007; Lee and Caughey 2007; Wang et al. 2010; Surewicz and Apostol 2011). Die Relevanz dieser Faktoren bei der Vermehrung von Prionen wird jedoch kontrovers diskutiert (Kim et al. 2010), so dass weitere Studien notwendig sind, um diese Fragestellung eindeutig zu klären.

1.2.4 Biogenese und Lokalisation von PrP^C

Das PrP-Gen liegt auf Chromosom 20, wobei die gesamte Protein-kodierende Sequenz (ORF, engl. *open reading frame*) in einem Exon lokalisiert ist (Oesch et al. 1985; Chesebro et al. 1985). Das davon kodierte PrP^C ist ein Glykoprotein, das in der äußeren Lipidschicht der Plasmamembran über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker verankert ist. Wie andere Membranproteine wird PrP^C über den sekretorischen Weg post-translational modifiziert. Im Folgenden werden die Biogenese von PrP^C und die Funktionen

der verschiedenen PrP-Domänen genauer betrachtet (Tatzelt and Winklhofer 2004; Miesbauer et al. 2009).

Die Biogenese von PrP^C beginnt an freien Ribosomen im Zytosol. PrP weist am N-Terminus eine Signalsequenz auf, die von dem Signalerkennungspartikel (SRP, engl. *signal recognition particle*) erkannt und gebunden wird. SRP leitet den gebundenen Komplex aus Ribosom und naszierender Polypeptid-Kette zu dem Sec61-Translokon, das in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert ist (Abb. 7A) (Gilmore et al. 1982a; Gilmore et al. 1982b; Meyer and Dobberstein 1980; Walter and Blobel 1980; Walter and Blobel 1982; Walter et al. 1984). Nach der Bindung von SRP an seinen Rezeptor an der ER-Membran erfolgt die co-translationale Translokation der Polypeptid-Kette in das raue ER. Währenddessen wird die ER-Signalsequenz durch die Signalpeptidase entfernt und die Kern-Glykane N-glykosidisch gebunden. PrP enthält zwei N-Glykosylierungsstellen (Asparagin 180 und 196, Maus-PrP), die beide mit Glykanen besetzt werden (Abb. 7B). Sobald PrP komplett in das ER transloziert wurde, wird die GPI-Signalsequenz (GPI-SS) gegen einen GPI-Anker an der Position 230 (Serin) ausgetauscht (Abb. 7C). Anschließend erfolgt im Golgi-Apparat die komplexe Glykosylierung der Glykane, die im Gegensatz zur Kern-Glykosylierung protein- und zelltypspezifisch ist (Abb. 7D) (Kornfeld and Kornfeld 1985; Helenius and Aebi 2001; Parodi 2000). Von dort wird PrP zu der Plasmamembran transportiert, in deren äußeren Lipidschicht es in speziellen cholesterolreichen Mikrodomänen, den sogenannten *Lipid-Rafts*, verankert vorliegt (Abb. 7E).

Es konnte gezeigt werden, dass an der Oberfläche-lokalisiertes PrP^C über Clathrin- oder Caveolae-vermittelte Endozytose internalisiert (Sunyach et al. 2003; Shyng et al. 1994; Peters et al. 2003; Marella et al. 2002) und anschließend in Lysosomen enzymatisch abgebaut wird (Abb. 7F).

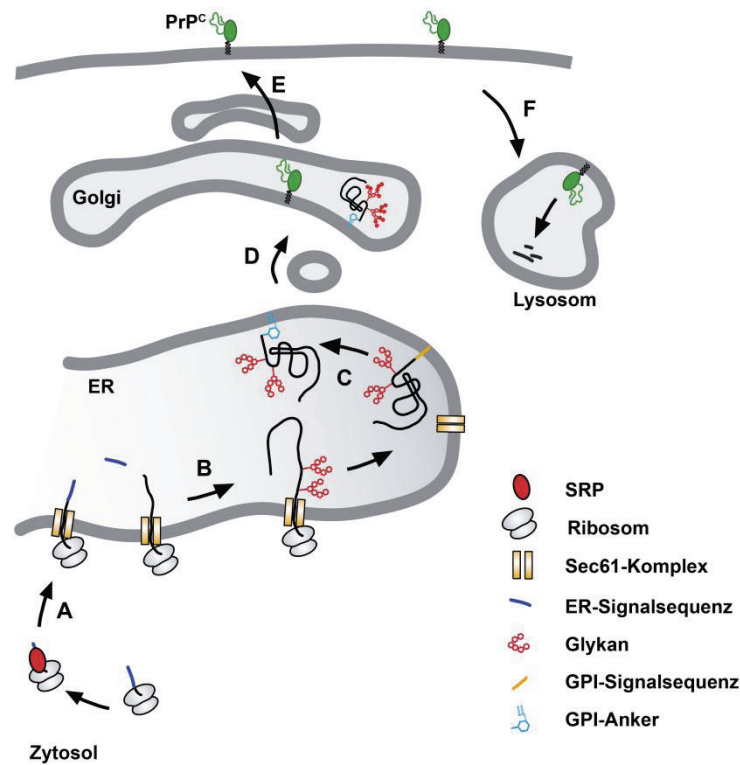


Abb. 7. Biogenese und Lokalisation von PrP^C.

Die Biogenese von PrP beginnt an freien Ribosomen im Zytosol. PrP weist am N-Terminus eine ER-Signalsequenz auf, die von dem Signalerkennungspartikel SRP erkannt und gebunden wird. SRP leitet den gebundenen Komplex aus Ribosom und der naszierender Polypeptid-Kette zu dem Sec61-Translokon, das in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert ist (A). Die Translokation der Polypeptid-Kette in das raue ER erfolgt co-translational. Währenddessen wird die ER-Signalsequenz durch die Signalpeptidase entfernt und die Kern-Glykane N-glykosidisch gebunden (B). Sobald PrP komplett in das ER transloziert wurde, wird die GPI-Signalsequenz gegen einen GPI-Anker ersetzt (C). Im Golgi-Apparat werden die N-verknüpften Glykane komplex glykosyliert (D) und von dort zu der Plasmamembran transportiert, in deren äußeren Lipidschicht es verankert vorliegt (E). Das an der Zelloberfläche-lokalisierte PrP^C wird über Clathrin- oder Caveolae-vermittelte Endozytose internalisiert und in Lysosomen enzymatischen abgebaut (F).

1.2.5 Struktur von PrP^C

PrP^C ist ein hochkonserviertes Protein, das in Amphibien, Reptilien, Vögeln und Säugern vorkommt. Anhand von NMR-Struktur- und Kristallstruktur-Analysen konnte die dreidimensionale Struktur des humanen PrP bestimmt werden (Zahn et al. 2000; Antonyuk et al. 2009). Interessanterweise sind sich die PrP^C-Sekundärstrukturen der oben genannten Tierarten sehr ähnlich. NMR-Stuktur-Analysen zeigten, dass alle eine unstrukturierte N-terminale (AS 23-120, Maus-PrP) und eine hochstrukturierte C-terminalen Domäne (AS 121-231, Maus-PrP) aufweisen (Donne et al. 1997; Riek et al. 1996; James et al. 1997; Riek et al. 1997; Wuthrich and Riek 2001; Lysek et al. 2005; Calzolari et al. 2005; Hornemann et al. 2009). In Abbildung 9 ist die Sekundärstruktur von Mensch-PrP und Maus-PrP illustriert. Der globulär gefaltete C-terminale Bereich enthält drei α -Helices und zwei kurze β -Stränge, die ein antiparalleles β -Faltblatt ausbilden (Abb. 8). Helix 2 und 3 sind über eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten C179 und C214 (Maus-PrP) kovalent miteinander verbunden.

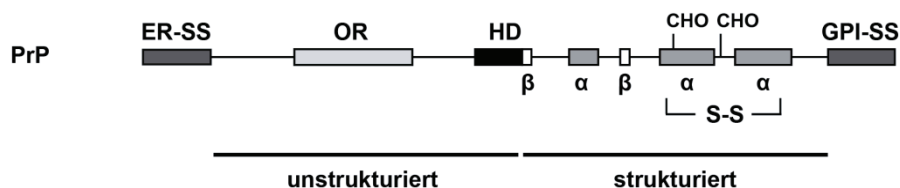


Abb. 8. Schematische Darstellung von Maus-PrP.

PrP, Prion-Protein; ER-SS, ER-Signalsequenz (AS 1-22); OR, Octarepeat-Region; HD, Hydrophobe Domäne; α , alpha-helikale Domäne; β , beta-Strang; GPI-SS, GPI-Signalsequenz (AS 232-254); CHO, Glykosylierungsstellen an den Asparaginen N181 und N197. Eine Disulfidbrücke befindet sich zwischen den Cysteinen C179 und C214. PrP weist eine unstrukturierte N-terminale Domäne (AS 23-120) und eine hochstrukturierte C-terminalen Domäne (AS 121-231) auf.

Im Gegensatz zu der globulär strukturierten C-terminalen Domäne von PrP, ist die N-terminale Domäne äußerst flexibel. Zudem konnten NMR-Analysen zeigen, dass dieser Teil intrinsisch unstrukturiert ist (Riek et al. 1996; Riek et al. 1997; Donne et al. 1997). Der N-terminale Bereich beinhaltet die *Octarepeat* (OR)-Region (AS 60-91, Maus-PrP), die charakteristisch für PrP ist und vermutlich bei der physiologischen Funktion von PrP^C eine Rolle spielt (vgl. Abschnitt 1.3.5). Die OR-Region ist ein hochkonserviertes Motiv, das sich aus Wiederholungen der

Aminosäure-Sequenz PHGGGWGQ und einer minimal veränderten Sequenz (*Pseudorepeat*) PQGGGWGQ zusammensetzt. Die Anzahl der Wiederholungen variiert zwischen den verschiedenen Spezies. Weitere charakteristische Merkmale von PrP sind die hydrophobe Domäne (HD) und zwei N (Asparagin)-Glykosylierungsstellen, die im Maus-PrP an den Positionen 181 und 197 liegen.

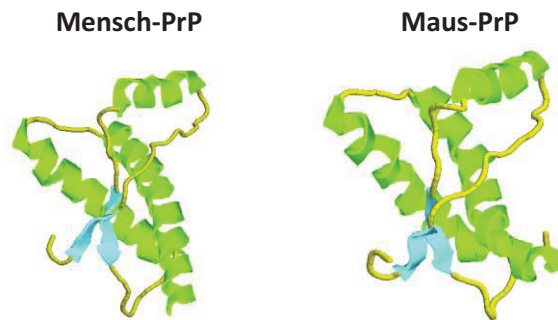


Abb. 9. Sekundärstruktur von PrP^C unterschiedlicher Spezies.

Gezeigt sind die NMR-Strukturen von Mensch-PrP und Maus-PrP. Beide Proteine weisen drei α -Helices (grün) und zwei kurze β -Stränge, die ein antiparalleles β -Faltblatt ausbilden (blau), auf (Riesner 2003).

Trotz der sich stark ähnelnden Sekundärstruktur der verschiedenen Spezies konnten teilweise Unterschiede in der Dynamik der Schleife zwischen dem β -Strang 2 und der α -Helix 2 festgestellt werden (Gossert et al. 2005). Im Gegensatz zu den flexiblen Eigenschaften in den meisten Spezies, ist die Schleife im Wapiti- und Hirsch-PrP starr. Es wurde diskutiert, dass die Variationen in der Schleifen-Dynamik einen Einfluss auf die Übertragbarkeit einer Prion-Erkrankung zwischen zwei Spezies haben könnten (Sigurdson et al. 2010; Sigurdson et al. 2009; Surewicz and Apostol 2011).

1.2.6 Die Spezies-Barriere

Obwohl sich die PrP^C-Sekundärstruktur der unterschiedlichen Spezies einander stark ähneln (Wopfner et al. 1999; Calzolari et al. 2005), ist die effiziente Übertragung der Prion-Erkrankungen zwischen verschiedenen Säugetierarten limitiert (Scott et al. 1989; Weissmann et al. 1994). Dieses Phänomen wird als Spezies-Barriere bezeichnet (Pattison 1965). Obwohl der Grund dieser Barriere noch nicht vollständig geklärt ist, deuten Tiermodell- und *in vitro*- Studien darauf hin, dass sie auf Unterschiede in der Primärstruktur von PrP^C und heterologem PrP^{Sc} zurückzuführen ist (Scott et al. 1989; Prusiner et al. 1990b; Scott et al. 1993; Kocisko et al. 1994; Fernandez-Borges et al. 2009). So konnten Scott und Kollegen zeigen, dass Unterschiede in der Primärstruktur die Inkubationszeit verlängert und somit den Ausbruch einer Prion-Erkrankung verzögert (Scott et al. 1989). Des Weiteren können beispielsweise Mäuse nur sehr schwer mit Hamster-Prionen infiziert werden. Transgene Mäuse, die Hamster-PrP^C exprimieren, weisen allerdings nach Inokulation mit Hamster-Prionen die für Hamster charakteristischen neuropathologische Veränderungen auf (Prusiner et al. 1990b). Demnach scheint die Übertragung der pathogenen Konformation von PrP^{Sc} auf PrP^C wesentlich von der Homologie ihrer Primärstruktur beeinträchtigt zu werden. Horiuchi und Kollegen postulierten, dass die Bindung zwischen PrP^C und PrP^{Sc} verschiedener Spezies trotz ihrer unterschiedlichen Primärstruktur stattfinden kann, es jedoch nicht zu Interaktionen kommt, die für die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} notwendig wären (Horiuchi and Caughey 1999). Zusammenfassend deuten diese und andere Daten darauf hin, dass eine produktive Vermehrung von PrP^{Sc} von der Sequenzhomologie zu PrP^C abhängig ist. Die Übertragung von BSE-Prionen auf den Menschen hat jedoch gezeigt, dass diese Barriere nicht absolut und nicht vorhersagbar ist.

1.3 Die Funktionen von PrP^C

PrP^C ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, deren höchste Expressionsmengen in Neuronen und Gliazellen des Zentralen Nervensystems (ZNS) zu finden sind (Kretzschmar et al. 1986; Moser et al. 1995; Fournier 2001; Ford et al. 2002; Molerés and Velayos 2005). Da sich die PrP^C-Sekundärstruktur der verschiedenen Spezies stark ähneln (Calzolari et al. 2005), liegt die Vermutung nahe, dass die Funktion von PrP^C entwicklungsgeschichtlich konserviert ist. Obwohl anhand der Phänotypen von PrP-*Knockout*-Mäusen und PrP^C-Interaktionsstudien einige potentielle Funktionen und zelluläre Interaktionspartner von PrP^C postuliert wurden, blieb die physiologische Rolle von PrP^C bislang unbekannt. In den folgenden Abschnitten wird ein Überblick über die in den letzten Jahren beschriebenen PrP^C-Funktionen gegeben (Linden et al. 2008; Nicolas et al. 2009).

1.3.1 PrP-*Knockout*-Mäuse

Um die Funktion von PrP^C zu analysieren, wurden verschiedene PrP-*Knockout*-Mäuse generiert (Weissmann and Flechsig 2003). Da diese jedoch keine offensichtlichen Phänotypen zeigten, wurde vermutet, dass die Funktion von PrP^C durch andere Proteine kompensiert wird (Büeler et al. 1992). Trotzdem konnte anhand der PrP^C-*Knockout*-Mäuse (PrP^{0/0}-Mäuse) eine für die Prion-Forschung wesentliche Beobachtung gemacht werden: PrP^{0/0}-Mäuse sind resistent gegenüber einer Prion-Infektion (Büeler et al. 1993; Manson et al. 1994). Damit wurde gezeigt, dass die Entstehung einer Prion-Erkrankung von der PrP^C-Expression abhängig ist. Dieses Phänomen wird in Abschnitt 1.4.1 näher betrachtet.

Genauere Untersuchungen der PrP^{0/0}-Mäuse ergaben mehrere phänotypische Veränderungen wie beispielsweise Modifikationen im zirkadianen Aktivitätsrythmus und im Schlafmuster (Tobler et al. 1996), verminderte Angstlevel (Nico et al. 2005), verzögerte Regeneration der Muskeln erwachsener Mäuse (Stella et al. 2010) und altersbezogene motorische und neuropathologische Defizite (Nazor et al. 2007). Des Weiteren wurden funktionelle Veränderungen des glutamatergen Systems (Coitinho et al. 2002;

Khosravani et al. 2008), eine periphere demyelinisierende Polyneuropathie (Bremer et al. 2010), eine veränderte Antwort auf oxidativen Stress aufgrund einer verminderten Cu/Zn-Superoxid-Dismutase-Aktivität (Brown et al. 1997b) und Veränderungen in der Funktion von Synapsen (Collinge et al. 1994) beschrieben.

1.3.2 Physiologische Funktion von PrP^C

Aufgrund der Beobachtungen in PrP^{0/0}-Mäusen und der Identifizierung potentieller Interaktionspartner wurde eine Vielzahl von physiologischen Funktionen von PrP^C postuliert. Demnach könnte PrP^C eine Rolle in der Zelldifferenzierung und neuronalen Adhäsion spielen, mit toxischen Effekten unterschiedlicher oxidativer Stressoren interferieren sowie die Übertragung synaptischer Signale und die Erregbarkeit von Neuronen modulieren (Linden et al. 2008; Nicolas et al. 2009). Diese Vielzahl von Beobachtungen lässt darauf schließen, dass PrP^C möglicherweise in mehreren Signalwegen involviert ist und dadurch eine Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen spielt.

1.3.3 PrP^C als stressprotektives Protein

Der erste Hinweis für eine erhöhte Stresstoleranz durch die Anwesenheit von PrP^C konnte anhand primärer hippocampaler Zellkulturen gezeigt werden. Im Gegensatz zu primären Neuronen, die aus Wildtyp-Mäusen isoliert wurden, zeigten PrP^C-defiziente Neuronen bei serumfreier Kultivierung eine erhöhte Apoptoserate (Kuwahara et al. 1999). Diese Beobachtung wurden anhand von Schlaganfallmodellen in der Maus und Ratte bestätigt, da die Schädigung des Nervengewebes nach einem ischämischen Schlaganfall in Anwesenheit von PrP^C deutlich schwächer ausfiel (McLennan et al. 2004; Shyu et al. 2005; Spudich et al. 2005; Weise et al. 2006; Mitteregger et al. 2007). Überdies ist PrP^C protektiv gegen verschiedene Stressoren wie oxidativer Stress (Watt et al. 2005; Dupiereux et al. 2008), Kupfer (Haigh and Brown 2006) und Exzitotoxine wie Kainat oder Glutamat (Rambold et al. 2008; Sakthivelu et al. 2011; Walz et al. 1999; Rangel et al. 2007; Westergard et al. 2007) (Abb. 10).

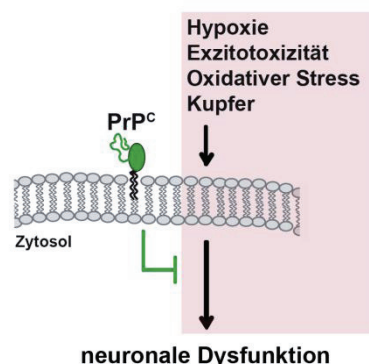


Abb. 10. PrP^C als stressprotektives Protein.

PrP^C wirkt protektiv gegen toxische Effekte verschiedener Stressoren wie Hypoxie, Exzitotoxizität, oxidativer Stress und Kupfer.

Des Weiteren konnte anhand von Tier- und Zellkulturmodellen gezeigt werden, dass die protektive Eigenschaft von PrP^C von der Anwesenheit der intrinsisch unstrukturierten N-terminalen Domäne abhängig ist (Mitteregger et al. 2007; Rambold et al. 2008; Sakthivelu et al. 2011). Intrinsisch unstrukturierte Domänen vermitteln häufig Protein-Protein-Interaktionen (Tompa et al. 2009). Demnach wäre es möglich, dass die N-terminale Domäne bei der Interaktion von PrP^C mit einem anderen, noch nicht identifizierten Protein beteiligt ist und dadurch die neuroprotektive Wirkung von PrP^C mediiert.

Zusätzlich zu dieser Domäne konnten die hydrophobe Domäne (HD) und der GPI-Anker mit der protektiven Aktivität von PrP^C in Zusammenhang gebracht werden. Da PrP^C nur in Anwesenheit der HD einen Homo-Dimer ausbildet, scheint diese Domäne Teil der Dimer-Interaktionsfläche zu sein (Rambold et al. 2008; Meyer et al. 2000). Die Daten deuten darauf hin, dass die Dimer-Ausbildung für die protektive Aktivität von PrP^C notwendig ist (Rambold et al. 2008; Resenberger et al. 2011b). Zudem scheint die Lokalisation des GPI-verankerten PrP^C in den *Lipid Rafts* ebenfalls eine Voraussetzung für die Aktivierung neuroprotektiver Signalwege zu sein.

1.3.4 Signaltransduktion über PrP^C

Da PrP^C über einen GPI-Anker in der äußeren Lipidschicht der Zellmembran verankert ist, würde es einen potentiellen Kofaktor benötigen, um Signale durch die Plasmamembran ins Innere der Zelle zu übermitteln (Paulick and Bertozzi 2008). In der Tat wurden verschiedene putative Kofaktoren beschrieben, die an der PrP^C-abhängigen Signaltransduktion beteiligt sind. Interessante Kandidaten sind die intrazelluläre Tyrosinkinase Fyn (Mouillet-Richard et al. 2000; Mouillet-Richard et al. 2007) und der *N*-Methyl-*D*-Aspartat (NMDA)-Rezeptor (Khosravani et al. 2008; You et al. 2012).

Die Tyrosinkinase Fyn ist eine intrazellulär lokalisierte Kinase, die durch Palmytylierung eines N-terminalen Cystein-Motivs mit GPI-verankerten Proteinen interagieren kann (Shenoy-Scaria et al. 1993). Nach Antikörper-vermittelter Dimerisierung von PrP^C konnte eine Aktivierung der Fyn-Kinase detektiert werden (Mouillet-Richard et al. 2000). Da die Aktivierung der Fyn-Kinase mit neuronaler Differenzierung und neuronalem Überleben in Verbindung steht, könnte PrP^C durch die Interaktion mit Fyn diese Effekte induzieren (Chen et al. 2003).

Zudem konnten Khosravani und Kollegen zeigen, dass PrP^C mit NMDA-Rezeptoren interagiert (Khosravani et al. 2008). Die NMDA-Rezeptoren sind eine der Hauptgruppen der ionotropen Glutamat-Rezeptoren im Säugergehirn (McBain and Mayer 1994). Die Aktivierung des Rezeptors durch die Bindung von Glutamat oder NMDA und Glycin führt zum Öffnen des Ionenkanals und damit zum Natrium/Calcium-Einstrom in das Zytosol (Stys et al. 2012). Dieser Ionenstrom induziert ein exzitatorisches post-synaptisches Potential (EPSP). Eine Hyperaktivität des Rezeptors führt zu einer toxischen Calcium-Konzentration im Zytosol und damit zur Schädigung der Neuronen (Exzitotoxizität). Interessanterweise konnte dargestellt werden, dass PrP^C die Aktivität des NMDA-Rezeptors moduliert, und somit Hyperaktivität und die damit verbundene exzitotoxische Schädigung der Neuronen verhindert (Khosravani et al. 2008). In einer weiterführenden Studie wurde postuliert, dass die Modulation des NMDA-Rezeptors durch PrP^C von dessen Kupfer-bindenden Aktivität beeinträchtigt wird. Die Bindung von Amyloid β , ein mit der Alzheimer-Krankheit assoziiertes, fehlgefaltetes Protein, scheint durch Bindung an PrP^C dessen

Interaktion mit dem NMDA-Rezeptor zu modulieren und dadurch Toxizität auszulösen (You et al. 2012; Stys et al. 2012).

Ein anderer interessanter Bindungspartner von PrP^C ist das Stress-induzierbare Protein 1 (STI1). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktion von STI1 mit an der Zelloberfläche lokalisiertem PrP^C neuronales Überleben und Differenzierung mediiert (Zanata et al. 2002; Chiarini et al. 2002; Martins et al. 1997; Lopes et al. 2005; Caetano et al. 2008; Arantes et al. 2009; Martins et al. 2010). STI1 und sein humanes Homolog Hop (Hsp70/Hsp90-organisierendes Protein) sind Hitzeschock-Proteine, die als Kofaktor von Chaperonen wie beispielsweise Hsp70 und Hsp90 agieren (Smith et al. 1993). Obwohl es vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist, kommt es ebenfalls im Nukleus (Zanata et al. 2002; Lassel et al. 1997; Longshaw et al. 2004) sowie an der Plasmamembran (Zanata et al. 2002) vor und wird von Astrozyten sekretiert (Lima et al. 2007). Somit wäre eine direkte Interaktion mit dem an der Zelloberfläche lokalisierten PrP^C möglich.

1.3.5 Kupfer-Bindung

Vorangegangene Studien kamen zu dem Ergebnis, dass PrP^C ein Metallionen-bindendes Protein ist, das Kupfer mit niedriger mikromolarer Affinität binden kann (Brown et al. 1997a; Viles et al. 1999). Die Kupfer-Bindung wird über sechs Histidine vermittelt, die in der N-terminalen Domäne lokalisiert sind. Vier Histidine befinden sich in der Octarepeat-Region und zwei an den Positionen 96 und 111 (Maus-PrP). In den letzten Jahren wurden verschiedene Aktivitäten postuliert, die mit der Kupfer-bindenden Eigenschaft von PrP^C zusammenhängen. Im Folgenden werden diese kurz dargestellt.

Da die intrinsisch unstrukturierte N-terminale Domäne möglicherweise an der Bindung zu anderen Proteinen beteiligt ist, wäre es denkbar, dass die Kupfer-Bindung die Struktur dieser Domäne und/oder die Bindung von PrP^C zu anderen Proteinen beeinflusst (Lasmezas 2003; Kretzschmar et al. 2000). Studien deuten darauf hin, dass PrP^C an der Regulation der Kupfer-Konzentration im synaptischen Spalt und dem Kupfer-Transport beteiligt ist (Kretzschmar et al. 2000). Außerdem scheint PrP^C eine Cu/Zn-Superoxid-Dismutase-Aktivität

aufzuweisen (Brown et al. 1997b; Brown and Besinger 1998). Da diese Aktivität von Kupfer abhängig ist, könnte dies ein Grund für die Kupfer-bindende Eigenschaft von PrP^C sein. Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass die Modulation des NMDA-Rezeptors durch PrP^C Kupfer-abhängig ist (You et al. 2012) (vgl. Abschnitt 1.3.4). Trotz der bislang gewonnenen Daten bleibt die physiologische Rolle der Kupferbindungsstellen von PrP^C allerdings weiter schwer erklärbar.

1.4 Fehlfaltung von PrP, infektiöse Prionen und Neurodegeneration

Gemäß dem Prion-Konzept überträgt das fehlgefaltete PrP^{Sc} seine Konformation auf PrP^C und führt durch diesen autokatalytischen Prozess zur Vermehrung infektiöser Prionen. Bei der Mehrheit der Prion-Erkrankungen, unabhängig von ihrer Ätiologie (sporadisch, vererbbar oder infektiös), treten die Akkumulation des fehlgefalteten PrP^{Sc}, die Replikation infektiöser Prionen und die Neurodegeneration gemeinsam auf. Daraus wurde geschlossen, dass die Vermehrung infektiöser Prionen und die Neurodegeneration in einem direkten Zusammenhang zueinander stehen. Allerdings haben Studien ergeben, dass die beiden Merkmale unabhängig voneinander vorkommen können. So kann PrP^{Sc} in Abwesenheit von neuronalem GPI-verankertem PrP^C keine toxischen Effekte induzieren. Zudem rufen toxische PrP-Mutanten neuronale Dysfunktionen in Abwesenheit von infektiösen Prionen hervor. In den folgenden Abschnitten werden die dafür relevanten Studien näher beschrieben.

1.4.1 PrP^{Sc} induziert in Abwesenheit von GPI-verankertem PrP^C keine toxischen Effekte

Die essentielle Rolle von PrP^C bei der Übertragung einer Prion-Erkrankung konnte anhand von PrP^C-*Knockout*-Mäusen gezeigt werden (vgl. Abschnitt 1.3.1). Den Studien zufolge sind PrP^C-*Knockout*-Mäuse resistent gegenüber einer Scrapie Infektion und vermehren keine infektiösen Prionen (Büeler et al. 1993; Prusiner et al. 1993; Sailer et al. 1994). Demnach sind die Replikation der Prionen und die neuropathologischen Veränderungen von der

PrP^C-Expression abhängig. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die Vermehrung infektiöser Prionen in Abwesenheit einer klinischen Prion-Erkrankung auftreten kann (Brandner et al. 1996; Chesebro et al. 2005; Mallucci et al. 2003). Hierauf soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Brandner und Kollegen transplantierten neuronales Gewebe einer PrP^C-überexprimierenden Maus in das Gehirn einer PrP^C-*Knockout*-Maus. Nach intrazerebraler Inokulation von Scrapie-Prionen kam es ausschließlich in dem PrP^C-überexprimierenden Transplantat zu den für Prion-Erkrankungen charakteristischen spongiformen Veränderungen. Obwohl das umgebende PrP^C-defiziente Gewebe ebenfalls hohe Mengen an PrP^{Sc} aufwies, konnten in diesem Bereich keine spongiformen Veränderungen festgestellt werden (Brandner et al. 1996). Zudem generierten Mallucci und Kollegen eine transgene NFH-Cre/*MloxP*-Mauslinie, die es ermöglichte durch Expression der Cre-Rekombinase das PrP-Gen ausschließlich in Neuronen im Alter von etwa 12 Wochen auszuschalten. Nachdem 3-4 Wochen alte transgene Mäuse mit Scrapie-Prionen inokuliert wurden, kam es auch nach dem Ausschalten des PrP-Gens zur Ausbildung von PrP^{Sc}-Plaques. Die transgenen Mäuse zeigten jedoch keinen neuronalen Zellverlust und entwickelten keine klinische Prion-Erkrankung (Mallucci et al. 2003). Demnach führt die PrP^C-Expression in Astrozyten zur Replikation von PrP^{Sc}, ohne jedoch toxische Effekte in Neuronen zu induzieren. Des Weiteren wurden transgene Mäuse untersucht, die eine PrP-Mutante ohne GPI-Anker (PrP Δ GPI) exprimierten. PrP Δ GPI ist nicht an der Zelloberfläche lokalisiert, sondern wird in den extrazellulären Raum sekretiert. Demzufolge weisen die Neuronen kein GPI-verankertes PrP^C an der Zelloberfläche auf. Nach Inokulation von Prionen vermehrten sich zwar infektiöse Prionen, jedoch entwickelte sich keine klinisch manifestierte Prion-Erkrankung (Chesebro et al. 2005). Im Gegensatz dazu traten bei Mäusen die Wildtyp-PrP und PrP Δ GPI exprimierten, nach Inokulation von Prionen, Symptome einer Prion-Erkrankung auf.

Die Daten aus den Tiermodellen konnten in einem neu entwickelten Zellkulturmodell verifiziert werden, das es überdies ermöglichte, Domänen von PrP^C zu identifizieren, die an der Signalweiterleitung beteiligt sind (Rambold et al. 2008).

Zusammenfassend zeigen die aufgeführten Daten, dass PrP^{Sc} nur in Anwesenheit von neuronalem, GPI-verankertem PrP^{C} zur Neurodegeneration führt (Abb. 11A).

Aus den oben beschriebenen Befunden ergibt sich die Frage, wie die toxische Aktivität von PrP^{Sc} über GPI-verankertes PrP^{C} vermittelt werden kann. Zwei verschiedene Modelle sind hierfür vorstellbar. Zum einen könnte die Toxizität direkt mit der Vermehrung von PrP^{Sc} in Neuronen verbunden sein. Dabei wäre die intrazelluläre Vermehrung von der Expression eines GPI-verankerten PrP^{C} abhängig. Zum Anderen wäre es möglich, dass PrP^{Sc} das toxische Signal über einen PrP^{C} -abhängigen Signalweg auslösen kann. Hierbei würde GPI-verankertes PrP^{C} an der Oberfläche der Zelle als Rezeptor von PrP^{Sc} fungieren.

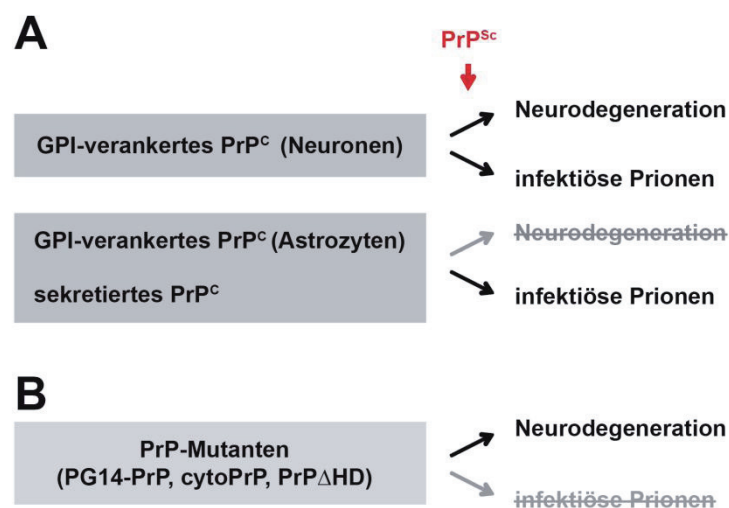


Abb. 11. Neurodegeneration und die Vermehrung infektiöser Prionen sind zwei voneinander trennbare Prozesse.

(A) PrP^{Sc} kann seine Konformation auf GPI-verankertes und sekretiertes PrP^{C} übertragen. Dies führt zu der Vermehrung infektiöser Prionen. Neurodegeneration wird jedoch nur in Anwesenheit von neuronalem, GPI-verankertem PrP^{C} hervorgerufen. (B) Toxische PrP-Mutanten wie beispielsweise PG14-PrP, cytoPrP und PrP Δ HD induzieren neuronalen Zellverlust in Abwesenheit infektiöser Prionen.

1.4.2 Toxische PrP-Mutanten induzieren neuronale Dysfunktion in Abwesenheit infektiöser Prionen

Anhand transgener Mausmodelle wurde dargestellt, dass verschiedene PrP-Mutanten neuronalen Zelltod in Abwesenheit von infektiösen Prionen auslösen können (Baumann et al. 2007; Chiesa et al. 1998; Flechsig et al. 2003; Hegde et al. 1998; Li et al. 2007; Ma et al. 2002; Muramoto et al. 1997; Shmerling et al. 1998) (Abb. 11B). Beispiele hierfür sind die PrP-Mutanten PG-14, cytoPrP und PrP Δ HD, die im Folgenden vorgestellt werden sollen.

Die PrP-Mutante PG14-PrP, welche neun zusätzliche Octarepeat-Sequenzen in der N-terminalen Domäne aufweist, ist mit einer vererbaren Prion-Erkrankung im Menschen assoziiert (Owen et al. 1992). Die Expression von PG14-PrP führt im Mausmodell zu einer langsam fortschreitenden neurologischen Erkrankung, die neuropathologisch durch neuronalem Zellverlust, Gliose und PrP-Ablagerungen charakterisiert ist (Chiesa et al. 1998; Chiesa et al. 2003). Diese Erkrankung ist jedoch nicht durch intrazerebrale Inokulation auf andere Mäuse übertragbar. Des Weiteren konnte anhand von Tiermodellen und Zellkulturexperimenten nachgewiesen werden, dass eine artifizielle PrP-Mutante ohne N-terminaler Signalsequenz im Zytosol lokalisiert und neurotoxisch ist (cytoPrP) (Ma et al. 2002; Wang et al. 2009; Rane et al. 2004; Rambold et al. 2006). Transgene Mäuse, die cytoPrP überexprimierten, zeigten zerebrale Degeneration, Gliose und eine schwere Ataxie (Ma et al. 2002).

Das neurotoxische Potential von PrP-Mutanten, die eine Deletion der hydrophoben Domäne aufweisen, wurde anhand von verschiedenen Mausmodellen verifiziert (Shmerling et al. 1998; Baumann et al. 2007; Li et al. 2007). So entwickelten transgene Mäuse, die PrP Δ HD (Δ 105-125) exprimierten, eine neurodegenerative Erkrankung, ohne dass es zur Replikation infektiöser Prionen oder zur Ausbildung fehlgefalteter Proteine kam (Li et al. 2007). Interessanterweise wird die neurotoxische Aktivität von PrP Δ HD durch die Co-Expression von Wildtyp-PrP verhindert. Diese in transgenen Mäusen generierten Daten konnten in Zellkultur bestätigt werden (Rambold et al. 2008; Sakthivelu et al. 2011).

Aufgrund der dargelegten Daten erscheint es plausibel, dass die Vermehrung von Prionen und die Neurodegeneration zwei voneinander trennbare Prozesse sind. Aus diesem Grund wäre es möglich, dass das infektiöse Agens und die neurotoxische Spezies unterschiedliche Konformere beziehungsweise Zwischenstufen sind, die durch die Interaktion von PrP^C und PrP^{Sc} entstehen.

1.5 Fehlfaltung von Proteinen als gemeinsames Merkmal verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen

Obwohl die Ätiologie verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen unterschiedlich ist, weisen sie ein gemeinsames Merkmal auf: aberrante Protein-Konformere, die pathognomische Ablagerungen im Gehirn von Patienten ausbilden können (Winklhofer et al. 2008). Beispiele für fehlgefaltete Proteine in neurodegenerativen Erkrankungen sind neben PrP^{Sc} in den Prion-Erkrankungen, Amyloid β in der Alzheimer-Krankheit (AD), α -Synuclein in der Parkinson-Krankheit (PD) und Huntingtin in der Huntington-Krankheit (HD) (Soto 2003) (Tabelle 4). Den Erkrankungen ist gemeinsam, dass die fehlgefalteten Proteine Oligomere, Protofibrillen oder Fibrillen ausbilden, die als Amyloid-Plaques akkumulieren (Caughey and Lansbury 2003; Glabe 2006; Walsh and Selkoe 2007). In den folgenden Abschnitten werden strukturelle Ähnlichkeiten der verschiedenen Protein-Konformere und deren Übertragbarkeit diskutiert.

Tabelle 4. Übersicht über Proteine, die mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind.

Erkrankung	Involviertes Protein	Lokalisation der Aggregate	Referenz
Prion-Erkrankungen (TSE)	Prion-Protein	Extrazellulär	(Bolton et al. 1982)
Alzheimer-Krankheit (AD)	Amyloid β Tau	Extrazellulär Intrazellulär	(Glennner and Wong 1984) (Grundke-Iqbal et al. 1986)
Parkinson-Krankheit (PD)	α -Synuclein	Zytosol	(Forno 1996) (Spillantini et al. 1997)
Huntington-Krankheit (HD)	Huntingtin	Nukleus	(DiFiglia et al. 1997)
Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)	Superoxid-Dismutase	Zytosol	(Bruijn et al. 1998)

1.5.1 Strukturelle Ähnlichkeit der fehlgefalteten Proteine

Struktur-Analysen der in Tabelle 4 aufgelisteten Proteine haben ergeben, dass sie eine β -Faltblatt-reiche Sekundärstruktur aufweisen. Aufgrund dieser Konformation sind die hydrophoben Bereiche des Proteins nach außen gerichtet. Dies ermöglicht die Aggregation zu β -Faltblatt-reichen Oligomeren und Fibrillen, die eine sogenannte Kreuz- β -Konformation einnehmen (Eanes and Glenner 1968; Sunde et al. 1997; Eisenberg and Jucker 2012). Demzufolge ist die strukturelle Ähnlichkeit der fehlgefalteten Proteine und deren Aggregate eine wesentliche Gemeinsamkeit dieser Erkrankungen.

1.5.2 Die Übertragbarkeit der Prion-Erkrankung ist einzigartig unter den neurodegenerativen Erkrankungen

In den letzten Jahren stellte sich die Frage, ob die Übertragung einer pathogenen Konformation auf ein anderes Protein ausschließlich ein Prion-spezifischer Prozess ist oder auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen zu finden ist (Frost and Diamond 2010; Polymenidou and Cleveland 2011). Ein Hinweis dafür ist die Beobachtung von Prion-Proteinen in der Hefe (Lindquist 1997; Wickner et al. 1999). Die Prion-ähnliche Eigenschaft dieser Proteine beruht auf der Besonderheit, dass sie, vergleichbar mit dem unter anderem in Säugerzellen vorkommenden Prion-Protein, in einer oder mehreren sich selbst-verbreitenden Konformationen vorliegen können (Tuite et al. 2011). Ein Beispiel hierfür ist der Translation-Terminationsfaktor Sup35, der in einer löslichen, aktiven Form oder in einer aggregierten, inaktiven Prionform vorkommen kann, wobei die Prionform auf die Tochterzelle vererbbar ist.

Um der vorigen Frage nachzugehen, sollte vorerst klar zwischen der Vermehrung infektiöser Proteine, dem Animpfen (engl. *seeding*) und der Ausbreitung (engl. *spreading*) des fehlgefalteten Proteins in dem betroffenen Gewebe unterschieden werden. Bei der Vermehrung infektiöser Proteine wird deren Konformation auf ein anderes Protein übertragen, das unter normalen Bedingungen diese Konformation nicht eingenommen hätte. *Seeding* beschreibt den beschleunigten Prozess der Fehlfaltung nativer Proteine, der im Laufe der Zeit ohnehin abgelaufen wäre. Der zugrunde liegende Mechanismus entspricht dem bereits

vorgestellten *seeding-polymerization*-Modell (vgl. Abschnitt 1.2.3) (Jarrett and Lansbury 1993). Im Gegensatz dazu beschreibt der Begriff *Spreading* das Ausbreiten des fehlgefalteten Proteins im betroffenen Gewebe. In Studien konnte der interzelluläre Transfer beziehungsweise die Ausbreitung der Aggregate von A β , Tau und α -Synuclein zwischen Zellen nachgewiesen werden (Magalhaes et al. 2005; Frost et al. 2009; Desplats et al. 2009; Hansen et al. 2011; Ren et al. 2009). Zudem wurde anhand transgener AD-Mausmodelle, die eine Mutante des humanen Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) überexprimierten, gezeigt, dass die A β -Pathologie durch Inokulation von Gehirn-Homogenaten humaner AD-Patienten oder transgener AD-Mäuse deutlich früher auftritt (Kane et al. 2000; Meyer-Luehmann et al. 2006; Eisele et al. 2010). Analog dazu konnte der *Seeding*-Prozess auch in transgenen Mäusen nachgewiesen werden, die wtTau oder eine humane α -Synuclein-Mutante überexprimierten (Clavaguera et al. 2009; Mougnot et al. 2011). Zudem wurde die Ausbreitung der pathologischen Veränderungen in AD (Braak and Braak 1991), PD (Braak et al. 2003), HD (Deng et al. 2004) und ALS (Ravits et al. 2007) gezeigt. Diese und andere Daten deuten darauf hin, dass unter anderem fehlgefaltetes A β , Tau oder α -Synuclein die Fehlfaltung und Aggregation nativer Proteine beschleunigen und sich durch interzellulären Transfer im Gewebe verteilen können. Die Übertragung der Konformation mit der damit verbundenen Information einer Erkrankung scheint jedoch nur bei Prion-Erkrankungen vorzukommen. Da im Gegensatz zu den infektiösen Prion-Erkrankungen bislang kein Fall einer Übertragung anderer neurodegenerativen Erkrankungen von einem auf ein anderes Individuum beschrieben wurde, ist dies nach heutigem Wissenstand äußerst unwahrscheinlich.

1.6 Die Rolle von molekularen Chaperonen in neurodegenerativen Erkrankungen

1.6.1 Der Zusammenhang zwischen molekularen Chaperonen und neurodegenerativen Erkrankungen

Eine Vielzahl von Studien deutet darauf hin, dass molekulare Chaperone und die zelluläre Hitzeschock-Antwort (HSR, engl. *heat shock response*) eine Rolle in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Prion-Erkrankungen oder AD spielen. Um einen Überblick darüber zu erhalten, werden im Folgenden die wichtigsten Beobachtungen aufgeführt.

So haben Untersuchungen von erkrankten Gehirnen ergeben, dass in Scrapie-infizierten Maus-Gehirnen erhöhte Hsp70-Mengen (Kenward et al. 1994) und in Gehirnen von AD-Patienten erhöhte Expressionsmengen von Hitzeschock-Proteinen (Hsp), wie beispielsweise den kleinen Hitzeschockproteinen, Hsp70 (Perez et al. 1991; Yoo et al. 1999; Muchowski and Wacker 2005) sowie Clusterin (Giannakopoulos et al. 1998), vorliegen. Zudem sind Amyloid-Ablagerungen im erkrankten Gehirn von CJD- oder AD-Patienten mit Clusterin assoziiert (Freixes et al. 2004; Calero et al. 2000). Clusterin, auch bekannt als Apolipoprotein J, ist ein extrazelluläres Chaperon, das *in vitro* die Bildung von amyloiden Aggregaten des PrP(106-126)-Peptids oder A β -Peptids verhindern kann (McHattie and Edington 1999; Matsubara et al. 1996; Yerbury et al. 2007). Da es zusätzlich möglich war, die Interaktion zwischen Clusterin und A β nachzuweisen, wird vermutet, dass Clusterin protektive Eigenschaften gegen A β -induzierte Toxizität aufweist (Boggs et al. 1996; Calero et al. 2000; Narayan et al. 2012). Interessanterweise konnte das Clusterin-Gen (*CLU*) in einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) als Risikogen für AD identifiziert werden (Harold et al. 2009; Lambert et al. 2009).

Überdies interferiert der Hitzeschock-Faktor 1 (HSF1) mit der Lebensdauer Prion-infizierter Mäuse. So zeigten transgene Mäuse, die keinen HSF1 exprimierten, nach Infektion mit Prionen eine kürzere Lebensdauer als infizierte Wildtyp-Mäuse, die aufgrund der HSF1-Expression eine intakte HSR aufwiesen. Demnach könnte die HSR im Schutz gegen Prion-induzierte Toxizität involviert sein (Steele et al. 2008). Des Weiteren deuten *in vitro*-Experimente darauf hin, dass die Expression von Hitzeschock-Proteinen (Hsp), insbesondere die von

Hsp70, das Fortschreiten der Alzheimer-Krankheit verzögern könnte (Magrane et al. 2004; Evans et al. 2006; Kumar et al. 2007; Kakimura et al. 2002). Diese Beobachtung wurde anhand eines AD-Mausmodells bestätigt, in dem die Überexpression von Hsp70 den pathologischen Phänotyp und die kognitiven Defizite abschwächte (Hoshino et al. 2011).

Weitere interessante Befunde konnten mit Hilfe einer chronisch mit Scrapie-infizierten Neuroblastomzelllinie (ScN2a) generiert werden. Zum einen weisen ScN2a Zellen eine defekte Hitzeschock-Antwort auf (Tatzelt et al. 1995), wobei dies auf eine beschleunigte Deaktivierung des HSF1-Trimers zurückzuführen ist (Winklhofer et al. 2001). Zum anderen haben ScN2a Zellen nach Hitzeschock oder nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid im Vergleich zu nicht-infizierten Neuroblastomzellen eine erhöhte Zelltodrate und sind demzufolge anfälliger gegenüber Stress (Rambold et al. 2008).

Zusammenfassend deuten die aufgezeigten Daten darauf hin, dass die HSR und molekulare Chaperone im Verlauf einer Prion-Erkrankung oder Alzheimer-Krankheit, eine essentielle Rolle spielen könnten. Da die HSR ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit ist, wird im folgenden Abschnitt auf die Rolle der HSR im Schutz gegen proteotoxische Schäden genauer eingegangen.

1.6.2 Die Rolle der Hitzeschock-Antwort im Schutz gegen proteotoxische Schäden

Molekulare Chaperone und stressinduzierbare Antworten sind wichtige Modulatoren der Proteinhomöostase (Morimoto 2008). Molekulare Chaperone liegen in allen Kompartimenten der Zelle vor und stellen einen wichtigen Mechanismus der Zelle dar, um die Faltung der Proteine zu regulieren (Bukau et al. 2006). Chaperone erkennen und binden nicht-native Proteine und erleichtern somit deren korrekte Faltung, verhindern deren Fehlfaltung, unterstützen die Ausbildung von Proteinkomplexen und die Translokation der Proteine (Georgopoulos and Welch 1993; Hartl and Hayer-Hartl 2002; Morimoto 2008; Hartl et al. 2011). Im Gegensatz zu vielen molekularen Chaperonen, die unter normalen Bedingungen konstitutiv exprimiert werden, wird die Expression

mancher Chaperone aufgrund einer zellulären Stress-Antwort induziert (Lindquist and Craig 1988). Zwei hochkonservierte Kontrollmechanismen, die „Antwort auf fehlgefaltete Proteine“ (UPR, engl. *unfolded stress response*) und die HSR, spielen unter Stressbedingungen eine wesentliche Rolle, wobei im Folgenden die HSR von besonderem Interesse ist.

Die HSR ist ein Mechanismus der Zelle, der als Reaktion auf proteotoxischen Stress und fehlgefaltete Proteine induziert wird. Sie führt zur Modulation der Transkription stressinduzierbarer Gene, die bei der korrekten Rückfaltung der Proteine, deren Degradierung und der Regulation der zellulären Stresstoleranz involviert sind (Morimoto 2008; Wu 1995; Morimoto 1998). Der Hauptregulator der HSR ist der Hitzeschock-Faktor HSF1, der unter normalen Bedingungen in einem Komplex mit molekularen Chaperonen, wie beispielsweise Hsp90 und Hsp70, vorliegt. Nach Aktivierung der HSR wird er aus diesem Komplex freigesetzt, trimerisiert und transloziert in den Nukleus. Durch weitere Modifikationen erlangt der HSF1 eine trans-Aktivierungskompetenz und reguliert durch Bindung an spezifische Hitzeschockelement (HSE)-Sequenzen die Transkription der induzierbaren Hitzeschock-Protein (Hsp)-Gene (McMillan et al. 1998; Wu 1995). Die daraus resultierende erhöhte Menge an molekularen Chaperonen in der Zelle verhindert durch die Bindung an nicht-native Proteine deren Aggregation und erleichtert ihre korrekte Faltung. Clusterin ist ein hochkonserviertes extrazelluläres Chaperon, dessen Transkription ebenfalls durch HSF1 moduliert wird (Michel et al. 1997). Durch Bindung an nicht-native Proteine, ermöglicht es, diese Proteine aus dem extrazellulären Raum zu beseitigen und scheint somit an dem extrazellulären Qualitätskontrollsystem beteiligt zu sein (Wyatt et al. 2011; Yerbury et al. 2005; Dabbs et al. 2011).

Die Induktion der HSR oder Expression von Hsp70 ist protektiv gegen eine Vielzahl von Ereignissen, wie beispielsweise Hitzeschock (Hahn and Li 1982; Li and Hahn 1990), ultravioletter Strahlung (Simon et al. 1995), Nährstoffentzug (Mailhos et al. 1993), und TNF (Jaattela 1993; Jaattela and Wissing 1993; Van Molle et al. 2002). Ratten, die zuvor einem Hitzeschock oder chemischem Stress ausgesetzt wurden, wiesen eine erhöhte Stresstoleranz gegenüber Hitzschlag-induzierten Schäden wie zerebraler Ischämie und zerebralem Neuronenuntergang auf (Yang et al. 1998). Zudem waren transgene Mäuse, die

Hsp70 überexprimierten, resistenter gegenüber einer aktiven Schädigung des ZNS, die durch eine zerebraler Ischämie ausgelöst wurde (Rajdev et al. 2000; Giffard et al. 2004). Überdies führte die Überexpression von Hsp70 unter anderem zu einer erniedrigten Apoptoserate und zu einer erhöhten Expression des anti-apoptischen Protein Bcl-2 (Yenari et al. 2005). Diese und andere Daten deuten darauf hin, dass Hsps neben deren Aktivität als Chaperone, Vorgänge in apoptotischen Signalwegen modulieren (Beere 2004).

Interessanterweise konnte ein Zusammenhang zwischen der HSR und dem Alterungsprozess nachgewiesen werden. Untersuchungen von dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* zeigten, dass die Lebenserwartung unter anderem durch HSF1 und Proteinen des Insulin-ähnlichen Signalwegs reguliert wird (Morley et al. 2002; Hsu et al. 2003). Außerdem nimmt im Laufe des Älterwerdens die Expression von Hsp-Genen in Abwesenheit von externen Stressoren zu. Diese Beobachtung deutet auf intrinsische Stress-Signale und/oder eine veränderte Genexpressions-Maschinerie hin. Trotz der erhöhten Hsp-Expression, wird die Effektivität der HSR nach akutem Stress mit steigendem Alter schwächer (Kourtis and Tavernarakis 2011). Dieses Phänomen scheint ein genereller Effekt zu sein, da er in neuronalem Gewebe, Leber, Skelett- und Herzmuskel demonstriert werden konnte (Calderwood and Ciocca 2008). Demzufolge können sich Zellen im höheren Alter schlechter gegen akuten proteotoxischen Stress und fehlgefaltete Proteine schützen. Da neurodegenerative Erkrankungen wie AD oder PD zu den Krankheiten zählen, die insbesondere im höheren Alter auftreten, könnte der Alterungsprozess einen zusätzlichen Risikofaktor für diese Erkrankungen darstellen.

1.7 Zielsetzung

Die Struktur von PrP konnte mit Hilfe von in Bakterien rekombinant hergestelltem PrP bestimmt werden. Ebenso war es möglich die Bildung infektiöser Prionen mit rekombinantem PrP *in vitro* nachzuweisen. Dennoch ist ein potentieller Einfluss des GPI-Ankers auf die Struktur von PrP und die Bildung von Prionen nicht auszuschließen. Im ersten Teil der Arbeit sollte daher ein Hefesystem etabliert werden, das ermöglicht, ausreichende Mengen an rekombinantem PrP mit GPI-Anker zu generieren. Zudem sollte das PrP-Hefe-Konstrukt in Säugierzellen charakterisiert werden, um zu ermitteln, ob es zur Identifizierung von PrP-Interaktionspartnern mittels Affinitätsaufreinigung eingesetzt werden könnte.

Im zweiten Teil der Arbeit wendeten wir uns der Eigenschaft von PrP^C zu, die toxischen Aktivitäten von PrP^{Sc} zu vermitteln. Da die Fehlfaltung von Proteinen zu β -Faltblatt-reichen Oligomeren ein gemeinsames Merkmal verschiedener neurodegenerativen Erkrankungen ist, sollte untersucht werden, ob PrP^C neben PrP^{Sc} andere β -Faltblatt-reiche Konformere binden und deren toxischen Effekt übermitteln kann. Des Weiteren sollte unter anderem ein Oligomer-spezifischer Antikörper sowie ein *N*-Methyl-*D*-Aspartat-Rezeptor-Antagonist genutzt werden, um die der Signaltransduktion zugrunde liegenden Mechanismen zu studieren.

In der Pathogenese verschiedener Fehlfaltungserkrankungen konnte eine Rolle von molekularen Chaperonen und der Hitzeschock-Antwort gezeigt werden. Der dritte Teil der Doktorarbeit befasste sich daher mit der Modulation der Hitzeschock-Antwort durch PrP^{Sc} oder Amyloid β . Darüber hinaus sollten die Auswirkungen einer induzierten Hitzeschock-Antwort oder individueller Chaperone auf die toxische Aktivität von PrP^{Sc}, Amyloid β und einer PrP-Mutante untersucht werden. Dies sollte Aufschluss über Signalwege geben, die bei den toxischen Effekten der verschiedenen Konformere involviert sind.

2 Ergebnisse

2.1 Teil 1 – Etablierung eines Hefemodells zur Generierung von rekombinantem PrP

Das zelluläre Prion Protein ist ein Glykoprotein, das über einen GPI-Anker in der äußeren Lipidschicht der Plasmamembran verankert ist. Struktur-Analysen von rekombinantem PrP zeigten, dass PrP eine unstrukturierte N-terminale und eine strukturierte C-terminale Domäne aufweist. Die hierbei verwendeten rekombinanten Prion-Proteine wurden in Bakterien hergestellt und wiesen somit keinen GPI-Anker auf. Demnach ist es unklar, ob der GPI-Anker Auswirkungen auf die Struktur von PrP^C hat. Von besonderem Interesse ist hierbei der unstrukturierte N-terminale Bereich, der möglicherweise aufgrund des GPI-Ankers eine Struktur annehmen könnte. Neben den Struktur-Analysen konnte anhand von in Bakterien hergestelltem rekombinantem PrP die Konversion von PrP *in vitro* nachgewiesen werden. Die intrazerebrale Injektion der Amyloid-Fibrillen aus rekombinantem PrP führte in Mäusen zu einer klinischen Prion-Erkrankung, wobei diese sehr geringe Titer und lange Inkubationszeiten aufwiesen (Legname et al. 2004; Colby et al. 2009). Zwar riefen synthetische Prionen, die mittels PMCA von rekombinantem PrP generiert wurden, nach deren Inokulation in Mäusegehirne eine klinische Erkrankung mit kurzer Inkubationszeit hervor (Wang et al. 2010), allerdings konnte dieses Ergebnis bislang nicht bestätigt werden (Kim et al. 2009; Surewicz and Apostol 2011). Im Vergleich zu rekombinantem PrP weist natives, aus Gehirnmateriale aufgereinigtes PrP einen wesentlichen Nachteil auf, da es möglicherweise Kofaktoren enthält, die die Bildung von Prionen und damit Konversions-Analysen beeinflussen können.

Um weitere Erkenntnisse in Bezug auf die Struktur und den Konversionsprozess eines GPI-verankerten PrP zu erlangen, wurde in Kooperation mit der Gruppe von Martin Engelhard ein Hefesystem etabliert, das im Gegensatz zu Bakterien, die Generierung von PrP mit GPI-Anker ermöglicht. Da NMR-Strukturanalysen große Mengen an Isotopen-markiertem Protein benötigen, weist die Herstellung von rekombinantem PrP in Hefe zudem wesentliche Vorteile im Vergleich zu der Aufreinigung von PrP aus Gehirnmateriale auf. Zum einen liefert die Herstellung in Hefe große Proteinmengen, die nur schwer in diesem Ausmaß und Reinheitsgrad

aus Gehirnmateriale gewonnen werden können. Zum anderen ist das Hefesystem für die Isotopen-Markierung der Proteine geeignet. Des Weiteren kann anhand des in diesem Hefesystem hergestellten rekombinanten PrP die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} *in vitro* weiter untersucht werden. Hierbei hat die Herstellung von rekombinantem PrP in der Hefe den Vorteil, dass die Hefe, im Gegensatz zu Säugetieren, kein endogenes PrP^C exprimiert und damit kein PrP^{Sc} bildet. Dadurch wird die Möglichkeit ausgeschlossen, dass es mit der Analyse interferiert.

Damit PrP in der Hefe exprimiert und post-translational modifiziert werden kann, wurde ein Konstrukt generiert, das zwei Signalsequenzen (SS), die am N-Terminus (ER-SS) und C-Terminus (GPI-SS) lokalisiert sind, aufweist (Abb. 12). Die in der Hefe vorkommende Kre5-ER-Signalsequenz (ER-SS) ist für den co-translationalen Transport von PrP in das ER essentiell. Die C-terminale Gas1p-Sequenz kodiert für einen Abschnitt des GPI-verankerten Glykoproteins Gas1p aus der Hefe. Diese Sequenz enthält eine GPI-Signalsequenz (GPI-SS), die im ER mit einem GPI-Anker ausgetauscht wird und somit die GPI-Verankerung von PrP in der äußeren Membran der Hefezelle ermöglicht. Zusätzlich wurde ein Histidin-Tag, eine Tabacco Etch Virus (TEV)-Schnittstelle sowie ein Flag-Tag eingefügt. Die beiden Affinitätstags (6xHis und Flag) dienen zur Aufreinigung und zur Antikörper-Detektion des Proteins. Die TEV-Protease-Schnittstelle zwischen dem 6xHis-Tag und Flag-Tag ermöglicht die Isolation des GPI-verankerten Gas1p-Peptids (Schumacher et al. 2010; Seidel and Engelhard 2011)(Dissertation von Miria Schumacher „Untersuchungen zum Einfluss der GPI-Verankerung auf das Faltungsvermögens des Prion Proteins“).

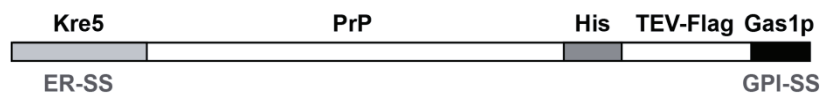


Abb. 12. Schematische Darstellung der Mutante Kre5-PrP-Gas1p.

Das Konstrukt beinhaltet folgende kodierende Sequenzen: Kre5, ER-Signalsequenz (ER-SS) der Hefe; PrP, Prion-Protein (AS 23-231); His, Histidin-Tag; TEV-Flag, Tabacco Etch Proteinase Schnittstelle mit Flag-Tag; Gas1p, ein Abschnitt eines über einen GPI-Anker in der äußeren Zellmembran verankertes Glykoprotein der Hefe. Gas1p enthält eine GPI-Signalsequenz (GPI-SS).

Die Charakterisierung des PrP-Konstrukts in der Hefe wurde von Miria Schumacher durchgeführt. Hierfür wurde das Konstrukt in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) exprimiert. Mittels indirekter Immunfluoreszenz konnte die Lokalisation des GPI-verankerten PrP an der Zelloberfläche der Hefe gezeigt werden (Schumacher et al. 2010).

Da das His-markierte Konstrukt möglicherweise in Säugerzellen eingesetzt werden könnte, wurde mit der Charakterisierung des Konstrukts in Säugerzellen begonnen. Hierfür wurde seine Expression, post-translationale Modifikationen und Lokalisation in einer murinen Neuroblastomzelllinie (N2a Zellen) näher betrachtet. N2a Zellen wurden transient mit dem Kre5-PrP-Gas1p oder einem Wildtyp-PrP (wtPrP) Konstrukt transfiziert. Um die GPI-Verankerung der Proteine zu untersuchen, wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion mit einer Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) verdaut. PI-PLC schneidet spezifisch am GPI-Anker der Proteine, wodurch diese in das Medium freigesetzt werden. Nach PI-PLC-Verdau wurden die Proteine im Zelllysate (L) und im Medium (M) mittels Western Blot unter Verwendung des anti-PrP Antikörpers 3F4 analysiert (Abb. 13).

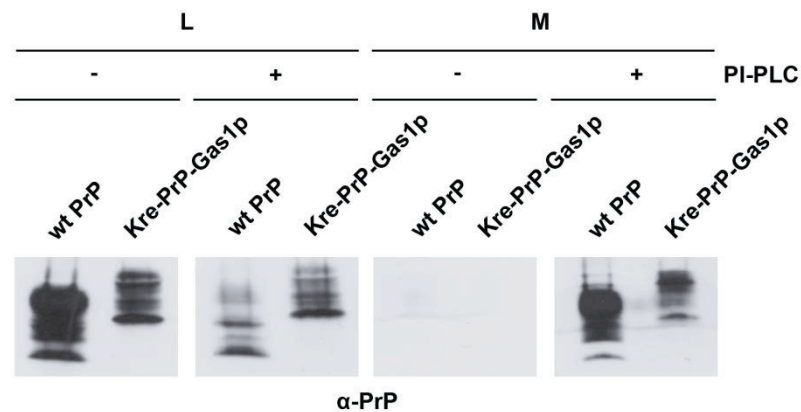


Abb. 13. Wildtyp-PrP und die Mutante Kre-PrP-Gas1p sind über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker in der äußeren Zellmembran verankert. N2a Zellen wurden transient mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Anschließend wurden sie in Anwesenheit von der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) 2 h bei 37°C inkubiert (+PI-PLC), um spezifisch GPI-verankerte Proteine von der Zelloberfläche abzuschneiden. Nach Behandlung mit PI-PLC wurden die Proteine im Zelllysate (L) und Medium (M) mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörpers 3F4 analysiert.

Die Western Blot Analyse der nicht-verdauten Zelllysate (L; -PI-PLC) zeigte, dass die PrP-Mutante in den N2a Zellen exprimiert und post-translational modifiziert wird. Im Vergleich zu wtPrP war das Signal von Kre5-PrP-Gas1p minimal schwächer. Die PrP-Mutante wies das für PrP spezifische Glykosylierungsmuster auf. Verglichen zu den unbehandelten Zelllysaten, nahm das Signal beider Proteine nach PI-PLC-Verdau im Zelllysate ab (L; +PI-PLC). Parallel dazu konnten beide Proteine nach dem Verdau im Medium (M; +PI-PLC) nachgewiesen werden. Somit ist davon auszugehen, dass die PrP-Mutante über einen GPI-Anker in der äußeren Lipidschicht der Plasmamembran verankert ist.

Zusammenfassend ergeben die gezeigten Daten, dass der Austausch der ER- und GPI-Signalsequenz sowie die beiden Affinitätstags und die TEV-Protease-Schnittstelle keinen Einfluss auf die Expression, post-translationalen Modifikationen und die Lokalisation in Säugerzellen haben. Demnach verhält sich die PrP-Mutante wie natives PrP und stellt somit ein System dar, um Interaktionspartner von PrP in Säugerzellen mittels Affinitätsaufreinigung zu identifizieren. Des Weiteren kann in nachfolgenden Experimenten die Funktionalität dieser PrP-Mutante in Zellkulturmodellen untersucht werden. Hierbei ist die Signalweiterleitung von besonderem Interesse, da wtPrP in der Lage ist, neuroprotektive Signalwege zu aktivieren sowie durch Bindung von PrP^{Sc} toxische Signale in das Innere der Zelle zu vermitteln. Überdies ist es anhand dieses Systems möglich, die Umwandlung von rekombinantem PrP in seine fehlgefaltete Isoform in Anwesenheit eines GPI-Ankers zu analysieren. Parallel dazu werden mit Hilfe des etablierten Hefesystems die Strukturanalysen von rekombinantem PrP mit GPI-Anker weiter verfolgt.

2.2 Teil 2 - Das zelluläre Prion-Protein übermittelt neurotoxische Signale β -Faltblatt-reicher Konformere unabhängig von deren Primärstruktur

Die in Mensch und Tier vorkommenden Prion-Erkrankungen sind durch die Vermehrung infektiöser Prionen und neuronalem Zellverlust charakterisiert. Diese Erkrankungen beruhen auf der Fehlfaltung des hochkonservierten, zellulären Prion-Proteins (PrP^{C}) zu seiner pathogenen, β -Faltblatt-reichen Isoform PrP^{Sc} . In Tier- und Zellkulturmodellen konnte gezeigt werden, dass neuronales, GPI-verankertes PrP^{C} an der Oberfläche der Zellen als Rezeptor von PrP^{Sc} fungiert und nach dessen Aktivierung neurotoxische Signale in die Zelle vermittelt. Dieser Prozess scheint unabhängig von der Vermehrung infektiöser Prionen zu sein, da der neuronale Zellverlust in Abwesenheit von der Replikation infektiöser Prionen auftreten kann. Außerdem können sich infektiösen Prionen vermehren ohne eine Neurodegeneration hervorzurufen (Mallucci et al. 2003; Brandner et al. 1996; Rambold et al. 2008; Chesebro et al. 2005).

Interessanterweise ist die Fehlfaltung von Proteinen zu β -Faltblatt-reichen Oligomeren ein gemeinsames Merkmal verschiedener neurodegenerativen Erkrankungen (Soto 2003; Eisenberg and Jucker 2012). Aufgrund der ähnlichen Struktur der Oligomere stellten wir uns die Frage, ob PrP^{C} neben PrP^{Sc} auch von anderen β -Faltblatt-reichen Oligomeren gebunden wird und dadurch toxische Signale in die Zelle vermitteln kann. Aus diesem Grund wurde im zweiten Teil der Arbeit untersucht, ob verschiedene β -Faltblatt-reiche Konformere toxische Effekte über PrP^{C} -abhängige Signalwege induzieren können. Des Weiteren wurden verschiedene Ansätze ausgearbeitet, um die der Signaltransduktion zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären. Hierbei waren die Identifizierung potentieller Kofaktoren, die an der Transduktion der toxischen Signale über PrP^{C} beteiligt sind, sowie Strategien zur Modulation der Toxizität von besonderem Interesse.

2.2.1 Etablierung eines neuartigen Modells zur Charakterisierung der Rolle von PrP^C als Mediator neurotoxischer Signale von PrP^{Sc}

2.2.1.1 Konzept

Anhand von Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass GPI-verankertes PrP^C die toxischen Aktivitäten von PrP^{Sc} in die Zelle vermittelt und somit als Rezeptor von PrP^{Sc} agiert (Mallucci et al. 2003; Brandner et al. 1996; Chesebro et al. 2005). Um die zugrunde liegenden Mechanismen zu untersuchen, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein neuartiges Zellkulturmodell etabliert (Rambold et al. 2008). Da dieses Zellkulturmodell ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit ist, wird der Aufbau im Folgenden näher beschrieben.

In diesem Modell wurde als PrP^{Sc}-Quelle eine Scrapie-infizierte, murine Neuroblastomzelllinie (ScN2a) (Tatzelt et al. 1996) genutzt, die im Gegensatz zu nicht-infizierten Neuroblastomzellen (N2a) infektiöse Prionen vermehrt (Butler et al. 1988) und Proteinase K (PK)-resistentes Material (PrP^{Sc}) akkumuliert (Tatzelt et al. 1996). Die Western Blot Analyse der ScN2a und N2a Zellen bestätigt, dass beide Zelllinien zelluläres PrP exprimieren, wohingegen das PK-resistente Material ausschließlich in infizierten Zellen zu finden ist (Abb. 14). Demnach stellen die ScN2a Zellen eine gute Alternative zu der Aufreinigung von Prionen aus Gehirnmateriale dar.

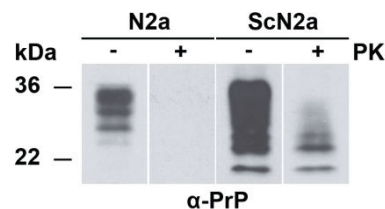


Abb. 14. Die Akkumulation von Proteinase K-resistentem Material ist charakteristisch für Scrapie-infizierte Neuroblastomzellen.

Nicht- (N2a) oder Scrapie-infizierte (ScN2a) Neuroblastomzellen wurden 5 Tage kultiviert. Zelllysate wurden in Anwesenheit von Proteinase K (+PK) (Endkonzentration 10 µg/ml) 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Western Blot unter Verwendung des polyklonalen anti-PrP Antikörpers A7 analysiert.

Infizierte Zellen geben PrP^{Sc} assoziiert mit Exosomen in den extrazellulären Raum ab und können somit das infektiöse Agens auf andere Zellen übertragen (Fevrier et al. 2004). Aus diesem Grund sind die ScN2a Zellen ein ideales

System, um die biologische Wirkung von PrP^{Sc} auf Zellen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde das Co-Kultivierungsmodell etabliert. Das Prinzip dieses Zellkulturmodells ist, dass humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) mit ScN2a oder N2a Zellen co-kultiviert und anschließend die Effekte auf die SH-SY5Y Zellen mit Hilfe von verschiedenen Analysemethoden untersucht werden. Die Co-Kultivierung mit N2a Zellen dient als Kontrolle, damit ein möglicher Stress der Co-Kultivierung analysiert werden kann. Die SH-SY5Y Zellen weisen sehr niedrige endogene PrP^C-Expressionsmengen auf und können somit nach Transfektion mit verschiedenen Konstrukten auf unterschiedliche Parameter untersucht werden.

Für die Co-Kultivierungsexperimente wurden die SH-SY5Y Zellen auf Deckgläschen kultiviert, transient transfiziert und anschließend in eine Schale mit einer 90% konfluenten Schicht der ScN2a oder N2a Zellen überführt (Abb. 15). Nach der Co-Kultivierung wurden die Auswirkungen von PrP^{Sc} auf die Apoptoserate und mitochondriale Morphologie der SH-SY5Y Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz bestimmt.

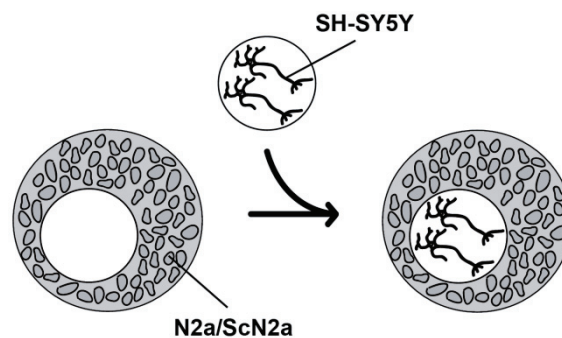


Abb. 15. Schematische Darstellung des Co-Kultivierungsexperiments.

SH-SY5Y Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit den jeweiligen Konstrukten transient transfiziert. Die transfizierten SH-SY5Y Zellen wurden in eine Schale mit einer 90% konfluenten Schicht der ScN2a oder N2a Zellen überführt. Nach entsprechender Co-Kultivierungszeit wurden die Effekte von PrP^{Sc} auf SH-SY5Y Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert.

Des Weiteren wurde das Co-Kultivierungsmodell erweitert, um die Effekte von PrP^{Sc} auf primäre kortikale Neuronen zu untersuchen. Hierfür wurden die primären Neuronen direkt nach der Isolierung aus 14,5-15,5 dpc (*days post coitum*) Mausembryonen in Schalen mit einer 20% konfluenten ScN2a oder N2a

Zellschicht ausplattiert. Nach der Co-Kultivierung wurden die Effekte von PrP^{Sc} auf die Überlebensrate, mitochondriale Morphologie und dendritische Längen der primären Neuronen untersucht.

2.2.1.2 PrP^C übermittelt toxische Signale von homologem und heterologem PrP^{Sc}

Anhand des im letzten Abschnitt beschriebenen Zellkulturmodells konnte eine vorangegangene Studie zeigen, dass an der äußeren Zellmembran lokalisiertes und GPI-verankertes PrP^C toxische Signale von homologem PrP^{Sc} übermittelt. Diese Eigenschaft von PrP^C ist abhängig von dessen unstrukturierter N-terminaler Domäne und dem C-terminalen GPI-Anker (Rambold et al. 2008). Daraus ergab sich die Frage, wie PrP^C die toxische Aktivität von PrP^{Sc} medieren kann. Hierfür sind zwei verschiedene Modelle vorstellbar. Zum einen könnte die Toxizität direkt mit der Vermehrung von PrP^{Sc} in der Zelle verbunden sein. Dabei wäre die intrazelluläre Vermehrung von der Expression des GPI-verankerten PrP^C abhängig. Zum anderen könnte PrP^{Sc} das toxische Signal über einen PrP^C-abhängigen Signalweg auslösen. Hierbei fungiert GPI-verankertes PrP^C an der Oberfläche der Zelle als Rezeptor von PrP^{Sc}.

Um die Frage zu spezifizieren, wurden zunächst die PrP^C-abhängigen toxischen Effekte von PrP^{Sc} anhand des Co-Kultivierungsmodells bestätigt, und anschließend weitere Analysen bezüglich der Replikation von PrP^{Sc} durchgeführt. Hierfür wurden SH-SY5Y Zellen mit Maus-PrP^C (moPrP) transient transfiziert und anschließend mit ScN2a oder N2a Zellen co-kultiviert. Nach 16 h Co-Kultivierung wurden die SH-SY5Y Zellen mit 3,7% Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und anschließend die aktive-Caspase 3 gefärbt. Die Kerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dapi markiert. Für die Quantifizierung der Apoptoserate wurde der Anteil der Zellen, die positiv bezüglich der aktiven Caspase 3 waren (Abb. 16A), oder der Anteil der Zellen mit fragmentierten Kernen (Abb. 16B) von den transfizierten Zellen bestimmt. Die Co-Kultivierung der moPrP-exprimierenden SH-SY5Y Zellen mit den N2a Zellen führte zu einer Apoptoserate von etwa 11%. Maus-PrP^C-exprimierende SH-SY5Y Zellen, die mit ScN2a Zellen co-kultiviert und dadurch mit homologem PrP^{Sc} inkubiert wurden, wiesen eine signifikant erhöhte Apoptoserate von etwa 20% auf. Diese Zunahme

der Menge an apoptotischen Zellen konnte bei SH-SY5Y Zellen, die anstatt PrP^C das GPI-verankerte, grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimierten und mit den ScN2a Zellen co-kultiviert wurden, nicht beobachtet werden. Diese Daten bestätigen, dass PrP^{Sc} einen toxischen Effekt über einen PrP^C-abhängigen Signalweg induziert.

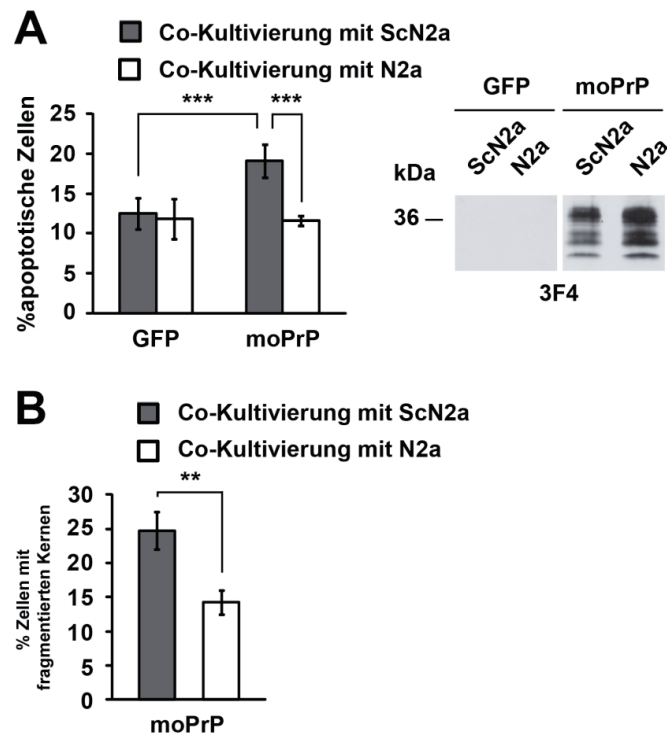


Abb. 16. PrP^{Sc} führt in PrP^C-exprimierenden Zellen zu einem Anstieg der Apoptoserate.

Die mit dem angegebenen Konstrukt transfizierten SH-SY5Y Zellen wurden für 16 h mit ScN2a oder N2a Zellen co-kultiviert. Anschließend wurden die SH-SY5Y Zellen fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und unter Verwendung des polyklonalen anti-aktiven Caspase 3 Antikörpers gefärbt. Für die Quantifizierung der Apoptoserate wurde der Anteil der aktiven Caspase 3-positiven Zellen (**A**) oder der Anteil der Zellen mit fragmentierten Kernen (**B**) von den transfizierten Zellen bestimmt. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt. Die Expression der jeweiligen Konstrukte wurde mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörpers 3F4 analysiert. ** p < 0,005; *** p < 0,0005.

Im nächsten Schritt wurde die Frage untersucht, ob diese toxische Aktivität von der PrP^{Sc}-Replikation abhängig ist. Hierfür wurde die Bildung von PK-resistentem Material während der 16-stündigen Co-Kultivierung bestimmt. Damit das in

SH-SY5Y Zellen neugebildete PK-resistente Material von dem endogenem Maus-PrP^{Sc} der ScN2a Zellen unterscheidbar ist, wurden die SH-SY5Y Zellen mit einem 3F4-getaggtten Maus-PrP-Konstrukt transfiziert. Dies ist möglich, da das 3F4-Epitop nicht mit der Umwandlung von zellulärem zu fehlgefaltetem PrP interferiert (Kascsak et al. 1987; Milhavet et al. 2000). Wenn es in den transfizierten SH-SY5Y Zellen zu der Propagierung von PrP^{Sc} kommt, dann würde PK-resistentes, 3F4-getaggttes PrP in der unlöslichen Fraktion detektierbar sein. Nach der Transfektion wurden die SH-SY5Y Zellen mit ScN2a Zellen co-kultiviert. Nach 16 h Co-Kultivierung wurden die Zellen geerntet, lysiert und mittels Zentrifugation in eine lösliche und unlösliche Fraktion aufgeteilt. Anschließend wurde die unlösliche Fraktion mit PK für 30 min bei 37°C verdaut. In beiden Fraktionen wurde endogenes und/oder 3F4-markiertes PrP^C unter Verwendung der monoklonalen anti-PrP Antikörper 4H11 beziehungsweise 3F4 immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden mittels Western Blot unter Verwendung des Antikörpers 4H11 analysiert (Abb. 17). Da kein 3F4-getaggetes, PK-resistentes Material in der unlöslichen Fraktion detektierbar war, kommt es während der 16-stündigen Co-Kultivierung in den SH-SY5Y Zellen offensichtlich nicht zu einer signifikanten *de novo* Synthese von PrP^{Sc}.

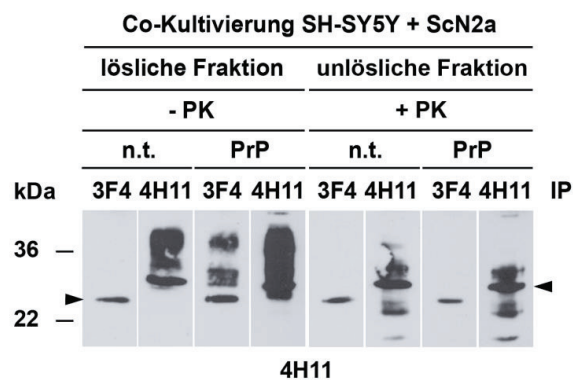


Abb. 17. In moPrP^C-exprimierenden SH-SY5Y Zellen kann nach der Co-Kultivierung mit ScN2a Zellen kein PK-resistentes Material nachgewiesen werden.

Die SH-SY5Y Zellen wurden mit einem 3F4-markiertem Maus-PrP^C (PrP) transfiziert und für 16 h mit ScN2a Zellen co-kultiviert. Nach der Co-Kultivierung wurden die Zellen geerntet, in eiskaltem Lysepuffer A lysiert und mittels Zentrifugation in eine lösliche und unlösliche Fraktion geteilt. Anschließend wurde die unlösliche Fraktion mit Proteinase K (PK) für 30 min bei 37°C verdaut. In beiden Fraktionen wurde endogenes und/oder 3F4-markiertes PrP unter Verwendung der monoklonalen anti-PrP Antikörper 4H11 beziehungsweise 3F4 immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden mittels Western Blot

unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörpers 4H11 analysiert. Die Pfeilspitzen zeigen die leichte Kette des jeweiligen Antikörpers an. n.t., nicht-transfiziert.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass für das Induzieren toxischer Signale keine produktive Replikation von PrP^{Sc} notwendig ist. Aufgrund dieser Beobachtung kam die Frage auf, ob PrP^C von unterschiedlichen Spezies in der Lage ist die toxischen Aktivitäten von Maus-PrP^{Sc} zu vermitteln. Um diese Frage zu spezifizieren wird im Folgenden die Spezies-Barriere näher betrachtet (vgl. Abschnitt 1.2.6). Eine produktive Vermehrung von PrP^{Sc} ist von der Sequenzhomologie zu PrP^C abhängig. So können beispielsweise Mäuse sehr schlecht mit Hamster-Prionen infiziert werden. Allerdings zeigen transgene Mäuse, die Hamster-PrP^C exprimieren, nach Inokulation mit Hamster-Prionen die für Hamster charakteristischen neuropathologischen Veränderungen (Prusiner et al. 1990b). Diese und andere Daten deuten darauf hin, dass die Homologie der PrP-Primärstruktur für eine effiziente Übertragung einer Prion-Erkrankung wesentlich ist. Die Übertragung von Rinder-Prionen auf Menschen hat jedoch gezeigt, dass diese Barriere nicht absolut und vorhersagbar ist.

Trotzdem ist es höchst unwahrscheinlich, dass das von ScN2a Zellen sekretierte Maus-PrP^{Sc} die Konformationsänderung von heterologem PrP^C in die entsprechende pathogene Isoform induzieren kann (Scott et al. 1989; Scott et al. 1997).

Um nun zu untersuchen, ob PrP^C von unterschiedlichen Spezies die toxischen Aktivitäten von Maus-PrP^{Sc} vermitteln können, wurden SH-SY5Y Zellen transient mit heterologem PrP^C aus Hamster (haPrP), Mensch (huPrP), Hirsch (cePrP) oder Rind (boPrP) transfiziert und mit ScN2a oder N2a Zellen co-kultiviert. Nach 16 h Co-Kultivierung wurden die SH-SY5Y Zellen auf den Deckgläschen fixiert, permeabilisiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des aktiven Caspase 3-Antikörpers untersucht. Für die Quantifizierung der Apoptoserate wurde der Anteil der aktiven-Caspase 3-positiven Zellen von den transfizierten Zellen bestimmt. Die mit ScN2a Zellen co-kultivierten SH-SY5Y Zellen zeigten im Vergleich zu den Zellen, die mit N2a Zellen co-kultiviert wurden, eine erhöhte Apoptoserate unabhängig von der Herkunft des exprimierten PrP^C

(Abb. 18). Demnach scheint moPrP^{Sc} toxische Signale über PrP^C, unabhängig von dessen Primärstruktur, zu induzieren.

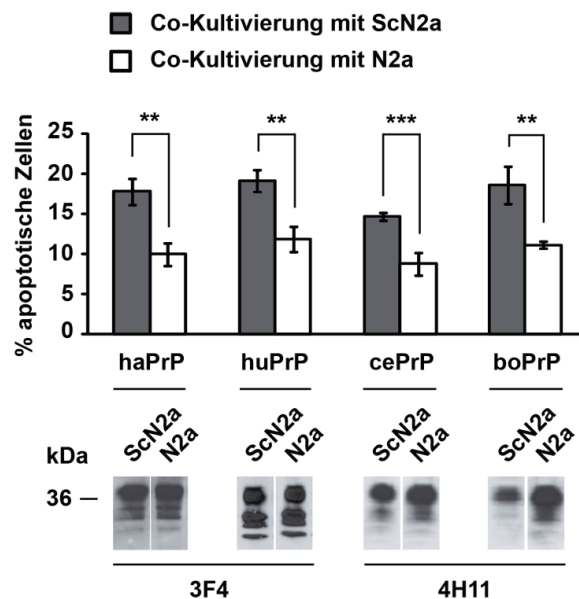


Abb. 18. PrP^C übermittelt toxische Signale von heterologem PrP^{Sc}.

SH-SY5Y Zellen wurden transient mit heterologem PrP^C aus Hamster (haPrP), Mensch (huPrP), Hirsch (cePrP) oder Rind (boPrP) transfiziert und mit ScN2a oder N2a Zellen co-kultiviert. Nach 16 h Co - Kultivierung wurden die SH-SY5Y Zellen fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und unter Verwendung des polyklonalen anti-aktive Caspase 3 Antikörpers gefärbt. Für die Quantifizierung der Apoptoserate wurde der Anteil der aktiven Caspase 3-positiven Zellen von den transfizierten Zellen bestimmt. Die Expression der jeweiligen Konstrukte wurde mittels Western Blot unter Verwendung der monoklonalen anti-PrP Antikörper 3F4 oder 4H11 analysiert. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt. ** p < 0,005; *** p < 0,0005.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass PrP^C toxische Aktivitäten von heterologem PrP^{Sc} übermitteln kann. Somit ist eine Homologie der Primärstruktur zwischen PrP^C und PrP^{Sc} für die produktive Replikation von Prionen essentiell, wohingegen sie für die Übermittlung toxischer Signale eine verminderte Rolle zu spielen scheint. Da sich heterologe PrP^{Sc} Moleküle in ihrer Sekundärstruktur sehr ähneln, könnte diese Gemeinsamkeit der Grund sein, weswegen PrP^C in der Lage ist deren toxische Signale in die Zelle zu vermitteln.

Im folgenden Schritt stellte sich die Frage, ob neben der Caspase 3-Aktivierung weitere toxische Effekte durch PrP^{Sc} in den SH-SY5Y Zellen ausgelöst werden. In vorherigen Studien wurde beschrieben, dass Mitochondrien entscheidende Regulatoren des Zelltodes sind und deren Dysfunktion in Verbindung mit neurodegenerativen Erkrankungen steht (Winklhofer and Haass 2010). Da Mitochondrien an wesentlichen zellulären Prozessen beteiligt sind, hat ihre Fehlfunktion erhebliche Auswirkungen auf die Integrität der Zelle. Um den Effekt von PrP^{Sc} auf die Mitochondrien von moPrP^C-exprimierenden SH-SY5Y Zellen zu untersuchen, wurde die Analyseverfahren erweitert. Dazu wurden SH-SY5Y Zellen mit moPrP^C transfiziert und mit ScN2a oder N2a Zellen co-kultiviert. Nach 16 h Co-Kultivierung wurde die mitochondriale Morphologie der SH-SY5Y Zellen analysiert (Abb. 19). Hierfür wurden die Mitochondrien mit Hilfe des potentialabhängigen MitoTrackers Red CMXRos sichtbar gemacht. Da dies nur bei einem intakten Potential möglich ist, waren die Mitochondrien offensichtlich noch aktiv.

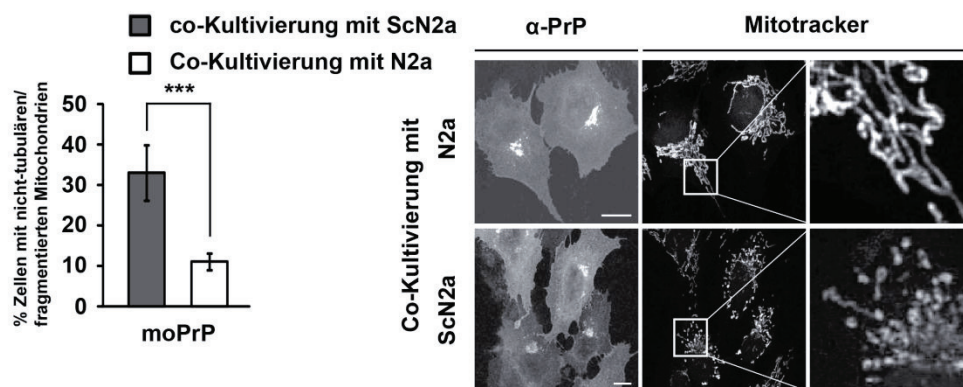


Abb. 19. PrP^{Sc} beeinträchtigt die mitochondriale Integrität PrP^C-exprimierender Zellen.

Mit PrP^C transient transfizierte SH-SY5Y Zellen wurden für 16 h mit ScN2a oder N2a Zellen co-kultiviert. Anschließend wurden die SH-SY5Y Zellen fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörper 3F4 gefärbt. Die Mitochondrien der Zellen wurden mittels MitoTracker Red CMXRos sichtbar gemacht. Zellen, die ein intaktes Netzwerk tubulärer Mitochondrien aufwiesen, wurden als tubulär eingeordnet. Sobald dieses Netzwerk zerstört und die Mitochondrien vorwiegend kugelförmig oder stabähnlich erschienen, galten diese Zellen als fragmentiert. Für die Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie wurde der Anteil der Zellen mit fragmentierten Mitochondrien von den transfizierten Zellen bestimmt. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt. *** p < 0,0005.

Zellen, die ein intaktes Netzwerk tubulärer Mitochondrien aufwiesen, wurden als tubulär eingeordnet. Sobald dieses Netzwerk zerstört und die Mitochondrien vorwiegend kugelförmig oder stabähnlich erschienen, galten diese Zellen als fragmentiert. Etwa 10% der SH-SY5Y Zellen, die mit N2a Zellen co-kultiviert wurden, wiesen nicht-tubuläre, fragmentierte Mitochondrien auf. Die mit ScN2a Zellen co-kultivierten SH-SY5Y Zellen zeigten einen signifikant erhöhten Anteil (etwa 33%) an nicht-tubulären, fragmentierten Mitochondrien. Abbildung 19 (rechte Spalte) zeigt die Mitochondrien-Morphologie der SH-SY5Y Zellen nach der Co-Kultivierung mit ScN2a oder N2a Zellen. Demzufolge beeinträchtigt PrP^{Sc} die mitochondriale Morphologie und könnte dadurch deren Funktion und folglich wesentliche zelluläre Prozesse der Zelle stören.

Zusammenfassend demonstrieren diese Daten, dass PrP^C toxische Aktivitäten von homologen und heterologen PrP^{Sc}-Molekülen vermittelt. Somit scheint die Übermittlung toxischer Signale über PrP^C unabhängig von der Primärsequenz seines Liganden zu sein. Zudem weisen die Resultate darauf hin, dass die toxische Aktivität von PrP^{Sc} unabhängig von dessen Replikation ist. Neben der Aktivierung apoptotischer Vorgänge in der Zelle, führt die PrP^{Sc}-Exposition zur Beeinträchtigung der mitochondrialen Integrität. Da heterologe PrP^{Sc}-Moleküle eine β -Faltblatt-reiche Sekundärstruktur aufweisen, könnte diese Gemeinsamkeit der Grund sein, weswegen PrP^C in der Lage ist deren toxische Signale in die Zelle zu vermitteln. Aufgrund dieser Beobachtung stellte sich die Frage, ob das β -Faltblatt-reiche Amyloid β (A β) ebenfalls toxische Signale über PrP^C mediiieren kann.

2.2.2 PrP^C vermittelt toxische Signale von sekretiertem oder synthetisiertem Amyloid β

Um weitere Evidenz dafür zu erlangen, dass PrP^C toxische Signale von PrP^{Sc} unabhängig von dessen Primärsequenz vermittelt, wurde das β -Faltblatt-reiche Amyloid β (A β) ausgewählt, dessen Primärsequenz im Gegensatz zu heterologem PrP^{Sc} wesentlich von der des PrP^C abweicht. Die Akkumulation des β -Faltblatt-reichen A β ist charakteristisch für die Alzheimer-Krankheit (AD). Einen ersten Hinweis auf eine mögliche Rolle von PrP^C in der Pathogenese von AD ergaben Studien, die zeigten, dass die von A β -induzierte Blockade der Langzeit-

Potenzierung (LTP) als auch die von A β ausgelöste Gedächtnisstörung von der PrP^C-Expression abhängig ist (Lauren et al. 2009; Gimbel et al. 2010).

Um diesen Aspekt weiter zu verfolgen, wurde in dem Zellkulturmodell anstatt PrP^{Sc}-sekretierender ScN2a Zellen, eine Zelllinie (CHO-7PA2) verwendet, die A β generiert und in das Medium abgibt. Es handelt sich um CHO Zellen (engl. *Chinese hamster ovary cells*), die stabil mit einer familiären AD Mutante V717F des Amyloid-Vorläufer-Proteins transfiziert worden sind (Podlisny et al. 1995). Obwohl die Generierung von A β ein physiologischer Prozess ist (Haass and Selkoe 2007), konnte anhand von verschiedenen Modellen gezeigt werden, dass das in das Medium sekretierte A β eine toxische Aktivität aufweist. So führte dessen intrazerebrale Injektion in Mäuse zur Unterbrechung der LTP und damit zur Modulation der synaptischen Plastizität (Walsh et al. 2002). Dieser Effekt konnte ebenfalls bei hippocampalen Schnittkulturen der Maus nachgewiesen werden (Townsend et al. 2006). Des Weiteren war das Lernverhalten von Ratten, denen Medium intrazerebroventrikulär injiziert wurde, beeinträchtigt (Cleary et al. 2005).

Analog zu der PrP^{Sc}-Exposition (vgl. Abschnitt 2.2.1.2) wurden die SH-SY5Y Zellen mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und mit den CHO-7PA2 oder den nicht-transfizierten CHO Zellen co-kultiviert. Nach 16 h Co-Kultivierung wurde der apoptotische Zelltod analysiert. PrP^C-exprimierende SH-SY5Y Zellen, die mit den CHO Zellen co-kultiviert wurden, zeigten eine Apoptoserate von etwa 9%. Die A β -Exposition führte in PrP^C-exprimierenden SH-SY5Y Zellen zu einer signifikant erhöhten Apoptoserate von etwa 17,5%. Diese Zunahme der Menge an apoptotischen Zellen konnte bei SH-SY5Y Zellen, die anstatt PrP^C das GPI-verankerte grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimierten und mit den CHO-7PA2 oder CHO Zellen co-kultiviert wurden, nicht beobachtet werden (Abb. 20A). Um die toxischen Effekte eindeutig auf die A β -Generierung beziehen zu können, wurde im folgenden Schritt die Sekretion von A β durch die Behandlung der CHO-7PA2 Zellen mit dem γ -Sekretase-Hemmer DAPT gehemmt und die Co-Kultivierung parallel zu den unbehandelten CHO-7PA2 Zellen durchgeführt. Im Vergleich zu der Apoptoserate der A β -exponierten SH-SY5Y Zellen, wiesen die SH-SY5Y Zellen, die mit den DAPT-behandelten CHO-7PA2 Zellen co-kultiviert wurden, eine signifikant niedrigere Apoptoserate (etwa 12%) auf (Abb. 20B). Das konditionierte Medium der CHO-7PA2 und CHO Zellen wurde mittels Immunpräzipitation und anschließender Western Blot

Analyse auf die Anwesenheit von A β untersucht. Durch die Behandlung der CHO-7PA2 Zellen mit DAPT war kein A β in dem konditionierten Medium detektierbar (Abb. 20B, unten).

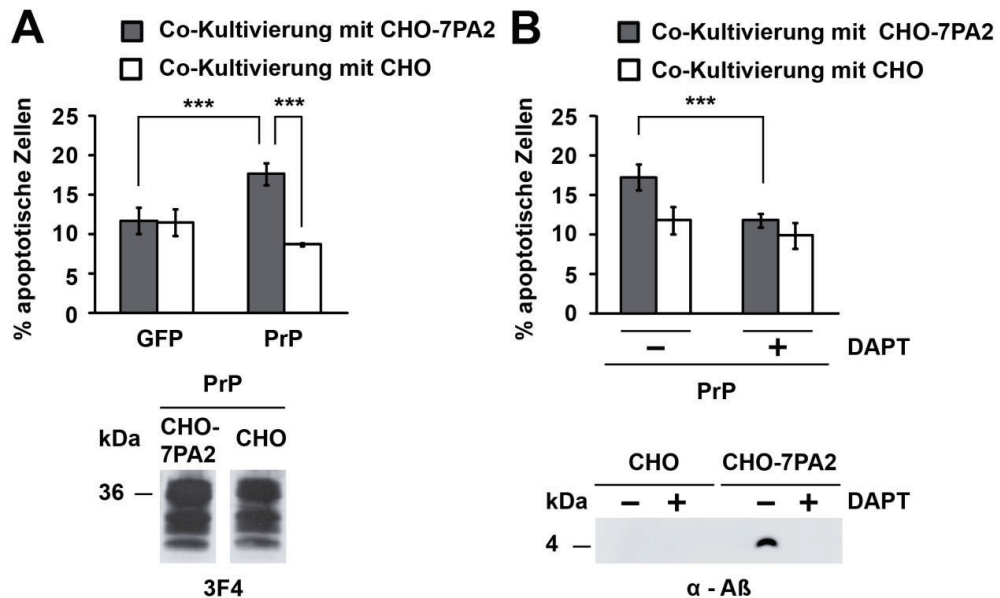


Abb. 20. A β induziert Apoptose in PrP^C-exprimierenden Zellen.

(A, B) SH-SY5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transient transfiziert und mit den CHO-7PA2 oder CHO Zellen co-kultiviert. Nach 16 h Co-Kultivierung wurde die Apoptoserate, wie unter Abb. 18 beschrieben, analysiert. (A) Sekretiertes A β induziert Apoptose in PrP^C-exprimierenden Zellen. Die Expression von PrP^C wurde mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörpers 3F4 analysiert. (B) Die Hemmung der γ -Sekretase verhindert die toxische Aktivität von A β . PrP^C-exprimierende SH-SY5Y Zellen wurden mit DAPT-behandelten (1 μ M) CHO-7PA2 oder CHO Zellen co-kultiviert. Das in das Medium sekretierte A β wurde mittels Immunpräzipitation und anschließender Western Blot Analyse bestimmt. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt. *** $p < 0,0005$.

Die bisherigen Ergebnisse demonstrieren, dass PrP^C die toxische Aktivität von PrP^{Sc} und A β vermitteln kann. Somit ist PrP^C in der Lage toxische Signale von β -Faltblatt-reichen Konformeren unterschiedlicher Herkunft und Primärsequenz zu vermitteln. Daraus ergab sich die Frage, ob die beiden β -Faltblatt-reichen Proteine die gleichen PrP^C-abhängigen Signalwege induzieren. Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurden PrP^C-exprimierende SH-SY5Y Zellen parallel mit zwei verschiedenen Zelllinien (CHO-7PA2 und ScN2a, CHO-7PA2 und N2a, CHO und ScN2a oder CHO und N2a) co-kultiviert. Nach 16 h Co-Kultivierung

wurde die Apoptoserate analysiert (Abb. 21). Die mit N2a und CHO Zellen co-kultivierten SH-SY5Y Zellen wiesen eine Apoptoserate von etwa 11% auf. Falls PrP^{Sc} und A β unterschiedliche toxische Signalwege über PrP^C aktivieren, würde man einen synergistischen Effekt bei gleichzeitiger Exposition vermuten. SH-SY5Y Zellen, die parallel mit PrP^{Sc} und A β inkubiert wurden, zeigten im Vergleich zu der Co-Kultivierung mit nur einer der beiden Zelllinien eine ähnliche Apoptoserate von etwa 22%. Dies deutet darauf hin, dass PrP^{Sc} und A β den gleichen Signalweg aktivieren und möglicherweise um die gleichen Bindungsstellen an PrP^C konkurrieren.

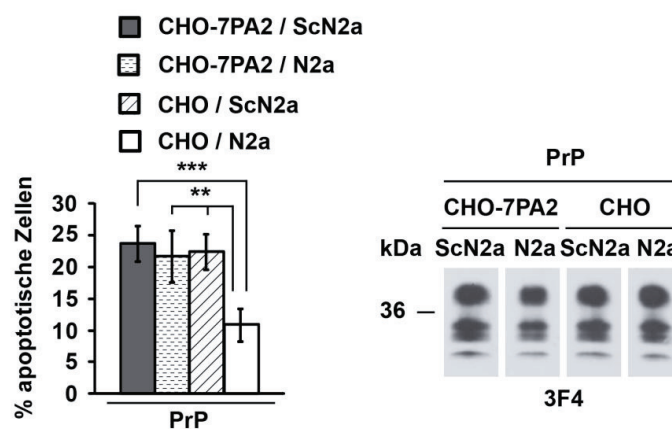


Abb. 21. PrP^{Sc} und A β scheinen toxische Effekte über den gleichen PrP^C-abhängigen Signalweg zu induzieren.

PrP^C-exprimierende SH-SY5Y Zellen wurden parallel mit den angegebenen Zelllinien co-kultiviert. Nach 16 h Co-Kultivierung wurde die Apoptoserate, wie unter Abb. 18 beschrieben, analysiert. Die Expression von PrP^C wurde mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörpers 3F4 analysiert. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt. ** p < 0,005; *** p < 0,0005.

Um die erlangten Ergebnisse zu bestätigen und Erkenntnisse in Bezug auf die toxische Spezies der A β Oligomere zu erlangen, wurde die toxische Aktivität von synthetischem A β 42 auf dessen PrP^C-Abhängigkeit untersucht. Hierfür wurde synthetisches A β 42 mittels Ameisensäure monomerisiert, und direkt nach dem Verdampfen der Ameisensäure in 0,1% Ammoniak (in Wasser) gelöst. Anschließend wurde die Probe mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) in Fraktionen mit niedrigem (Oligo) oder hohem (HMW) Molekulargewicht aufgetrennt. Im unmittelbaren Anschluss an die SEC wurde die

Proteinkonzentration der Fraktionen bestimmt und anschließend gleiche Mengen des A β 42 Peptids (Endkonzentration 500 nM) auf PrP^C-exprimierende SH-SY5Y Zellen gegeben. Als Kontrolle wurden parallel dazu die SH-SY5Y Zellen mit PBS inkubiert. Nach 12 h Inkubation wurden die SH-SY5Y Zellen fixiert, permeabilisiert und die aktive-Caspase 3 gefärbt. Die Analyse der Apoptoserate bestätigte die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente mit sekretiertem A β . PrP^C-exprimierende Zellen, die mit PBS inkubiert wurden, wiesen eine Apoptoserate von etwa 9% auf. Im Vergleich dazu führte die Behandlung mit synthetischem A β 42 zu einer erhöhten Apoptoserate (etwa 16%) (Abb. 22A). Interessanterweise beschränkte sich dies auf die Fraktion, die A β 42 Oligomere mit niedrigem Molekulargewicht enthielt. Hochmolekulare A β 42 Aggregate zeigten keinen Effekt auf PrP^C-exprimierende SH-SY5Y Zellen. Diese Beobachtungen bestätigten die Ergebnisse einer Studie, in der ausschließlich die niedermolekulare Oligomer Fraktion zu einer Blockade der LTP in hippocampalen Gehirnschnitten führte (Harmeier et al. 2009). Im Gegensatz dazu induzierte die niedermolekulare Oligomer Fraktion einer A β 42 Mutante, in der G33 in dem zentralen GXXXG Motiv mit einem Alanin ausgetauscht wurde (Munter et al. 2007), keine toxischen Signale über PrP^C (Abb. 22B). Dies bekräftigte den Befund, dass diese Oligomer Fraktion zu keiner Blockade der LTP in hippocampalen Gehirnschnitten führt (Harmeier et al. 2009).

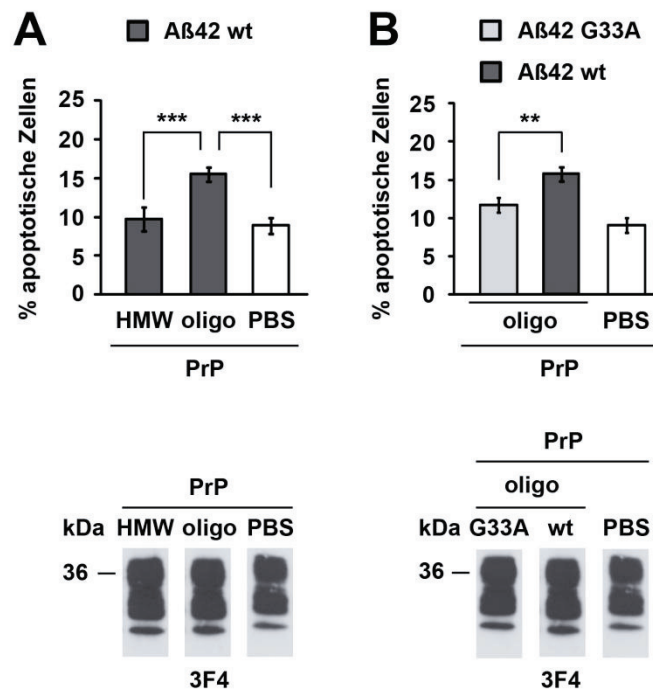


Abb. 22. Synthetische Aβ42 Oligomere induzieren Apoptose in PrP^C-exprimierenden Zellen.

(A, B) PrP^C-exprimierende SH-SY5Y Zellen wurden mit niedermolekularen Oligomeren (Oligo) oder hochmolekularen Aggregaten (HMW) des synthetischen Aβ42 für 12 h inkubiert (Endkonzentration 500 nM). Nach Inkubation wurde die Apoptoserate, wie unter Abb. 18 beschrieben, analysiert. Die Expression von PrP^C wurde mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörpers 3F4 analysiert. (A) Wildtyp-Aβ42 Oligomere induzieren PrP^C-abhängige toxische Signalwege. (B) Oligomere der Aβ42 G33A Mutante lösen keine toxischen Signale über PrP^C aus. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt. ** p < 0,005; *** p < 0,0005.

Anhand dieser Ergebnisse konnte dargelegt werden, dass PrP^C neben PrP^{Sc} auch die toxischen Aktivitäten von sekretiertem Aβ und synthetischen Aβ42 Oligomeren vermitteln kann. Wie bereits in einer vorangegangenen Studie beschrieben wurde, ist die Übermittlung der PrP^{Sc}-induzierten Toxizität von der unstrukturierten N-terminalen Domäne sowie dem C-terminalen GPI-Anker abhängig (Rambold et al. 2008). Da anscheinend sekretiertes Aβ und PrP^{Sc} den gleichen PrP^C-abhängigen Signalweg induzieren, stellte sich die Frage, ob die Toxizität von Aβ ebenfalls durch diese Domänen bestimmt wird. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden SH-SY5Y Zellen mit verschiedenen PrP-Mutanten anstelle von wtPrP transient transfiziert (Abb. 23A). PrP^{ΔN} weist eine Deletion im N-Terminus von PrP auf (AS 27-89). Die PrP-CD4 Mutante ist

über eine heterologe C-terminale Transmembrandomäne von CD4 in der Plasmamembran verankert. Im Gegensatz zu GPI-verankerten Proteinen, ist diese Mutante nicht in speziellen cholesterolreichen Mikrodomänen der Zellmembran lokalisiert. Beide PrP-Mutanten sind komplex glykosyliert und an der äußeren Zellmembran lokalisiert (Winklhofer et al. 2003). Die transfizierten SH-SY5Y Zellen wurden mit den CHO-7PA2 oder CHO Zellen co-kultiviert (Abb. 23B) oder mit den jeweiligen Fraktionen des synthetischen A β 42 inkubiert (Abb. 23C). SH-SY5Y Zellen, die die PrP-CD4-Mutante exprimierten, wiesen nach Co-Kultivierung mit den CHO-7PA2 Zellen oder CHO Zellen eine Apoptoserate von etwa 8,5% auf. Ein ähnliches Ergebnis zeigten die PrP-CD4-exprimierenden SH-SY5Y Zellen, die mit der Oligo- oder HMW-Fraktion des synthetischen A β 42 inkubiert wurden. Im Vergleich zu den SH-SY5Y Zellen, die wtPrP exprimierten, führte die Deletion der N-terminalen Domäne bei der Co-Kultivierung mit CHO-7PA2 Zellen zu einer signifikant verringerten Apoptoserate (etwa 13%). Demnach ist die Transduktion der A β -induzierten, toxischen Signale via PrP^C von dessen N-terminalen Domäne und dem GPI-Anker abhängig. Anhand der Western Blot Analysen wurde bestätigt, dass beide PrP-Mutanten komplex glykosyliert sind und dass die Expressionsmengen durch die Co-Kultivierung beziehungsweise Inkubation nicht beeinträchtigt werden.

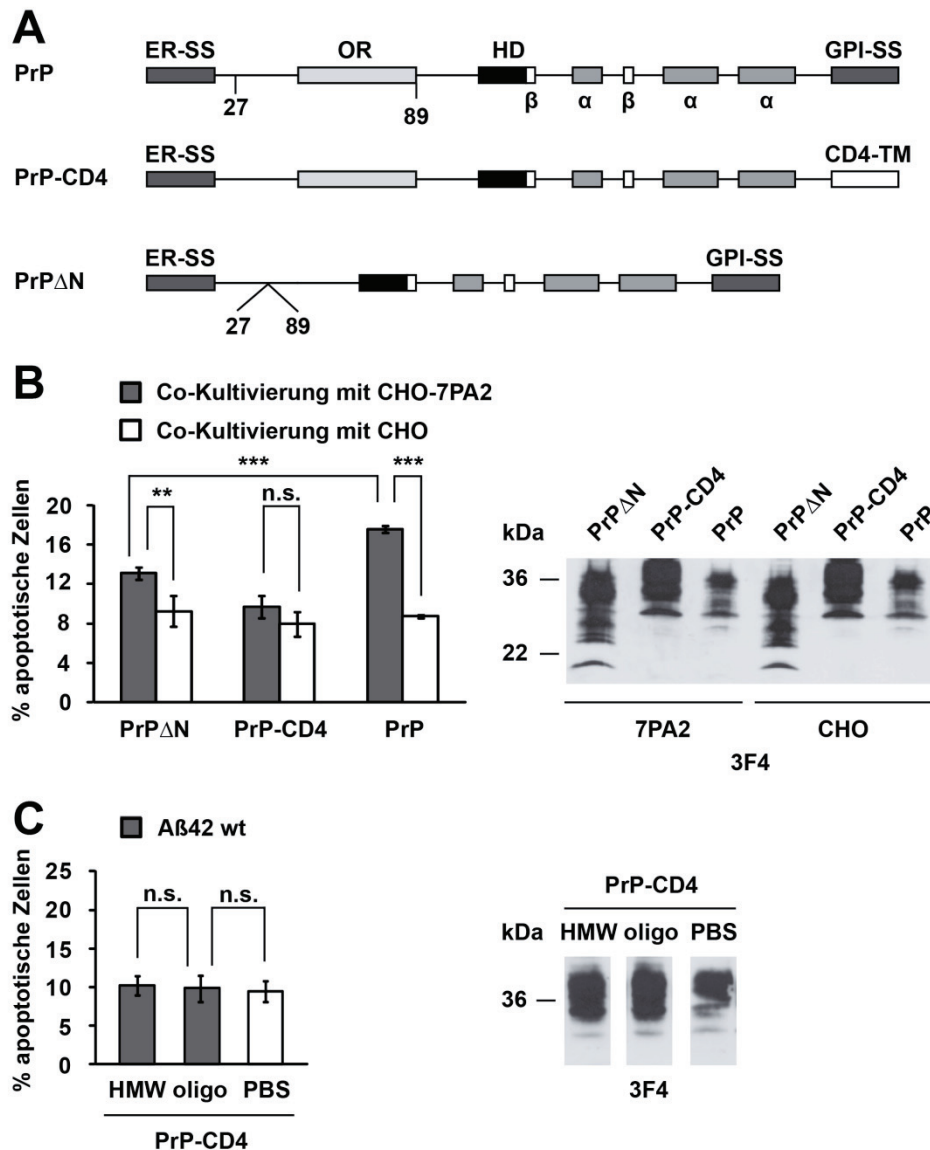


Abb. 23. Die Transduktion der A β -induzierten, toxischen Signale via PrP^C ist von dessen N-terminalen Domäne und dem GPI-Anker abhängig.

(A) Schematische Darstellung der verwendeten PrP-Mutanten. PrP, Wildtyp-Prion-Protein; PrP-CD4, PrP-Mutante mit Transmembrandomäne von CD4; PrP Δ N, PrP-Mutante, der die N-terminale Domäne fehlt (AS 27-89); ER-SS, ER-Signalsequenz; OR, Octarepeat-Region; HD, Hydrophobe Domäne; α , alpha-helikale Domäne; β , beta-Strang; GPI-SS, GPI-Signalsequenz; CD4-TM, CD4-Transmembrandomäne. (B) Die N-terminale Domäne und der GPI-Anker von PrP^C ist für die Transduktion toxischer Signale von sekretiertem A β essentiell. SH-SY5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und mit CHO-7PA2 oder CHO Zellen co-kultiviert. Nach 16 h Co-Kultivierung wurde die Apoptoserate, wie unter Abb. 18 beschrieben, analysiert. Die Expression der Konstrukte wurde mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörpers 3F4 analysiert. (C) Synthetische A β 2 Oligomere sind für PrP-CD4-exprimierende Zellen nicht toxisch. Mit PrP-CD4 transfizierte SH-SY5Y Zellen wurden mit synthetischen A β 2 Oligomeren für 12 h

inkubiert. Die Apoptoserate wurde, wie unter Abb. 18 beschrieben, analysiert. Die Expression von PrP-CD4 wurde mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörpers 3F4 bestimmt. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt. n.s., nicht signifikant; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$.

Die aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass PrP^C toxische Signale von PrP^{Sc} und A β übermitteln kann. Des Weiteren wurde die weitverbreitete Annahme bestätigt, dass lösliche A β 42 Oligomere die toxische Spezies darstellen (Shankar and Walsh 2009). Interessanterweise benötigt PrP^C die unstrukturierte N-terminale Domäne sowie den C-terminalen GPI-Anker, um die toxischen Signale von PrP^{Sc} und A β vermitteln zu können. Da in beiden Fällen die Toxizität von den gleichen Domänen abhängig ist, bekräftigt dies die Vermutung, dass PrP^{Sc} und A β über denselben PrP^C-abhängigen Signalweg die toxischen Effekte induzieren. Eine wesentliche Gemeinsamkeit der beiden fehlgefalteten Proteine ist ihre β -Faltblatt-reiche Konformation. Aus diesem Grund scheint PrP^C die Eigenschaft zu haben verschiedene β -Faltblatt-reiche Konformere zu binden und dadurch einen toxischen Signalweg zu aktivieren.

2.2.3 PrP^C vermittelt toxische Signale β -Faltblatt-reicher Konformere eines Hefeprion-Proteins

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde im nächsten Schritt das Hefeprion-Protein Sup35 untersucht. Hefeprionen wurden erstmals von Wickner und Kollegen beschrieben (Wickner 1994). Das Hefeprion-Protein Sup35 ist ein Translation-Terminationsfaktor, der den Prion-Phänotyp [PSI⁺] in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ausbilden kann (Glover et al. 1997). Die Prion-ähnliche Eigenschaft dieser Proteine beruht auf der Besonderheit, dass sie, vergleichbar mit dem in Säugerzellen vorkommenden PrP, in einer oder mehreren sich selbst-verbreitenden Konformationen vorkommen können (Tuite et al. 2011). Da die Prion-bildende Eigenschaft von Sup35 ausschließlich durch die N-terminale Domäne (N) bestimmt wird und die zentrale Domäne (M) für die Stabilisierung der löslichen Form und der Prionform bedeutsam ist, wurde ein Modul (NM) generiert, das die für die Funktionalität des Faktors relevante C-terminale Domäne nicht beinhaltet (Li and Lindquist 2000) (Abb. 24A). Hefeprion-Proteine bilden durch die Konformationsänderung β -Faltblatt-reiche,

infektiöse Proteine, die zu hochstrukturierten Fibrillen akkumulieren können (Shorter and Lindquist 2005). Aus diesem Grund stellen β -Faltblatt-reiche NM Oligomere ein System dar, um unsere Ergebnisse zu verifizieren.

Hierfür wurden rekombinant hergestellte NM Oligomere, bestehend aus Dimeren, Trimeren und Tetrameren, auf ihre toxische Aktivität in PrP^C-exprimierenden SH-SY5Y Zellen untersucht. SH-SY5Y Zellen wurden mit den angegebenen PrP-Konstrukten transfiziert und mit den NM Oligomeren oder Puffer für 7 h inkubiert (Endkonzentration 500 nM). Nach Inkubation wurde die Apoptoserate mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des anti-aktive Caspase 3-Antikörpers analysiert (Abb. 24B, linke Spalte). Im Vergleich zu den mit Puffer-behandelten SH-SY5Y Zellen zeigten die PrP^C-exprimierenden Zellen, die mit den NM Oligomeren inkubiert wurden, eine signifikant erhöhte Zelltodrate von etwa 22%. Die Apoptoseraten der PrP-CD4-exprimierende SH-SY5Y Zellen wiesen keine Unterschiede nach Inkubation mit NM Oligomeren oder dem Puffer auf. Die Western Blot Analyse zeigte, dass die Inkubation mit den NM Oligomeren keinen Effekt auf die Expressionsmengen von PrP oder PrP-CD4 hat (Abb. 24B, rechte Spalte)

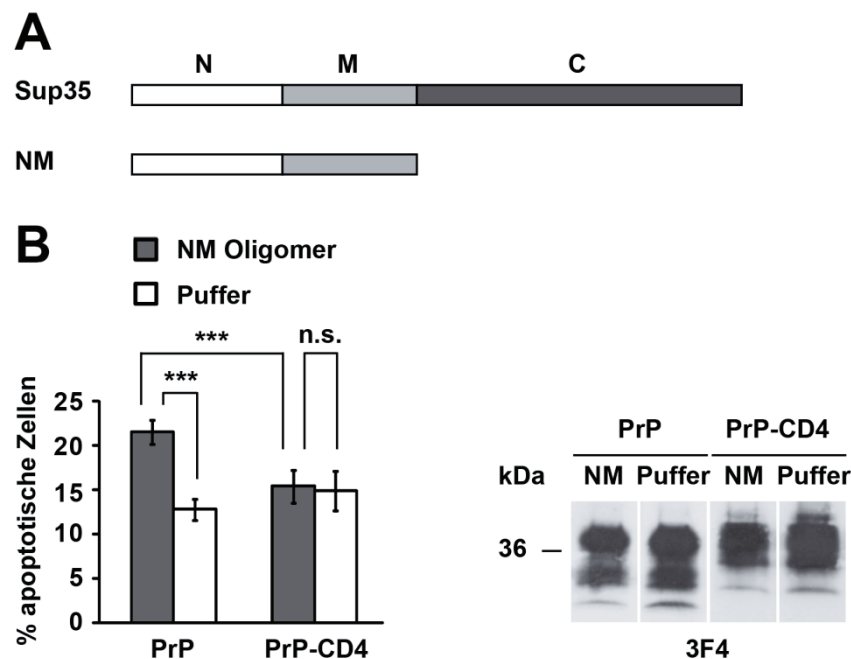


Abb. 24. Ein β -Faltblatt-reiches Hefeprion-Protein induziert Apoptose über PrP^C.

(A) Schematische Darstellung des Hefeprion-Proteins Sup35. N, Prion bildende Domäne; M, hochgeladene zentrale Domäne; C, Domäne, die essentiell für die Translation-Terminations-Funktion ist. (B) NM Oligomere induzieren toxische Signalwege über PrP^C. SH-SY5Y Zellen wurden mit den angegebenen

Konstrukten transfiziert und mit dem Hefepriion-Protein für 7 h inkubiert (NM, Endkonzentration 500 nM). Als Kontrolle wurden parallel SH-SY5Y Zellen mit dem Puffer A inkubiert. Nach Inkubation wurde die Apoptoserate, wie unter Abb. 18 beschrieben, analysiert. Die Expression der Konstrukte wurde mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörpers 3F4 analysiert. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt. n.s., nicht-signifikant; *** $p < 0,0005$.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass PrP^C die Toxizität von dem Hefepriion-Protein Sup35 vermitteln kann. Somit ist PrP^C in der Lage auch toxische Effekte eines β -Faltblatt-reichen Proteins zu vermitteln, das nicht in Säugerzellen vorkommt.

2.2.4 PrP^C vermittelt toxische Signale von β -Faltblatt-reichen Oligomeren eines *de novo* entworfenen Peptids (β -Peptid)

Nachdem unsere Ansätze gezeigt hatten, dass PrP^C die Toxizität von verschiedenen biologisch vorkommenden Proteinen vermitteln kann, untersuchten wir synthetisch entworfene Proteine ohne biologische Funktion. In einer vorherigen Studie wurde beschrieben, dass die abwechselnde Folge polarer und nicht-polarer Aminosäurereste und die mehrmalige Wiederholung dieser Sequenz das β -Faltblatt als Sekundärstruktur des Peptids begünstigt (West et al. 1999; Wei et al. 2003). Auf der Basis dieser Beobachtung wurde das in dieser Arbeit verwendete β -Peptid entworfen und rekombinant hergestellt. Es kommt demnach nicht natürlich vor und weist eine β -Faltblatt-reiche Struktur auf. Im folgenden Schritt wurde der Effekt des β -Peptids auf PrP^C-exprimierende Zellen analysiert. Als Kontrolle wurde ein α -helikales Peptid (α -Peptid) verwendet. Die SH-SY5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und für 12 h mit dem β -Peptid, dem α -Peptid oder PBS inkubiert (Endkonzentration 200 nM). Nach Inkubation wurde die Apoptoserate mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Die Analyse zeigte, dass die Inkubation mit dem α -Peptid oder PBS keinen toxischen Effekt in PrP^C-exprimierenden SH-SY5Y Zellen induzierte. Wurden jedoch die PrP^C-exprimierenden Zellen mit dem β -Peptid inkubiert, hatte dies eine erhöhte Apoptoserate (etwa 18%) zur Folge (Abb. 25). SH-SY5Y Zellen, die die PrP-Mutante PrP Δ N oder PrP-CD4 exprimierten, wiesen nach Inkubation mit dem β -Peptid keine gesteigerte

Apoptoserate auf (etwa 12%). Demnach ist die Übermittlung des toxischen Signals von der N-terminalen Domäne und dem GPI-Anker des PrP^C abhängig.

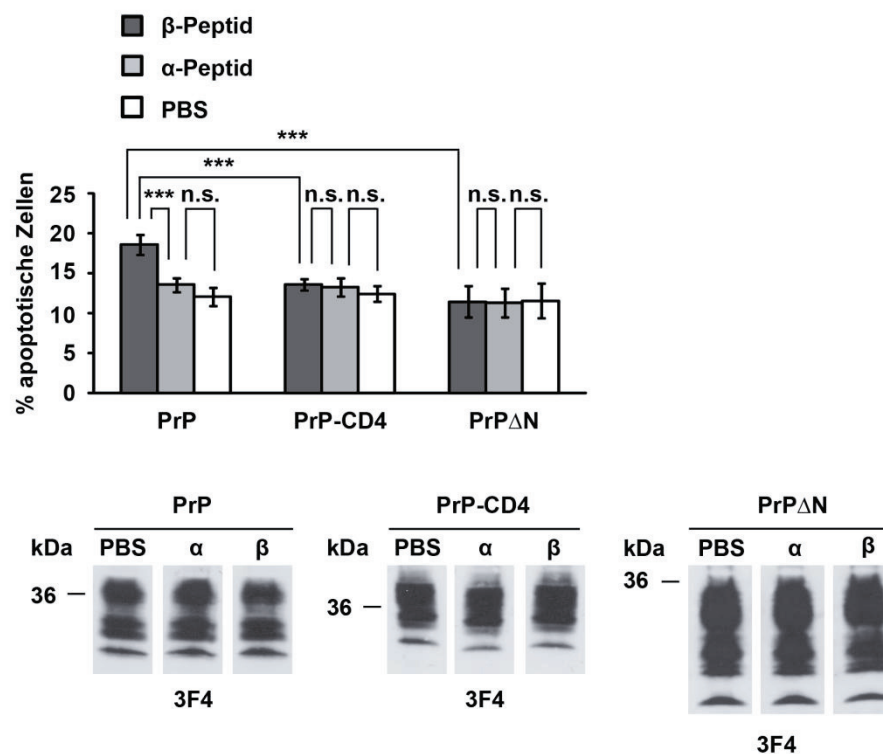


Abb. 25. PrP^C übermittle toxische Signale eines *de novo* entworfenen, β -Faltblatt-reichen Peptids.

SH-SY5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und mit dem β -Peptid, α -Peptid oder PBS für 12 h inkubiert (Endkonzentration 200 nM). Nach Inkubation wurde die Apoptoserate, wie unter Abb. 18 beschrieben, analysiert. Die Expression von PrP^C wurde mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörpers 3F4 analysiert. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt. n.s., nicht-signifikant; *** $p < 0,0005$.

Die dargestellten Resultate zeigen, dass PrP^C die toxische Aktivität von einem β -Faltblatt-reichen, *de novo* entworfenen Peptid (β -Peptid) vermitteln kann. Die Daten deuten darauf hin, dass PrP^C durch die Interaktion mit β -Faltblatt-reichen Proteinen toxische Signalwege aktiviert. Außerdem scheint die N-terminale Domäne von PrP^C Voraussetzung für die Interaktion und somit für die folgende Transduktion des toxischen Signals zu sein.

Im nächsten Schritt wurde diese Vermutung mit Hilfe eines Bindungsexperiments spezifiziert. SH-SY5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und mit dem β -Peptid inkubiert. Die Bindung des β -Peptids an die jeweiligen Konstrukte wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert (Abb. 26). Das mit einem Myc-Tag markierte β -Peptid band an Volllängen-PrP, unabhängig davon, ob es über einen GPI-Anker oder einer Transmembrandomäne in der Plasmamembran verankert war. Die PrP Δ N-Mutante konnte nicht von dem β -Peptid gebunden werden. Somit ist der N-Terminus von PrP^C wesentlich an der Interaktion mit dem β -Peptid beteiligt.

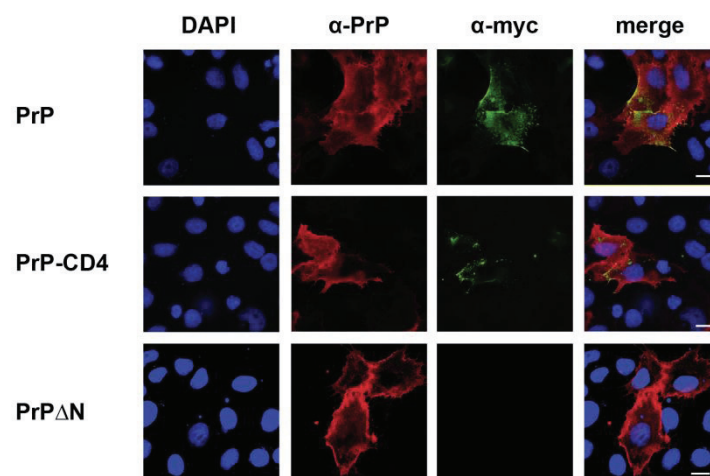


Abb. 26. Die unstrukturierte N-terminale Domäne vermittelt die Bindung des β -Peptids an PrP^C.

SH-SY5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und mit dem β -Peptid für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des polyklonalen anti-PrP Antikörpers A7 und dem monoklonalen anti-Myc Antikörpers 4A6 analysiert. Der Zellkern wurde mit Dapi gefärbt. Maßstab 10 μ m.

Die hier aufgeführten Ergebnisse legen dar, dass das *de novo* entworfene β -Peptid die unstrukturierte N-terminale Domäne von PrP^C bindet und dadurch ein toxisches Signal induziert. Da das β -Peptid mit PrP-CD4 interagiert, dies jedoch zu keiner erhöhten Apoptoserate führt, scheint die Lokalisation des GPI-verankerten PrP^C in den *Lipid Rafts* eine Voraussetzung für die Aktivierung der toxischen Signalwege zu sein. Diese und zuvor diskutierte Resultate deuten darauf hin, dass β -Faltblatt-reiche Proteine PrP^C binden können und dadurch

Apoptose auslösen. Um die mit etablierten Zelllinien gewonnenen Daten in einem relevanten Modell zu bestätigen, wurde in den folgenden Schritten der Effekt von PrP^{Sc} und dem β -Peptid auf primäre kortikale Neuronen untersucht.

2.2.5 Primäre Neuronen die kein PrP^C exprimieren sind weniger anfällig gegenüber toxischer Effekte von PrP^{Sc} oder von dem *de novo* entworfenen β -Peptid

Zur Analyse der Effekte von β -Faltblatt-reichen Proteinen auf primäre kortikale Neuronen, wurden diese aus Wildtyp (PrP^{+/+}) oder PrP-*Knockout* (PrP^{0/0}) 14,5–15,5 dpc (*days post coitum*) Mausembryonen isoliert. Die PrP^C-Expressionsmengen in den PrP^{+/+}- oder PrP^{0/0}-Neuronen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz und Western Blot Analysen überprüft (Abb. 27A). Im Vergleich zu den primären kortikalen PrP^{+/+}-Neuronen wiesen PrP^C-exprimierende SH-SY5Y Zellen ähnliche PrP^C-Level auf (Abb. 27B). Diese Beobachtung bekräftigt die Relevanz der bereits in SH-SY5Y Zellen generierten Daten.

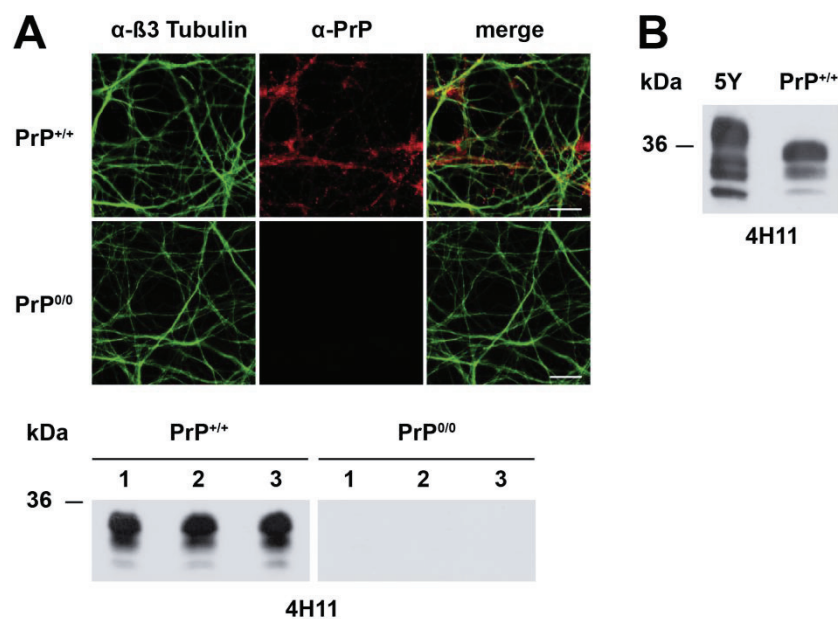


Abb. 27. PrP^C-Expression in primären kortikalen Neuronen.

(A) Primäre kortikale Neuronen wurden aus Wildtyp (PrP^{+/+}) oder PrP-*Knockout* (PrP^{0/0}) 14,5–15,5 dpc (*days post coitum*) Mausembryonen isoliert und 6 Tage auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen kultiviert. Nach Fixierung wurden die Zellen permeabilisiert und unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörpers 4H11 und eines polyklonalen anti- β 3 Tubulin Antikörpers als

neuronaler Marker gefärbt. Die PrP^C-Expression von drei voneinander unabhängigen Präparationen wurde mittels Western Blot unter Verwendung des anti-PrP Antikörpers 4H11 analysiert. (B) Primäre kortikale Wildtyp-Neuronen zeigen im Vergleich zu PrP^C-exprimierenden SH-SY5Y Zellen ähnliche PrP^C-Expressionsmengen. Gleiche Proteinmengen von Zelllysaten PrP^C-transfizierter SH-SY5Y Zellen und PrP^C-exprimierender Neuronen wurden mittels Western Blot unter Verwendung des anti-PrP Antikörpers 4H11 analysiert. Maßstab 10 µm.

Für die Analyse des Effektes von PrP^{Sc} auf primäre kortikale Neuronen wurden diese direkt nach ihrer Isolierung in Schalen mit einer 20% konfluenten ScN2a oder N2a Zellschicht ausplattiert. Nach 4 oder 5 Tagen Co-Kultivierung wurde die Überlebensrate der PrP^{+/-}- und PrP^{0/0}- Neuronen bestimmt (Abb. 28A). Hierfür wurden die primären Neuronen auf Deckgläschen fixiert, permeabilisiert und das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2) als dendritischer Marker gefärbt. Die Zellzahl MAP2-positiver Neuronen wurde in einer Fläche von 1 mm² mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die Co-Kultivierung der PrP-defizienten Neuronen mit ScN2a oder N2a Zellen induzierte keinen Phänotyp. Im Vergleich zu der Co-Kultivierung mit N2a Zellen führte die Co-Kultivierung PrP^C-exprimierender Neuronen mit ScN2a Zellen zu einer um etwa 40% verringerten Überlebensrate. Parallel dazu wurde nach 4 Tagen Co-Kultivierung die dendritische Länge der Neuronen mit Hilfe eines Zeiss LSM Image Programms bestimmt. Hierbei wurden die Neuronen fixiert, permeabilisiert und MAP2 gefärbt. Die dendritische Länge der PrP^{0/0}-Neuronen wurde durch die Co-Kultivierung mit ScN2a Zellen nicht beeinträchtigt. Jedoch wiesen PrP^C-exprimierende Neuronen, die mit ScN2a Zellen co-kultiviert wurden, im Vergleich zu den mit N2a Zellen-co-kultivierten Neuronen, Dendriten auf, deren Länge um etwa 37% verkürzt war (Abb. 28B).

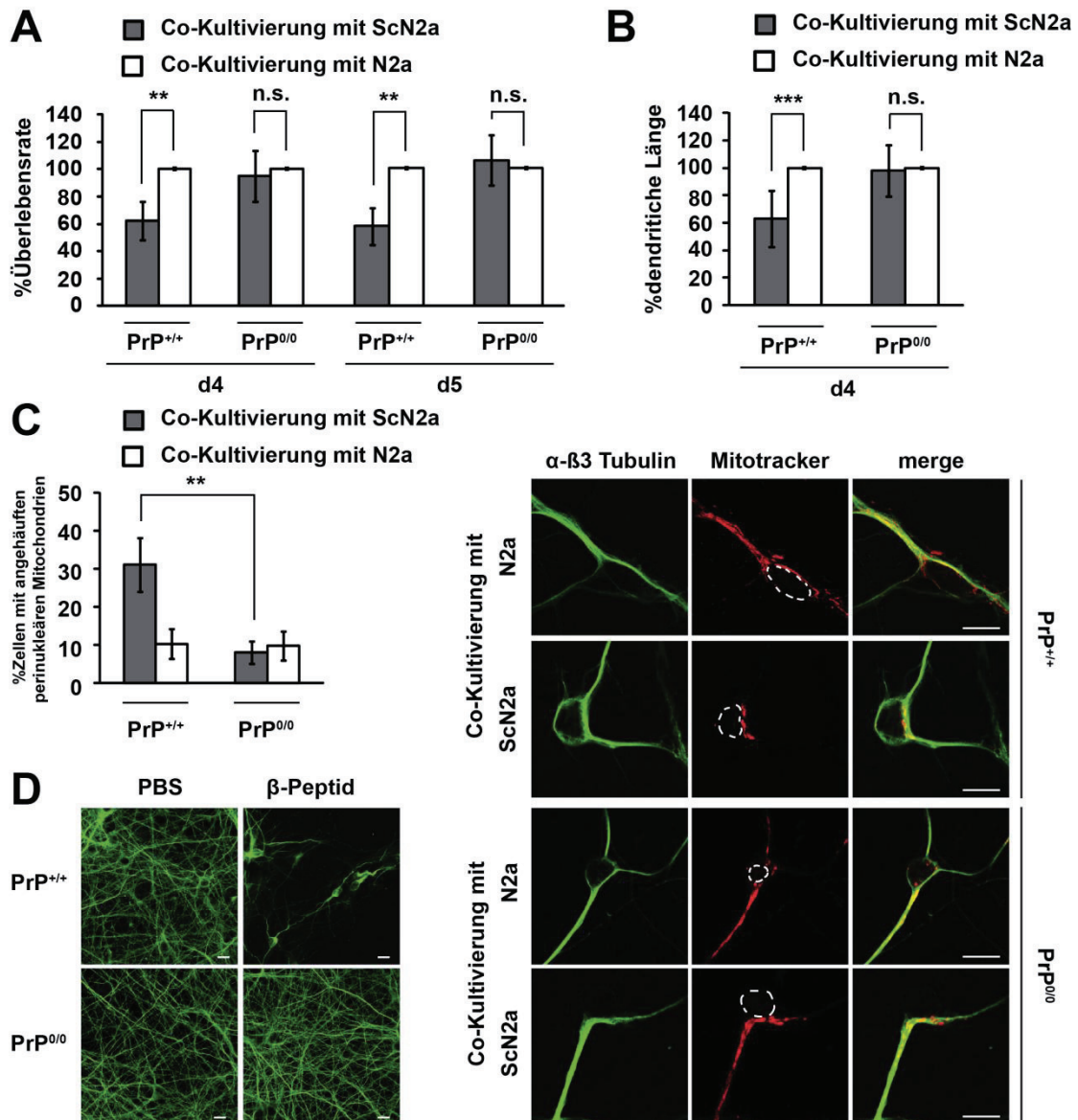


Abb. 28. PrP^C-exprimierende primäre kortikale Neuronen sind anfälliger gegenüber toxischen Effekten von PrP^{Sc} oder dem β -Peptid.

(A–C) Primäre kortikale Neuronen wurden aus Wildtyp (PrP^{+/+}) oder PrP-Knockout (PrP^{0/0}) 14,5–15,5 dpc Mausembryonen isoliert, in Schalen mit einer 20% konfluenten ScN2a oder N2a Zellschicht ausplattiert und 4 oder 5 Tage auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen kultiviert. Nach Co-Kultivierung wurden die Neuronen fixiert, permeabilisiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. (A) Die Exposition mit PrP^{Sc} führt bei PrP^C-exprimierenden Neuronen zu einer verminderten Zellzahl. Um die Überlebensrate zu untersuchen, wurde die Zellzahl MAP2-positiver Neuronen in einer Fläche von 1 mm² mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Gezeigt wird der Prozentsatz der lebenden Neuronen, die mit ScN2a Zellen co-kultiviert wurden, bezogen auf die mit N2a Zellen co-kultivierten Neuronen. Die Rate der lebenden, mit N2a Zellen co-kultivierten Neuronen wurde auf 100% gesetzt. (B) Die Länge der Dendriten wird durch PrP^{Sc} negativ beeinflusst. Nach 4 Tagen Co-Kultivierung wurde die Länge der Dendriten MAP2-gefärbter Neuronen

bestimmt. Gezeigt wird der Prozentsatz der dendritischen Längen von Neuronen, die mit ScN2a Zellen co-kultiviert wurden, bezogen auf die der mit N2a Zellen co-kultivierten Neuronen. Die Rate der mit N2a Zellen co-kultivierten Neuronen wurde auf 100% gesetzt. **(C)** PrP^{Sc} induziert eine perinukleäre Lokalisation der zu Clustern angehäuften Mitochondrien. Für die Analyse der mitochondrialen Morphologie wurden die Neuronen vor dem Fixieren mit einem potentialabhängigen MitoTracker Red CMXRos inkubiert. Für die Quantifizierung wurde der Anteil der Neuronen mit perinukleär angehäuften Mitochondrien von β 3 Tubulin-positiven Neuronen bestimmt. **(D)** Das β -Peptid induziert Zelltod in PrP^C-exprimierenden Neuronen. Primäre kortikale Neuronen wurden isoliert und auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen kultiviert. Die Neuronen wurden jeweils an Tag 4 und 5 mit dem β -Peptid (2 oder 5 μ M) behandelt. Am Tag 6 wurden sie fixiert, permeabilisiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung eines β 3-Tubulin Antikörpers analysiert. Gezeigt wird eine repräsentative Aufnahme dreier voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Maßstab 10 μ m.

Da die Co-Kultivierung PrP^C-exprimierender SH-SY5Y Zellen zu einer veränderten mitochondrialen Morphologie führt (vgl. Abschnitt 2.1.2.2), wurden im nächsten Schritt die möglichen Auswirkungen von PrP^{Sc} auf die Mitochondrien der co-kultivierten, primären Neuronen mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des MitoTrackers Red CMXRos untersucht (Abb. 28C). Die Analyse der mitochondrialen Morphologie zeigte, dass etwa 10% der mit ScN2a oder N2a Zellen-co-kultivierten, PrP-defizienten Neurone angehäuften, perinukleäre Mitochondrien aufwiesen. Der Anteil der PrP^C-exprimierenden Neuronen mit dieser mitochondrialen Morphologie lag bei den mit N2a Zellen co-kultivierten Neuronen ebenfalls bei etwa 10%. Im Gegensatz zu den PrP^C-defizienten Neuronen, induzierte die PrP^{Sc}-Exposition bei den PrP^C-exprimierenden Neuronen einen Anstieg auf etwa 31%. In Abbildung 28C (rechte Spalte) ist die Lokalisation der Mitochondrien exemplarisch dargestellt. In diesem Kontext ist es wichtig zu erwähnen, dass die Co-Kultivierung der primären Neuronen mit N2a Zellen im Vergleich zu der normalen Kultivierung im Allgemeinen nur wenig Stress für die Neuronen darstellte.

Um den Effekt des β -Peptids auf primäre kortikale Neuronen zu analysieren, wurden die primären Neuronen nach der Isolierung auf Deckgläschen ausplattiert und 6 Tage kultiviert und mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des anti- β 3-Tubulin Antikörpers analysiert. Die Behandlung der Neuronen mit dem β -Peptid an Tag 4 und Tag 5 (2 oder 5 μ M) führte bei PrP^C-exprimierenden Neuronen zu einem drastischen Zellverlust. Abbildung 28D zeigt eine

repräsentative Aufnahme von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

Die Experimente mit primären kortikalen Neuronen zeigen, dass PrP^C toxische Effekte von PrP^{Sc} und dem β -Peptid vermitteln kann. Durch die PrP^{Sc}-Exposition wurden neben der Lebensfähigkeit der Neuronen, die Länge der Dendriten sowie die mitochondriale Integrität PrP^C-abhängig gestört. Somit wurde die These in primärer Zellkultur bestätigt, dass β -Faltblatt-reiche Konformere unterschiedlichen Ursprungs und Primärsequenz über einen PrP^C-abhängigen Signalweg toxische Effekte auslösen können. In dem nächsten Schritt stellten wir uns die Frage, welche Ansätze geeignet sind, um die toxischen Effekte der Proteine zu modulieren und dadurch zugrunde liegende Mechanismen aufzuklären.

2.2.6 Modulation der toxischen Effekte β -Faltblatt-reicher Proteine

Die bisherigen Ergebnisse demonstrieren, dass PrP^C toxische Signale β -Faltblatt-reicher Proteine vermitteln kann. Hierfür ist die unstrukturierte N-terminale Domäne von besonderer Wichtigkeit, da sie die Bindung der Liganden zu PrP^C zu vermitteln scheint. Daher sollten Ansätze untersucht werden, die die Bindung des β -Faltblatt-reichen Proteins an PrP^C verhindern und zu einer Verminderung der Toxizität führen. Dies könnte man beispielsweise durch Moleküle erreichen, die spezifisch an das β -Faltblatt-reiche Protein binden und somit die Interaktion mit PrP^C blockieren. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Modulation potentieller Co-Faktoren von PrP^C, die an der Signalweiterleitung beteiligt sind. In den folgenden Schritten wurde das etablierte Zellsystem genutzt, um potentielle Bindungs-Inhibitoren und Kofaktoren von PrP^C zu untersuchen.

2.2.6.1 Die toxische Aktivität β -Faltblatt-reicher Proteine wird durch eine sekretierte Version der N-terminalen Domäne von PrP^C verhindert

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die unstrukturierte N-terminale Domäne von PrP^C die Bindung von β -Faltblatt-reichen Proteinen an PrP^C vermittelt. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob

eine sekretierte Version dieser Domäne β -Faltblatt-reiche Proteine binden und im Überschuss die Interaktion mit Vollängen-PrP verhindern könnte. Um eine effiziente Sekretion der N-terminalen Domäne zu erreichen, wurde die Eigenschaft von Fc-Fusionsproteinen genutzt. Die PrP/Fc-Fusionsproteine enthielten entweder den isolierten N-Terminus (AS 1-120; N.PrP/Fc), den C-Terminus (AS 90-231; PrP.C/Fc) oder die ER-Signalsequenz von PrP^C (SS/Fc), fusioniert mit einem Fc-Teil des humanen IgG₁ Antikörpers (Abb. 29A). Um die Sekretion der Fc-Konstrukte zu untersuchen, wurden N2a Zellen mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert. Die Western Blot Analyse der Proteine im Zelllysat (L) und im Medium (M) zeigte, dass alle Fc-Konstrukte effizient exprimiert und in das Medium sekretiert werden (Abb. 29B). Demnach stellen sie eine Möglichkeit dar, das inhibitorische Potential der N-terminalen Domäne zu untersuchen.

Zunächst wurde analysiert, ob N.PrP/Fc mit dem β -Peptid interagiert. Hierfür wurde das konditionierte Medium von PrP/Fc-exprimierenden N2a Zellen mit dem β -Peptid (50 nM) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die PrP/Fc-Proteine mit Hilfe von Protein A-Sepharose-Kügelchen aufgereinigt und anschließend mittels Western Blot untersucht (Abb. 29C). Die Analyse zeigte, dass das β -Peptid an die N-terminale Domäne des N.PrP/Fc-Proteins bindet. Diese Interaktion ist spezifisch für den N-Terminus von PrP, da keine Bindung zwischen dem β -Peptid und dem Fc-Protein (SS/Fc) detektierbar war. Im Vergleich zu N.PrP/Fc band das β -Peptid im geringeren Ausmaß an das PrP.C/Fc-Protein. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass PrP.C/Fc einen Teil der N-terminalen Domäne von PrP^C enthält (AS 95 bis 110), der als Bindungsstelle von A β bestimmt wurde (Lauren et al. 2009).

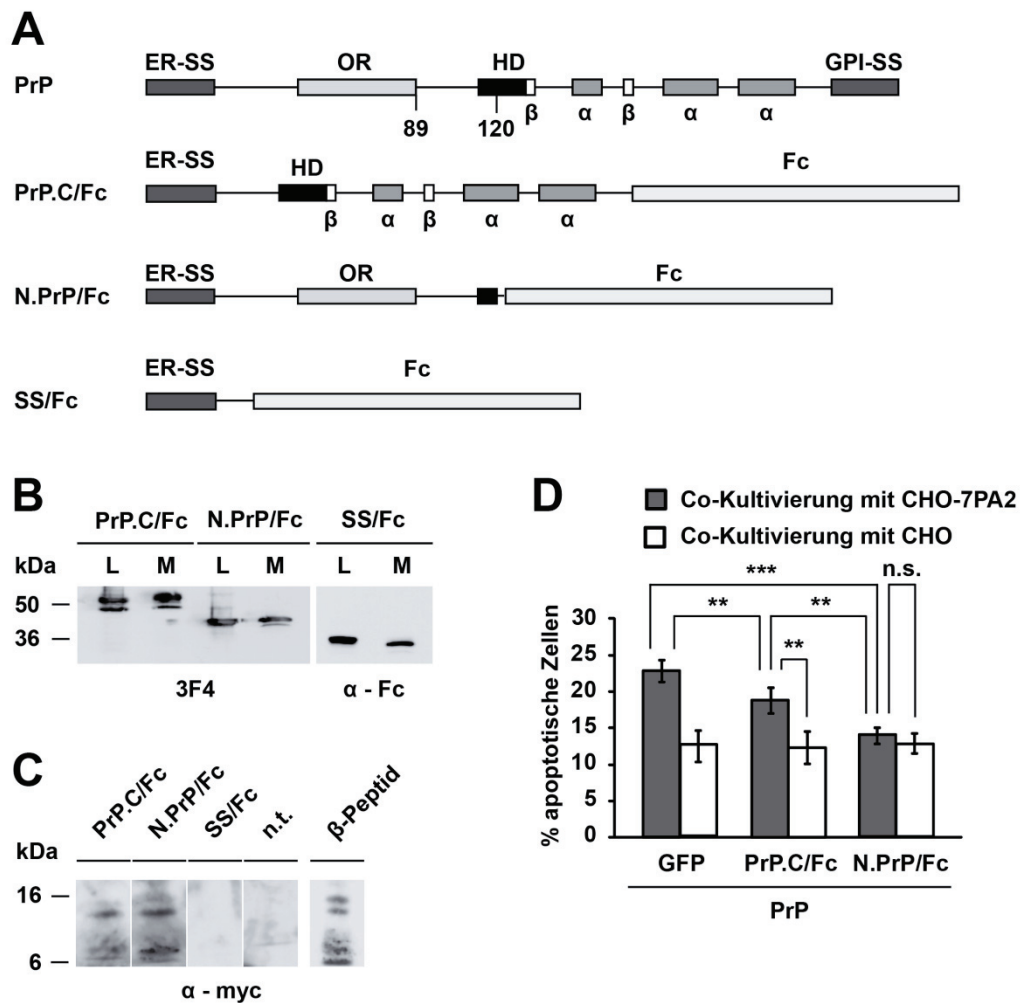


Abb. 29. Eine sekretierte Version der N-terminalen Domäne von PrP^C interagiert mit dem β-Peptid und verhindert die toxische Aktivität von Aβ.

(A) Schematische Darstellung von PrP und der verwendeten PrP/Fc Fusionskonstrukte. PrP, Wildtyp-Prion-Protein; PrP.C/Fc, C-terminale Domäne (AS 90-231) verbunden mit einem Fc-Teil des humanen IgG₁; N.PrP/Fc, N-terminale Domäne (AS 1-120) verbunden mit dem Fc-Teil; SS/Fc, ER-Signalsequenz von PrP verbunden mit dem Fc-Teil; ER-SS, ER-Signalsequenz; OR, Octarepeat-Region; HD, Hydrophobe Domäne; α, alpha-helikale Domäne; β, beta-Strang; GPI-SS, GPI-Signalsequenz. (B) Die PrP/Fc-Konstrukte werden exprimiert und in das Medium sekretiert. N2a Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Die Proteine im Zelllysat (L) und im Medium (M) wurden mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörpers 3F4 oder eines anti-Mensch IgG Antikörpers analysiert. (C) Die N-terminale Domäne von PrP^C interagiert mit dem β-Peptid. Das konditionierte Medium PrP/Fc-exprimierender N2a Zellen wurden mit dem β-Peptid (50 nM) für 3 h bei 4°C inkubiert. PrP/Fc-Proteine wurden mit Protein A-Sepharose aufgereinigt und mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-Myc Antikörpers 4A6 analysiert. (D) Eine sekretierte Version der N-terminalen Domäne von PrP^C interferiert mit der toxischen Aktivität von Aβ. Die mit den angegebenen Konstrukten transfizierten SH-SY5Y Zellen wurden mit CHO-7PA2 oder CHO Zellen co-kultiviert. Nach 16 h Co-Kultivierung wurde die

Apoptoserate, wie unter Abb. 18 beschrieben, analysiert. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt. n.s., nicht-signifikant; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$.

Nachdem die Bindung des β -Peptids an das sekretierte N.PrP/Fc gezeigt wurde, konnte der Frage nachgegangen werden, ob diese Bindung den toxischen Effekt von A β verhindern kann. Zu diesem Zweck wurden SH-SY5Y Zellen mit PrP^C und den angegebenen Fc-Konstrukten co-transfiziert und mit CHO-7PA2 oder CHO Zellen co-kultiviert. Nach 16 h Co-Kultivierung wurden die SH-SY5Y Zellen fixiert, permeabilisiert und die aktive Caspase 3 gefärbt. SH-SY5Y Zellen, die PrP^C und PrP.C/Fc exprimierten, zeigten nach der Co-Kultivierung mit CHO-7PA2 Zellen im Vergleich zu den mit CHO Zellen co-kultivierten SH-SY5Y Zellen eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate (etwa 19%) (Abb. 29D). PrP^C-exprimierende SH-SY5Y Zellen, die N.PrP/Fc in das Medium sekretierten, wiesen nach der Co-Kultivierung mit CHO-7PA2 Zellen eine reduzierte Apoptoserate von etwa 12,5% auf. Im Vergleich zu den mit CHO Zellen-co-kultivierten, N.PrP/Fc-exprimierenden SH-SY5Y Zellen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Zusammenfassend haben die Untersuchungen ergeben, dass die sekretierte Version der N-terminalen Domäne von PrP^C das β -Peptid binden und mit der A β -induzierten Toxizität interferieren kann. Demnach ist der N-Terminus von PrP^C in der Lage, die Interaktion mit β -Faltblatt-reichen Proteinen zu vermitteln.

2.2.6.2 Ein Oligomer-spezifischer Antikörper kann die toxische Aktivität von PrP^{Sc} und A β Oligomeren verhindern

Da die β -Faltblatt-reiche Konformation ausschlaggebend für die toxische Aktivität der untersuchten Proteine ist, stellte sich die Frage, ob ein Antikörper, der gegen β -Faltblatt-reiche Oligomere gerichtet ist, ebenfalls die Toxizität verhindern kann. Um dieser Frage nachzugehen, machten wir uns einen Oligomer-spezifischen Antikörper zunutze, der bereits in einer vorherigen Studie charakterisiert worden war (Kayed et al. 2003). Der Studie zufolge erkennt der Antikörper A11 spezifisch lösliche Oligomere und kann dadurch deren Toxizität *in vitro* inhibieren. Die Bindung des Antikörpers wird auf die gemeinsame Struktur

der löslichen Oligomere zurückgeführt. Interessanterweise wurde bereits in dieser Studie auf potentiell gleiche Mechanismen der durch lösliche Oligomere induzierten Toxizität hingewiesen. Um diesen Ansatz weiter zu verfolgen, wurde die Co-Kultivierung der SH-SY5Y Zellen mit ScN2a oder N2a oder CHO-7PA2 oder CHO Zellen in Anwesenheit des Antikörpers A11 durchgeführt. Parallel dazu wurden co-kultivierte Zellen mit Kontrollserum inkubiert. Nach der Co-Kultivierung wurde die Apoptoserate mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. SH-SY5Y Zellen, die in Abwesenheit von dem Antikörper A11 mit ScN2a Zellen co-kultiviert wurden, zeigten eine Apoptoserate von etwa 18%. Im Vergleich dazu wiesen die SH-SY5Y Zellen, bei deren Co-Kultivierung der A11 präsent war, eine signifikante Reduktion der Apoptoserate auf (etwa 12%) (Abb. 30A). Dieser protektive Effekt des Antikörpers konnte ebenfalls bei der Co-Kultivierung mit den CHO-7PA2 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 30B). So zeigten SH-SY5Y Zellen die in Anwesenheit von dem Antikörper mit CHO-7PA2 Zellen co-kultiviert wurden, eine signifikant verminderte Apoptoserate.

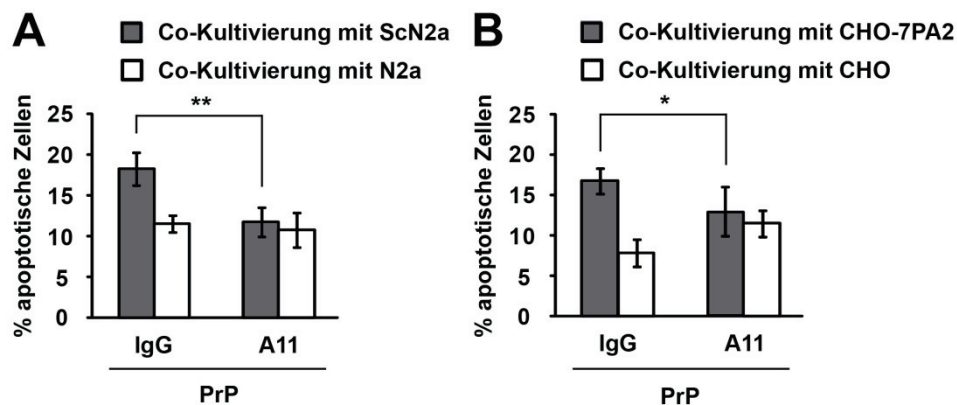


Abb. 30. Der Oligomer-spezifische Antikörper A11 kann die toxischen Aktivitäten von PrP^{Sc} und A β verhindern.

(A, B) PrP^C-exprimierende SH-SY5Y Zellen wurden mit ScN2a oder N2a (A) oder CHO-7PA2 oder CHO (B) in Gegenwart des Oligomer-spezifischen Antikörpers A11 (1 μ g/ml) oder eines Kontrollserums (IgG) co-kultiviert. Nach 16 h Co-Kultivierung wurde die Apoptoserate, wie unter Abb. 18 beschrieben, analysiert. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt. * p < 0,05; ** p < 0,005.

Die dargelegten Resultate zeigen, dass der Oligomer-spezifische Antikörper A11 die toxische Aktivität von PrP^{Sc} und A β verhindern kann. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass β -Faltblatt-reiche Oligomere aufgrund ihrer gemeinsamen Struktur, von PrP^C gebunden werden können und dadurch toxische Signale auslösen.

2.2.6.3 Ein NMDA-Rezeptor-Antagonist kann die Übermittlung toxischer Signale über PrP^C verhindern

Da PrP^C über einen GPI-Anker in der äußeren Lipidschicht der Plasmamembran verankert ist, würde es einen potentiellen Kofaktor benötigen, der Signale durch die Plasmamembran in die Zelle übermitteln kann (Paulick and Bertozzi 2008). Ein potentieller Faktor stellt der NMDA-Rezeptor dar, der bereits in Zusammenhang mit PrP^C gebracht wurde (vgl. Abschnitt 1.3.4). So konnte nachgewiesen werden, dass PrP^C durch Modulation des NMDA-Rezeptors exzitotoxische Effekte abschwächt (Khosravani et al. 2008), wobei diese protektive Aktivität offensichtlich in Anwesenheit von A β gestört wird (You et al. 2012; Stys et al. 2012). Des Weiteren konnte die PrP^{Sc}-induzierte Toxizität von einem NMDA-Rezeptor-Antagonisten verhindert werden (Muller et al. 1993). Da der NMDA-Rezeptor ebenfalls bei der Übermittlung der A β -induzierten Toxizität eine wesentliche Rolle spielt (Ondrejcek et al. 2010), stellte sich die Frage, ob NMDA-Rezeptor-Antagonisten allgemein toxische Aktivitäten von β -Faltblatt-reichen Proteinen verhindern können.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden PrP^C-exprimierende SH-SY5Y Zellen in Anwesenheit oder Abwesenheit von dem NMDA-Rezeptor-Antagonisten Memantin mit ScN2a oder CHO-7PA2 Zellen co-kultiviert oder mit dem β -Peptid inkubiert. Um eine adäquate Wirkung von Memantin zu gewährleisten, wurden die SH-SY5Y Zellen 1 h vor und während der Co-Kultivierung beziehungsweise Inkubation mit Memantin behandelt (Endkonzentration 10 μ M). Die Behandlung mit Memantin hatte weder einen Einfluss auf die PrP^C-Expressionsmenge in SH-SY5Y Zellen (Abb. 31A) noch auf die A β -Menge im konditionierten Medium (Abb. 31B).

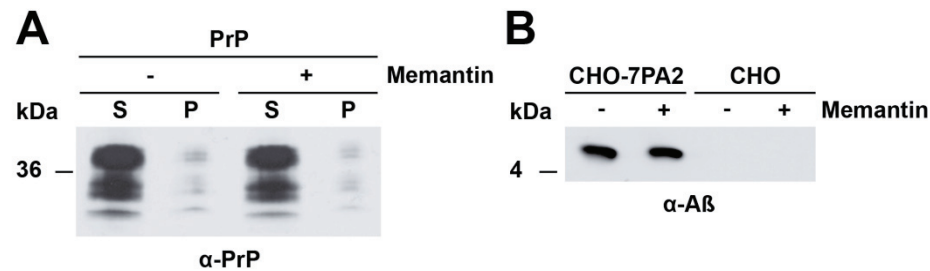


Abb. 31. Der NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin hat keinen Einfluss auf die PrP^C-Expression oder Aβ-Menge im Medium.

(A) Die PrP^C-Expressionsmenge und dessen Löslichkeit werden nicht durch die Behandlung mit Memantin beeinflusst. PrP^C-exprimierende SH-SY5Y Zellen wurden mit Memantin (Endkonzentration 10 μM) für 17 h inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen geerntet, lysiert und mittels Zentrifugation in eine lösliche (S) und unlösliche Fraktion (P) geteilt. Die Proteine in den Fraktionen wurden mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörpers 3F4 analysiert. (B) Die Sekretion von Aβ in das Medium der CHO-7PA2 Zellen wird durch Memantin nicht beeinflusst. CHO-7PA2 oder CHO Zellen wurden für 16 h mit Memantin inkubiert. Das in das Medium sekretierte Aβ wurde mittels Immunpräzipitation und anschließender Western Blot Analyse bestimmt.

Nach der Co-Kultivierung wurde die Apoptoserate der SH-SY5Y Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. SH-SY5Y Zellen, die in Abwesenheit von Memantin mit ScN2a Zellen co-kultiviert wurden, zeigten eine Apoptoserate von etwa 17,5%. Im Vergleich dazu wiesen die SH-SY5Y Zellen, bei deren Co-Kultivierung Memantin präsent war, eine signifikante Reduktion der Apoptoserate auf (etwa 12,5%) (Abb. 32A). Analog zu der PrP^{Sc}-Exposition wurde die Co-Kultivierung mit CHO-7PA2 Zellen in Anwesenheit von Memantin durchgeführt. Die Inkubation mit Memantin führte bei der Co-Kultivierung mit CHO-7PA2 Zellen zu einer reduzierten Apoptoserate (etwa 11%) (Abb. 32B). Der protektive Effekt von Memantin konnte ebenfalls bei SH-SY5Y Zellen, die mit dem β-Peptid in Anwesenheit von Memantin inkubiert wurden, gezeigt werden. So wiesen diese im Vergleich zu den Zellen, die ohne Memantin mit dem β-Peptid inkubiert wurden, eine signifikante Abnahme der Apoptoserate auf (etwa 10%) (Abb. 32C).

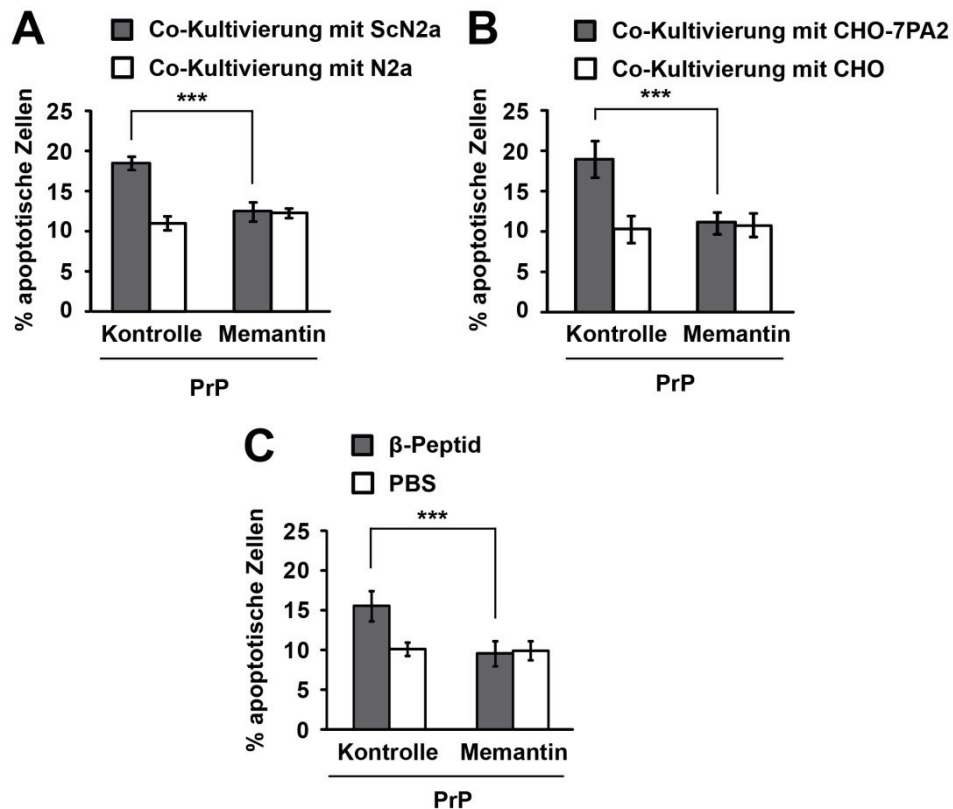


Abb. 32. Ein NMDA-Rezeptor-Antagonist kann die toxischen Signale von PrP^{Sc}, A β und dem β -Peptid verhindern.

PrP^C-exprimierende SH-SY5Y Zellen wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von Memantinin (Endkonzentration 10 μ M) mit ScN2a Zellen (**A**) oder CHO-7PA2 Zellen (**B**) für 16 h co-kultiviert oder mit dem β -Peptid (Endkonzentration 200 nM) für 12 h inkubiert (**C**). Die Apoptoserate wurde, wie unter Abb. 18 beschrieben, analysiert. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt.

*** p < 0,0005.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass der NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantinin die PrP^C-vermittelten, toxischen Aktivitäten von PrP^{Sc}, A β und dem β -Peptid verhindern kann. Diese Daten weisen darauf hin, dass der NMDA-Rezeptor ein potentieller Kofaktor von PrP^C sein könnte.

2.2.7 Zusammenfassung

Die Ausbildung β -Faltblatt-reicher Konformere ist ein charakteristisches Merkmal verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen wie der Prion-Erkrankungen oder AD. Im Bereich der Prion-Erkrankungen haben vorangegangene Studien gezeigt, dass das GPI-verankerte PrP^C die toxische Aktivität seiner fehlgefalteten Isoform PrP^{Sc} übermittelt und somit als Rezeptor von PrP^{Sc} fungiert (Mallucci et al. 2003; Brandner et al. 1996; Chesebro et al. 2005; Rambold et al. 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit Hilfe eines neuartigen Zellkulturmodells umfangreiche Analysen bezüglich der Übermittlung toxischer Signale via PrP^C durchgeführt werden. Hierbei war unter anderem die Identifizierung weiterer Liganden von PrP^C, die toxische Signale über PrP^C auslösen können, von besonderem Interesse. Zudem ermöglichten verschiedene Ansätze Erkenntnisse in Bezug auf die zugrunde liegenden Mechanismen zu erlangen.

Die in dieser Arbeit dargelegten Daten haben gezeigt, dass PrP^C die Eigenschaft hat, toxische Aktivitäten von β -Faltblatt-reichen Proteinen unterschiedlichen Ursprungs zu vermitteln. So konnten heterologes PrP^{Sc}, sekretiertes A β oder niedermolekulares, synthetisiertes A β 42, Oligomere eines Hefepriion-Proteins sowie ein *de novo* entworfenes β -Peptid, toxische Effekte über einen PrP^C-abhängigen Signalweg induzieren. Anhand primärer kortikaler Neuronen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Neben der Lebensfähigkeit der Neuronen wurden die Länge der Dendriten sowie die mitochondriale Integrität durch PrP^{Sc} und dem β -Peptid PrP^C-abhängig gestört. Überdies konnte dargelegt werden, dass die unstrukturierte N-terminale Domäne und der C-terminale GPI-Anker von PrP^C für die Übermittlung der toxischen Aktivität essentiell sind. Verschiedene Ansätze zeigten, dass der unstrukturierte N-Terminus von PrP^C offensichtlich die Bindung zu β -Faltblatt-reichen Konformeren vermittelt. Zudem wurden Ansätze gegen die toxischen Effekte von β -Faltblatt-reichen Proteinen näher betrachtet. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine sekretierte Version der unstrukturierten N-terminalen Domäne von PrP^C die Konformere bindet und dadurch die Interaktion mit PrP^{Sc} verhindert. Dieser protektive Effekt konnte auch durch einen Oligomer-spezifischen Antikörper erzielt werden. Neben dem löslichen N-Terminus und dem Antikörper interferierte der NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin mit den PrP^C-abhängigen toxischen Effekten der β -Faltblatt-reichen Proteine. Dies deutet darauf hin, dass der NMDA-Rezeptor ein Kofaktor von PrP^C ist.

2.3 Teil 3 – Die Hitzeschock-Antwort wird von dem Scrapie-Prion-Protein und Amyloid β moduliert und greift in deren toxische Aktivität ein

Die Hitzeschock-Antwort (HSR) ist ein hochkonservierter Mechanismus, der als Reaktion auf proteotoxischen Stress und fehlgefaltete Proteine induziert wird. Prion-Erkrankungen oder Alzheimer-Krankheit sind durch das fehlgefaltete Protein PrP^{Sc} beziehungsweise A β charakterisiert. Interessanterweise haben Studien in Tier- und Zellkulturmodellen ergeben, dass die HSR und molekulare Chaperone protektiv gegen toxische Effekte wirken können, die mit den oben genannten Erkrankungen assoziiert sind. So konnten Lindquist und Kollegen anhand einer Hitzeschock-Faktor 1 (HSF1)-*Knockout*-Mauslinie demonstrieren, dass die Lebensdauer von Prion-infizierten Mäusen durch den HSF1 verlängert wird (Steele et al. 2008). Zudem deuten *in vitro*-Experimente darauf hin, dass die Expression von Hsps, insbesondere die von Hsp70, das Fortschreiten der AD verzögert (Magrane et al. 2004; Evans et al. 2006; Kumar et al. 2007; Kakimura et al. 2002). Dies wurde anhand eines AD-Mausmodells bestätigt, in dem die Überexpression von Hsp70 den pathologischen Phänotyp und die kognitiven Defizite abschwächte (Hoshino et al. 2011). Diese und andere Daten weisen darauf hin, dass die HSR eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Prion-Erkrankungen und der AD spielen könnten. Aus diesem Grund wurde im dritten Teil der Arbeit die Modulation der HSR durch PrP^{Sc} oder A β untersucht. Des Weiteren wurde der Effekt einer induzierten HSR oder der Expression individueller Chaperone auf die toxische Aktivität von PrP^{Sc}, A β und einer PrP-Mutante analysiert.

2.3.1 Modulation der Hitzeschock-Antwort durch akute oder chronische PrP^{Sc}- oder A β -Exposition

2.3.1.1 Die chronische PrP^{Sc}- oder A β -Exposition führt zu einer gestörten Hitzeschock-Antwort

Die Scrapie-infizierte, murine Neuroblastomzelllinie (ScN2a) zeichnet sich im Gegensatz zu nicht-infizierten Neuroblastomzellen (N2a) durch die Propagierung infektiöser Prionen (Butler et al. 1988) und Akkumulation von Proteinase K (PK)-resistentem Material (PrP^{Sc}) aus (Tatzelt et al. 1996). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass der Schwellenwert für die Induktion einer HSR der

chronisch-infizierten ScN2a Zellen erhöht ist (Tatzelt et al. 1995; Winklhofer et al. 2001). Das Ausmaß der HSR wurde anhand der Hsp72-Expressionsmengen bestimmt. Im Gegensatz zu vielen Hsps, die unter normalen Bedingungen konstitutiv exprimiert werden, findet die Expression des Hsp72 hauptsächlich nach Hitzeschock statt (Lindquist and Craig 1988). Folglich kann man anhand der Hsp72-Mengen auf die Intensität der HSR schließen. Aufgrund des Befundes, dass die HSR in ScN2a Zellen dereguliert ist, stellte sich die Frage, ob Zellen, die chronisch A β ausgesetzt werden, ebenfalls eine veränderte HSR aufweisen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zunächst die oben genannten Daten der ScN2a Zellen bestätigt und anschließend die HSR der A β -sekretierenden CHO-7PA2 Zellen untersucht.

Um die Induktion der HSR in ScN2a und N2a Zellen zu analysieren, wurden sie verschiedenen Hitzeschocks (42°C oder 44°C; 10 oder 20 min) ausgesetzt, auf 37°C zurückgebracht und weitere 16 h inkubiert. Als Kontrolle wurden parallel ScN2a und N2a Zellen durchgehend bei 37°C kultiviert. Nach Inkubation wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot analysiert (Abb. 33A). Die N2a Zellen zeigten mit steigenden Hitzeschock-Temperaturen und -Dauer zunehmende Hsp72-Mengen. Dieser Anstieg konnte jedoch nicht bei den ScN2a Zellen detektiert werden. Um dieses Ergebnis anhand einer alternativen Methode zu bestätigen, wurden die Zellen 16 h nach dem Hitzeschock mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Mit steigenden Temperaturen und längerem Hitzeschock nahm die Anzahl der Hsp72-positiven N2a Zellen zu, wohingegen bei den ScN2a Zellen kein Signal nachweisbar war (Abb. 33B). Diese Daten bestätigten die bereits oben erwähnten Studien (Tatzelt et al. 1995; Winklhofer et al. 2001).

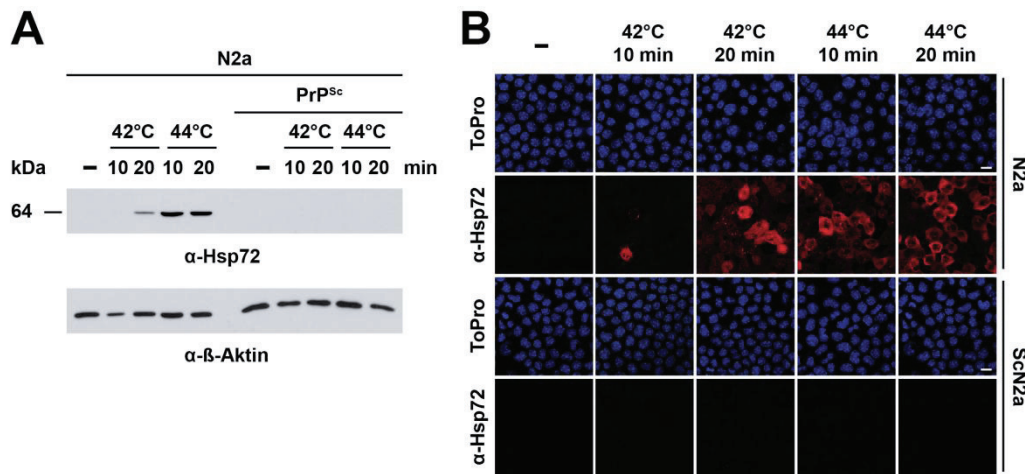


Abb. 33. Die HSR wird durch chronische PrP^{Sc}-Exposition dereguliert.

(A, B) N2a oder ScN2a Zellen wurden den angegebenen Hitzeschocks ausgesetzt, auf 37°C zurückgebracht und weitere 16 h kultiviert. Durchgehend bei 37°C kultivierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Expressionsmengen von Hsp72 wurden mittels Western Blot (A) oder indirekter Immunfluoreszenz (B) analysiert. (A) Die Zellen wurden geerntet und in eiskalten Lysepuffer A lysiert. Die Proteine im Zelllysate wurden unter Verwendung des monoklonalen anti-Hsp72 Antikörpers C92 analysiert. Aktin diente als Ladungskontrolle. (B) Die Zellen wurden fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und unter Verwendung des Antikörpers C92 auf Hsp72 analysiert. Die Kerne wurden mit ToPro gefärbt. Maßstab 10 µM.

Um den Effekt einer chronischen Exposition zu einem anderen pathogenen, β-Faltblatt-reichen Konformer zu untersuchen, wurde in den folgenden Schritten die HSR der CHO-7PA2 Zelllinie untersucht, die Aβ generiert und in das Medium abgibt. Es handelt sich um CHO Zellen (engl. *Chinese hamster ovary cells*), die stabil mit einer familiären AD Mutante V717F des Amyloid-Vorläufer-Proteins transfiziert worden sind (Podlisny et al. 1995). Wie bereits in einem vorherigen Abschnitt dargestellt wurde, unterbricht das ins Medium sekretierte Aβ nach intrazerebraler Injektion die Langzeit-Potenzierung (LTP) (Walsh et al. 2002) und beeinträchtigt das Lernverhalten von Ratten (Cleary et al. 2005) (vgl. Abschnitt 2.2.2).

Um die Induktion der HSR in CHO und CHO-7PA2 Zellen zu analysieren, wurden diese den angegebenen Hitzeschocks ausgesetzt, auf 37°C zurückgebracht und anschließend weitere 8 h kultiviert. Nach Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Hsp72-Mengen mittels Western Blot analysiert (Abb. 34A). Die Intensitäten der Hsp72-Banden wurden mit Hilfe eines ChemiDot Imagers quantifiziert und

auf β -Aktin normalisiert. Die Werte der CHO-7PA2 Zellen wurden innerhalb eines Versuchs auf die Werte der gleichbehandelten CHO Zellen bezogen. Die Quantifizierung von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten zeigt, dass bei 10-minütigem Hitzeschock (42°C und 44°C) die Expression von Hsp72 in CHO-7PA2 Zellen im Vergleich zu den CHO Zellen signifikant niedriger ist. Werden die CHO-7PA2 Zellen einem längeren Hitzeschock ausgesetzt, weisen sie keinen signifikanten Unterschied zu den CHO Zellen auf.

Um dieses Ergebnis anhand einer alternativen Methode zu bestätigen, wurden die Zellen 8 h nach dem Hitzeschock mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Mit steigenden Temperaturen und längerem Hitzeschock nahm die Anzahl der Hsp72-positiven CHO-7PA2 Zellen zu. Jedoch war dies im Vergleich zu den CHO Zellen bei 10-minütigem Hitzeschock (42°C und 44°C) deutlich schwächer ausgeprägt (Abb. 34B).

Beide Analysemethoden zeigen, dass die CHO-7PA2 Zellen im Vergleich zu CHO Zellen bei kurzem Hitzeschock eine verringerte Hsp72-Expression aufweisen. Dies lässt auf eine verminderte Aktivierung der HSR schließen. Unter stärkeren Hitzeschock-Bedingungen konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Zelllinien detektiert werden.

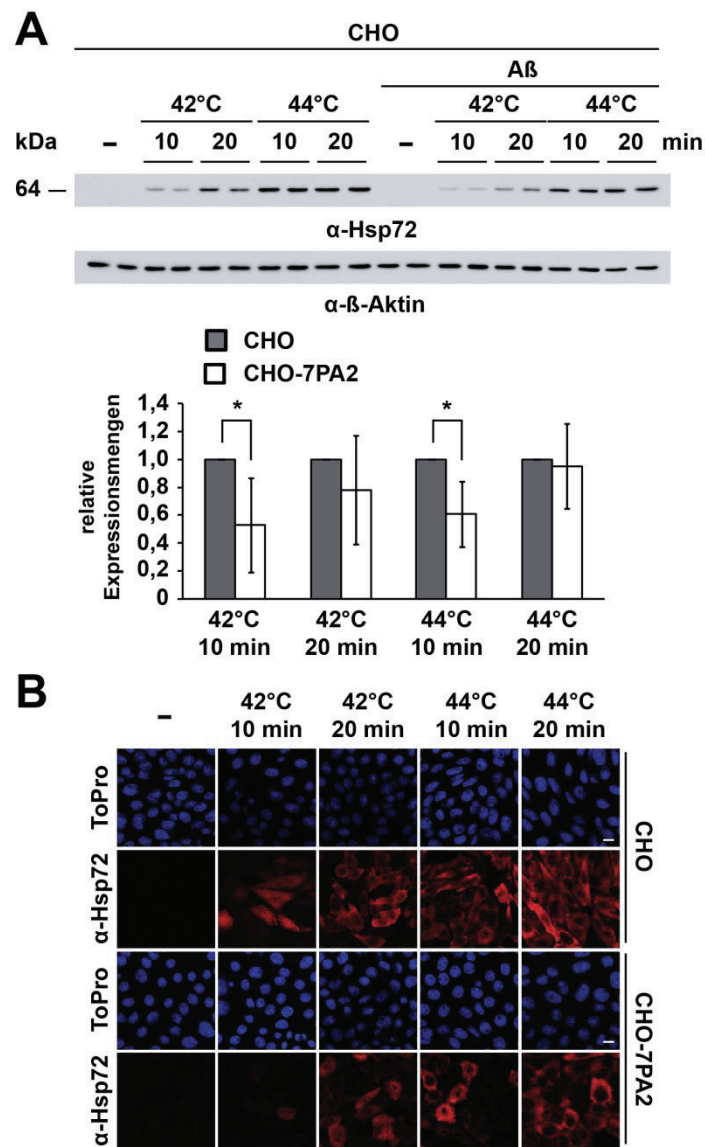


Abb. 34. Eine chronische Aβ-Exposition moduliert die HSR.

(A, B) CHO oder CHO-7PA2 Zellen wurden den angegebenen Hitzeschocks ausgesetzt, auf 37°C zurückgebracht und weitere 8 h kultiviert. Durchgehend bei 37°C kultivierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Expressionsmengen von Hsp72 wurden mittels Western Blot (A) oder indirekter Immunfluoreszenz (B), wie unter Abb. 33 beschrieben, analysiert. Die Intensitäten der Hsp72-Banden wurden mit Hilfe eines ChemiDot Imagers quantifiziert und auf die β-Aktin-Menge normalisiert. Gezeigt werden die Werte der CHO-7PA2 Zellen bezogen auf die der CHO Zellen. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt. * p < 0,05. Maßstab 10 μM.

Im nächsten Schritt stellten wir uns die Frage, was der Grund für die modulierte HSR sein könnte. Zum einen könnte es auf eine Mutation in der Promotorregion des Hsp72-Gens zurückzuführen sein. Zum anderen wäre es möglich, dass der komplexe Aktivierungs-/Deaktivierungsmechanismus des Transkriptionsfaktors HSF1 dereguliert ist. Um diese Frage zu adressieren, wurden die CHO-7PA2, CHO, ScN2a und N2a Zellen mit einer konstitutiv aktiven Mutante des HSF1 (Δ HSF), die eine Deletion in der regulatorischen Domäne aufweist (Δ 202-316), oder Wildtyp-HSF (wtHSF) transfiziert. Die Hsp72-Expressionsmengen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Die Expression der konstitutiv aktiven HSF1-Mutante induzierte in allen Zelllinien die Expression von Hsp72, wohingegen die Expression des wtHSF-Konstrukts zu keinem Anstieg der Hsp72-Menge führte (Abb. 35). Somit ist der transfizierte Hitzeschock-Faktor in der Lage, die Transkription des Hsp72-Gens zu modulieren. Dies weist darauf hin, dass die gestörte Hsp72-Expression auf eine Deregulierung des Aktivierungs-/Deaktivierungsmechanismus des HSF1 und nicht auf eine Mutation in der Promotorregion des Hsp-Gens zurückzuführen ist.

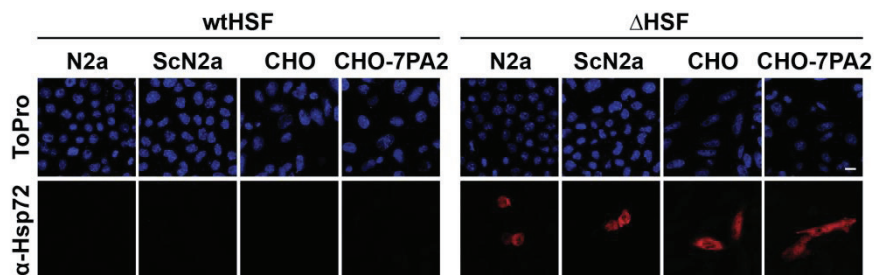


Abb. 35. Die Expression einer konstitutiv aktiven Mutante des HSF1 induziert die Expression von Hsp72 in ScN2a und CHO-7PA2 Zellen.

N2a, ScN2a, CHO und CHO-7PA2 Zellen wurden mit einer konstitutiv aktiven Mutante des HSF1 (Δ HSF) (Δ 202-316) oder Wildtyp-HSF (wtHSF) transient transfiziert. 20 h nach Transfektion wurde die Expression von Hsp72 mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des monoklonalen anti-Hsp72 Antikörpers C92 analysiert. Der Kern wurde mit ToPro gefärbt. Maßstab 10 μ M.

Zusammenfassend zeigen die dargelegten Ergebnisse, dass die Intensität der Hsp72-Expression nach Hitzeschock bei den ScN2a und CHO-7PA2 Zellen verringert ist. Demnach scheint der Schwellenwert, um eine HSR zu induzieren, in PrP^{Sc}- oder A β -exponierten Zellen erhöht zu sein. Zudem deuten die Daten darauf hin, dass die gestörte Hsp72-Expression auf eine Deregulierung des

Aktivierungs-/Deaktivierungsmechanismus von HSF1 und nicht auf eine Mutation in der Promotorregion des Hsp-Gens zurückzuführen ist. Da es sich hierbei um etablierte Zelllinien handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Modifikation der HSR ein mutationsbedingter Effekt ist, der im Laufe der langen Kultivierung der Zellen entstanden ist. Es ist jedoch interessant, dass zwei unabhängige Zelllinien, die verschiedene pathogene Proteinkonformere vermehren beziehungsweise generieren, die gleiche Tendenz aufweisen. Im Folgenden stellten wir uns die Frage, wie sich eine akute PrP^{Sc}-Exposition auf die HSR auswirkt.

2.3.1.2 Eine akute PrP^{Sc}-Exposition senkt den Schwellenwert der Hitzeschock-Antwort

Um den Effekt einer akuten PrP^{Sc}-Exposition auf die HSR zu untersuchen, nutzten wir ein neuartiges Zellkulturmodell, das bereits unter Abschnitt 2.1.2.1 beschrieben wurde. Dieses Zellsystem macht es möglich, naive Zellen kurzfristig mit PrP^{Sc} zu exponieren, indem SH-SY5Y Zellen mit den ScN2a co-kultiviert werden. Für die Analyse der HSR wurde ein Luziferase-Modell gewählt, das eine Quantifizierung der HSR mittels Luminometer ermöglicht. Hierzu wurden die SH-SY5Y Zellen mit einem Reporter-gen-Konstrukt (HSE-Luc) transfiziert, das die Luziferase des Leuchtkäfers unter der Kontrolle des Hitze-induzierbaren Promotors des humanen Hsp70B Gens exprimiert (Voellmy et al. 1985). Wie bereits in einem vorherigen Abschnitt dargestellt wurde, zeigen die verwendeten SH-SY5Y Zellen aufgrund geringer, endogener PrP^C-Expressionsmengen nach der Co-Kultivierung mit den ScN2a Zellen keine erhöhte Apoptoserate (vgl. Abschnitt 2.2.1.2). Folglich sind die möglichen Effekte auf die HSR und nicht auf Zytotoxizität zurückzuführen.

Um die Funktionalität des HSE-Luc-Konstrukts in SH-SY5Y Zellen nach mildem Hitzeschock (42°C, 10 oder 20 min) zu überprüfen, wurden diese mit dem Konstrukt transfiziert und 16 h kultiviert. Nach erfolgtem Hitzeschock und weiteren 8 h in Kultur, wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Luziferase-Aktivität im Zelllysate wurde anhand eines Luminometers bestimmt (Abb. 36A). Im Vergleich zu SH-SY5Y Zellen, die keinem Hitzeschock ausgesetzt wurden, zeigen SH-SY5Y Zellen mit steigender Hitzeschock-Dauer einen signifikanten Anstieg der Luziferase-Aktivität. Da diese mit der Intensität der HSR einhergeht,

stellt dieses System eine einfache und sehr sensitive Möglichkeit dar, das Ausmaß der HSR in SH-SY5Y Zellen zu bestimmen.

Als nächstes haben wir mit Hilfe des Co-Kultivierungsmodells die Auswirkungen einer akuten PrP^{Sc}-Exposition auf die HSR der SH-SY5Y Zellen untersucht. Hierfür wurden die SH-SY5Y Zellen mit dem HSE-Luc-Konstrukt transfiziert und mit ScN2a oder N2a Zellen co-kultiviert. Nach 24 h Co-Kultivierung wurde die Luziferase-Aktivität im Gesamtlysat luminometrisch bestimmt. Im Vergleich zu den mit N2a Zellen-co-kultivierten SH-SY5Y Zellen führte die PrP^{Sc}-Exposition per se zu keiner gesteigerten Luziferase-Aktivität (Abb. 36B). Dies deutet darauf hin, dass eine 24-stündige Exposition zu PrP^{Sc} offensichtlich keinen Stress auslöst.

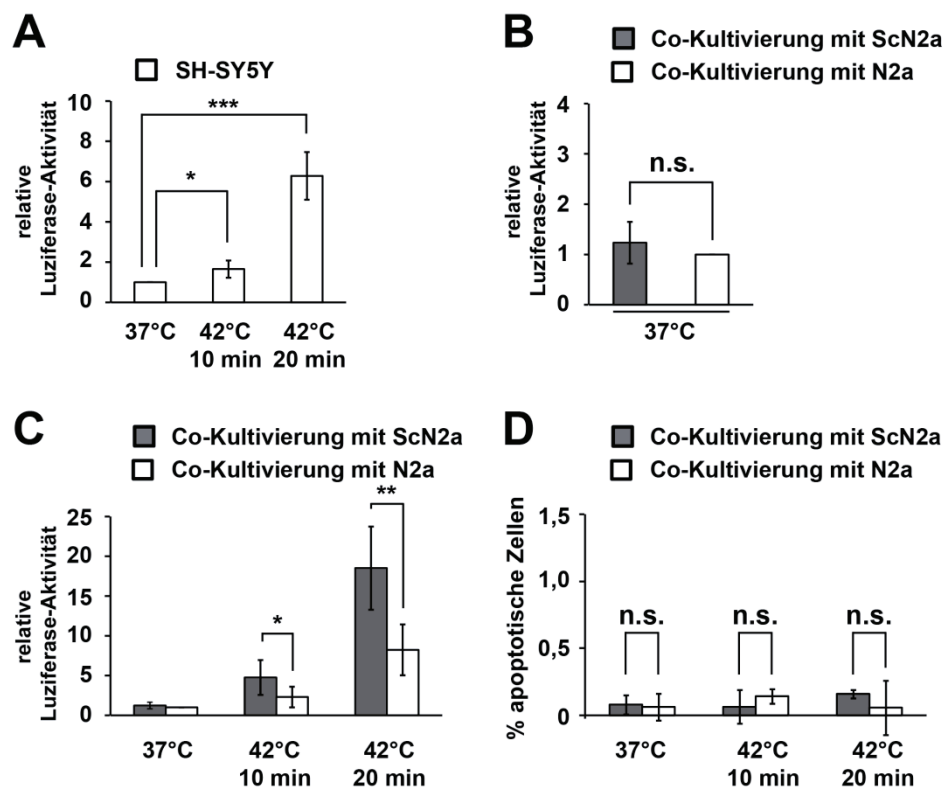


Abb. 36. Die akute PrP^{Sc}-Exposition senkt den Schwellenwert für die Aktivierung der HSR.

(A-C) SH-SY5Y Zellen wurden mit einem Reporter-gen-Konstrukt (HSE-Luc), das die Luziferase des Leuchtkäfers unter der Kontrolle des Hitze-induzierbaren Promotors des humanen Hsp70B Gens exprimiert, transfiziert. Die Luziferase-Aktivität der Zelllysate wurde mit Hilfe eines Luminometers analysiert. (A) Die Bestimmung der Luziferase-Aktivität stellt ein System zur Analyse der HSR dar. 18 h nach Transfektion wurden die SH-SY5Y Zellen dem angegebenen

Hitzeschock ausgesetzt, auf 37°C zurückgebracht und weitere 8 h kultiviert. Die Luziferase-Aktivität der konstant bei 37°C kultivierten SH-SY5Y Zellen wurde auf 1 gesetzt. **(B)** Die akute PrP^{Sc}-Exposition führt zu keiner Induktion der HSR. Nach 24 h Co-Kultivierung bei 37°C wurde die Luziferase Aktivität bestimmt. Die Luziferase-Aktivität der mit N2a Zellen-co-kultivierten SH-SY5Y Zellen wurde auf 1 gesetzt. **(C)** SH-SY5Y Zellen werden durch akute PrP^{Sc}-Exposition für einen Hitzeschock sensibilisiert. Nach 16 h Co-Kultivierung wurde der Hitzeschock, wie unter Abb. 36A beschrieben, durchgeführt. Die Luziferase-Aktivität der konstant bei 37°C und mit N2a Zellen-co-kultivierten SH-SY5Y Zellen wurde auf 1 gesetzt. **(D)** Der Hitzeschock ist für SH-SY5Y Zellen nicht toxisch. Die Apoptoserate wurde, wie unter Abb. 18 beschrieben, analysiert. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt. n.s., nicht-signifikant; * p < 0,05; ** p < 0,005; *** p < 0,0005.

Im nächsten Schritt stellte sich die Frage, ob sich die Intensitäten der HSR von SH-SY5Y Zellen, die mit ScN2a oder N2a Zellen-co-kultiviert wurden, nach einem Hitzeschock unterscheiden. Hierfür wurden die HSE-Luc-transfizierten SH-SY5Y Zellen nach 16 h Co-Kultivierung einem Hitzeschock ausgesetzt, auf 37°C zurückgebracht und weitere 8 h kultiviert. Nach Inkubation wurde die Luziferase-Aktivität des Zelllysats mit Hilfe eines Luminometers bestimmt. Die Luziferase-Aktivität der SH-SY5Y Zellen, die mit N2a Zellen co-kultiviert wurden, war vergleichbar mit den nicht co-kultivierten SH-SY5Y Zellen. Parallel dazu wurden die mit den ScN2a Zellen-co-kultivierten SH-SY5Y Zellen den gleichen Hitzeschock-Bedingungen ausgesetzt. Diese SH-SY5Y Zellen zeigten im Vergleich zu den mit N2a Zellen-co-kultivierten SH-SY5Y Zellen eine signifikant erhöhte Luziferase-Aktivität. So führte beispielsweise ein 20-minütiger Hitzeschock (42°C) bei SH-SY5Y Zellen, die mit N2a Zellen co-kultiviert wurden, zu einer 8-fachen Induktion der Luziferase, wohingegen die gleichen Hitzeschock-Bedingungen bei PrP^{Sc}-exponierten Zellen eine 18,5-fache Aktivierung zur Folge hatte (Abb. 36C).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die akute PrP^{Sc}-Exposition die Zellen für zusätzlichen Stress, wie beispielsweise einen Hitzeschock, sensibilisieren. In diesem Kontext stellte sich die Frage, ob der Hitzeschock toxisch für die SH-SY5Y Zellen ist. Um diese Frage zu adressieren, wurden die SH-SY5Y Zellen mit ScN2a oder N2a Zellen co-kultiviert. Nach 24 h Co-Kultivierung wurde die Apoptoserate mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Hierfür wurde in drei voneinander unabhängigen Versuchen der Anteil der aktiven-Caspase 3-positiven Zellen von mindestens 1000 Zellen bestimmt. Die Analyse ergab, dass

der Hitzeschock der mit ScN2a oder N2a Zellen-co-kultivierten SH-SY5Y Zellen zu keiner Erhöhung der Apoptoserate führte und somit für die SH-SY5Y Zellen nicht toxisch ist (Abb. 36D).

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Analysen, dass eine akute PrP^{Sc}-Exposition die HSR per se nicht aktiviert. Da die exponierten Zellen jedoch nach Hitzeschock eine erhöhte Intensität der HSR aufwiesen, scheint PrP^{Sc} die Zellen für weiteren Stress zu sensibilisieren und den Schwellenwert für die Induktion der HSR zu senken.

2.3.2 Die Aktivierung der Hitzeschock-Antwort moduliert toxische Effekte von PrP^{Sc}, A β und einer PrP-Mutante

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen, dass die HSR der SH-SY5Y Zellen durch PrP^{Sc} moduliert wird. Im nächsten Schritt stellten wir uns die Frage, ob die Induktion der HSR oder die Expression individueller Chaperone toxische Effekte von verschiedenen Konformeren verhindern kann. Hintergrund für diese Annahme sind unter anderem die folgenden Studien. So konnte gezeigt werden, dass Ratten, die zuvor einem Hitzeschock oder chemischem Stress ausgesetzt wurden, eine erhöhte Stresstoleranz gegenüber Hitzschlag-induzierten Schäden, wie zerebraler Ischämie und zerebralem Neuronenuntergang, aufwiesen (Yang et al. 1998). Zudem wurde anhand von Tiermodellen dargestellt, dass die Hsp70-Überexpression protektiv gegen eine aktive Schädigung des Nervensystems durch zerebraler Ischämie wirkt (Rajdev et al. 2000; Giffard et al. 2004).

2.3.2.1 Charakterisierung der untersuchten Zellkulturmodelle

Um der Frage nachzugehen wurden drei etablierte Modellsysteme verwendet, die es ermöglichen, die Auswirkungen einer induzierten HSR oder molekularer Chaperone auf toxische Effekte von PrP^{Sc}, A β oder einer PrP-Mutante, unter annähernd gleichen Bedingungen, zu analysieren. Diesen drei verschiedenen, toxischen Konformeren ist gemeinsam, dass sie die Toxizität an der Plasmamembran induzieren. Hierbei wird die toxische Aktivität von PrP^{Sc} oder A β durch an der Zelloberfläche lokalisiertes PrP^C vermittelt. Im Gegensatz dazu ist

die PrP-Mutante PrP Δ HD in der Plasmamembran verankert und löst in Abwesenheit von PrP^C toxische Effekte aus.

Um den Effekt auf die Toxizität der Konformere PrP^{Sc} und A β zu bestimmen, griffen wir auf die oben beschriebenen Co-Kultivierungsmodelle zurück. Das zusätzlich verwendete PrP Δ HD-Modell soll im Folgenden vorgestellt werden. Anhand von Tiermodellen und Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass die PrP-Mutante PrP Δ HD, die eine Deletion der hydrophoben Domäne aufweist (Δ 105-125), toxisch ist (Li et al. 2007; Rambold et al. 2008; Sakthivelu et al. 2011). Die Deletion der hydrophoben Domäne scheint keinen Einfluss auf die post-translationalen Modifikationen und den Transport des Proteins zu haben, da PrP Δ HD komplex glykosyliert und an der Zelloberfläche über einen GPI-Anker verankert ist (Winklhofer et al. 2003). Transgene Mäuse, die PrP Δ HD exprimieren, entwickelten eine neurodegenerative Erkrankung, ohne dass es zur Replikation infektiöser Prionen oder zur Ausbildung fehlgefalteter Proteine kam (Li et al. 2007). Interessanterweise wird die neurotoxische Aktivität von PrP Δ HD durch die Co-Expression von Wildtyp-PrP verhindert. Der zugrunde liegende Mechanismus dieser neurotoxischen Mutante konnte jedoch noch nicht geklärt werden.

2.3.2.2 Die Induktion der Hitzeschock-Antwort oder die Expression von Hsp72 kann die toxischen Effekte von PrP^{Sc}, A β und einer toxischen Mutante verhindern

Um den Effekt einer induzierten HSR auf die toxischen Effekte der verschiedenen Konformere zu untersuchen, ohne die Zellen einem Hitzeschock auszusetzen, wurde eine konstitutiv aktive Mutante des HSF1 (Δ HSF), die eine Deletion in der regulatorischen Domäne aufweist (Δ 202-316), verwendet. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt gezeigt wurde, führt die Expression des Δ HSF-Konstrukts zu einer Induktion der HSR und damit zur Expression des Stress-induzierbaren Hsp72 (vgl. Abb. 35).

Zunächst wurden die Auswirkungen einer induzierten HSR auf die PrP^C-abhängigen toxischen Aktivitäten von PrP^{Sc} und A β untersucht. Hierbei wurden SH-SY5Y Zellen mit PrP^C und Δ HSF transfiziert und die durch Δ HSF erhöhte Hsp72-Expression mittels indirekter Immunfluoreszenz bestätigt (Abb. 37C). Im nächsten Schritt wurden die transfizierten SH-SY5Y Zellen mit

den ScN2a oder N2a oder CHO-7PA2 oder CHO Zellen co-kultiviert. Nach 16 h Co-Kultivierung wurden die SH-SY5Y Zellen auf Deckgläschen fixiert, permeabilisiert und die aktive Caspase 3 gefärbt. Die Analyse der Apoptoserate zeigte, dass die Co-Kultivierung der PrP^C-exprimierenden Zellen mit ScN2a Zellen im Vergleich zu den mit N2a Zellen-co-kultivierten Zellen zu einer erhöhten Apoptoserate (etwa 16%) führt. Parallel dazu wurden die SH-SY5Y Zellen, die PrP^C und Δ HSF exprimierten, mit den ScN2a oder N2a Zellen co-kultiviert. Die Induktion der HSR durch die Δ HSF-Expression verhinderte bei der Co-Kultivierung mit ScN2a Zellen die Erhöhung der Apoptoserate (etwa 7,5%) (Abb. 37A, linke Spalte). Der gleiche Versuch wurde mit den A β -sekretierenden CHO-7PA2 Zellen durchgeführt. Genauso wie bei der PrP^{Sc}-Exposition konnte gezeigt werden, dass die Expression von Δ HSF die Toxizität von A β inhibiert (Abb. 37A, rechte Spalte). Somit kann die Induktion der HSR die pro-apoptischen Effekte von PrP^{Sc} und A β verhindern.

Eine Folge der Aktivierung der HSR ist unter anderem die erhöhte Expression von Hsp72. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob die alleinige Expression dieses Hsps die toxische Aktivität der beiden β -Faltblatt-reichen Proteine hemmt. Zu diesem Zweck wurden analog zu dem gerade beschriebenen Versuch PrP^C- und Hsp72-co-transfizierte SH-SY5Y Zellen mit den ScN2a oder CHO-7PA2 Zellen co-kultiviert. Nach der Co-Kultivierung wurde die Apoptoserate analysiert (Abb. 37B). SH-SY5Y Zellen, die PrP^C und Hsp72 exprimierten, zeigten nach der Co-Kultivierung mit ScN2a oder CHO-7PA2 Zellen keine Erhöhung der Apoptoserate. Demnach ist die Co-Expression von Hsp72 protektiv gegen PrP^{Sc}- oder A β -induzierte Toxizität.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass der protektive Effekt auf eine reduzierte Expression von PrP^C zurückzuführen ist, wurden parallel geerntete SH-SY5Y Zellen mittels Western Blot analysiert. Die PrP^C-Expression wurde weder durch die Expression des Δ HSF-, noch die des Hsp72-Konstrukts, beeinflusst (Abb. 37C).

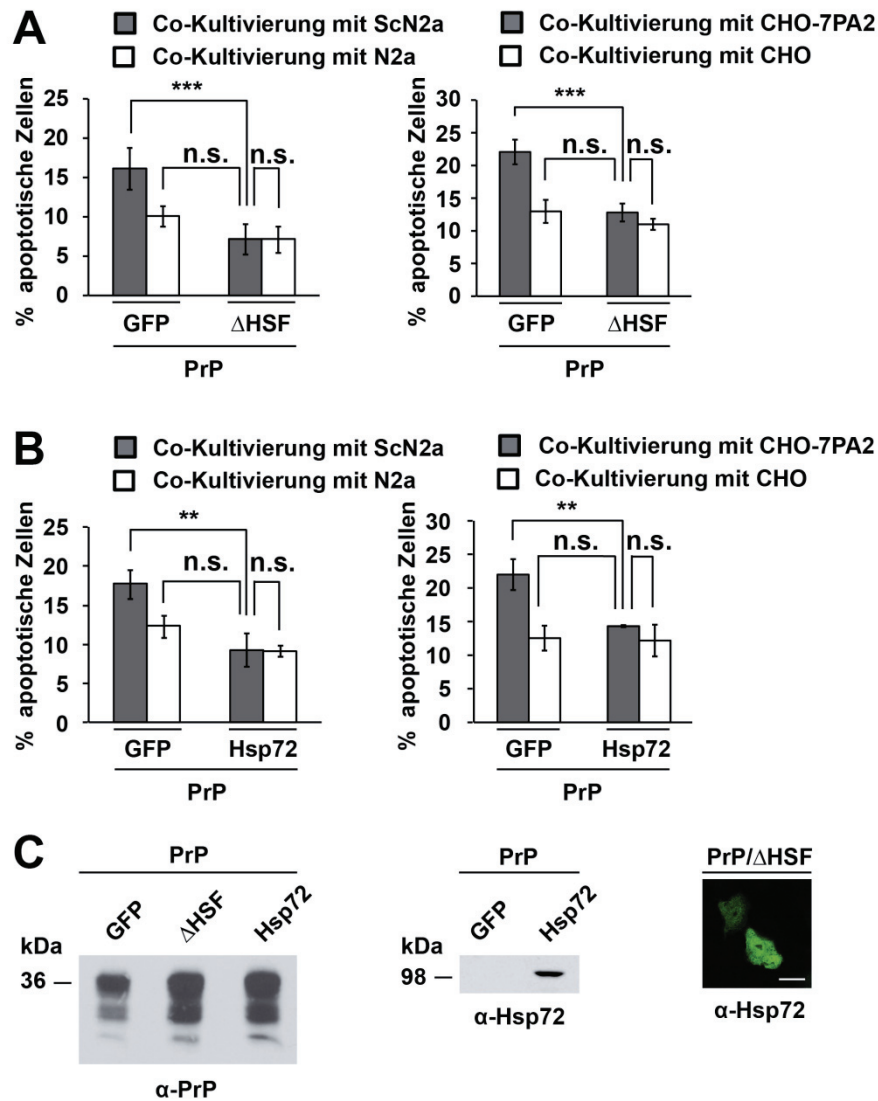


Abb. 37. Die Aktivierung der HSR oder die Expression von Hsp72 kann die toxischen Aktivitäten von PrP^{Sc} und Aβ verhindern.

(A, B) Die Induktion der HSR oder die Expression von Hsp72 wirkt protektiv gegen PrP^{Sc}- oder Aβ-induzierte Toxizität. SH-SY5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Nach 16 h Co-Kultivierung mit ScN2a oder CHO-7PA2 Zellen wurde die Apoptoserate, wie unter Abb. 18 beschrieben, analysiert. (C) Die Expressionsmengen von PrP^C werden durch die Induktion der HSR oder der Expression von Hsp72 nicht beeinflusst. SH-SY5Y Zellen wurden parallel zu den Co-Kultivierungsexperimenten transfiziert, geerntet und in eiskaltem Lysepuffer A lysiert. Die Expressionsmengen von PrP^C und Hsp72 wurden mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörpers 3F4 oder anti-Hsp72 Antikörpers C92 analysiert. Die Induktion der HSR durch Expression des ΔHSF Konstrukts wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des Antikörpers C92 untersucht. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt. n.s., nicht-signifikant; ** p < 0,005; *** p < 0,0005. Maßstab 10 μM.

Nachdem die Effekte einer Induktion der HSR und die Expression von Hsp72 auf die Toxizität von PrP^{Sc} und A β untersucht wurden, wendeten wir uns der PrP-Mutante zu. Im Gegensatz zu den Co-Kultivierungsexperimenten wird die PrP Δ HD-induzierte Toxizität nicht durch eine extrazelluläre Exposition zu Oligomeren, sondern durch die Expression einer PrP-Mutante hervorgerufen. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von PrP Δ HD in SH-SY5Y Zellen toxisch ist und dass die Co-Expression von PrP^C den toxischen Effekt von PrP Δ HD verhindern kann, obwohl PrP Δ HD weiterhin exprimiert wird (Rambold et al. 2008; Sakthivelu et al. 2011). Diese Daten stimmen mit dem bereits oben dargestellten Tiermodell überein (Li et al. 2007).

Um den protektiven Effekt von PrP^C zu bestätigen, wurden die SH-SY5Y Zellen mit PrP^C und PrP Δ HD co-transfiziert und 20 h nach der Transfektion auf Deckgläschen fixiert, permeabilisiert und die aktive Caspase 3 gefärbt. Die Analyse der apoptotischen Zellen zeigte, dass die Expression von PrP Δ HD zu einer Apoptoserate von etwa 22,5% führt. Im Vergleich dazu wiesen die SH-SY5Y Zellen, die PrP^C und PrP Δ HD exprimierten eine verminderte Apoptoserate von etwa 12% auf (Abb. 38A).

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen einer induzierten HSR auf die toxischen Aktivitäten der PrP-Mutante untersucht. Hierfür wurden die SH-SY5Y Zellen mit PrP Δ HD und Δ HSP co-transfiziert und die Apoptoserate mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. In Anwesenheit von Δ HSP wiesen die PrP Δ HD-exprimierenden SH-SY5Y Zellen eine signifikant erniedrigte Apoptoserate von etwa 12,5% auf (Abb. 38B). Analog zu dem gerade beschriebenen Versuch wurden die SH-SY5Y Zellen mit PrP Δ HD und Hsp72 co-transfiziert. Die Analyse der Apoptoserate zeigte, dass Hsp72 protektiv gegen den toxischen Effekt von PrP Δ HD wirkt (Apoptoserate etwa 14,5%) (Abb. 38C). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass der protektive Effekt von Δ HSP und Hsp72 auf erniedrigte PrP Δ HD-Expressions Mengen zurückzuführen sind, wurden parallel geerntete Zellen mittels Western Blot analysiert. Die PrP Δ HD-Expressions Mengen wurden weder durch die Expression des Δ HSP-, noch die des Hsp72-Konstrukts, beeinflusst (Abb. 38D).

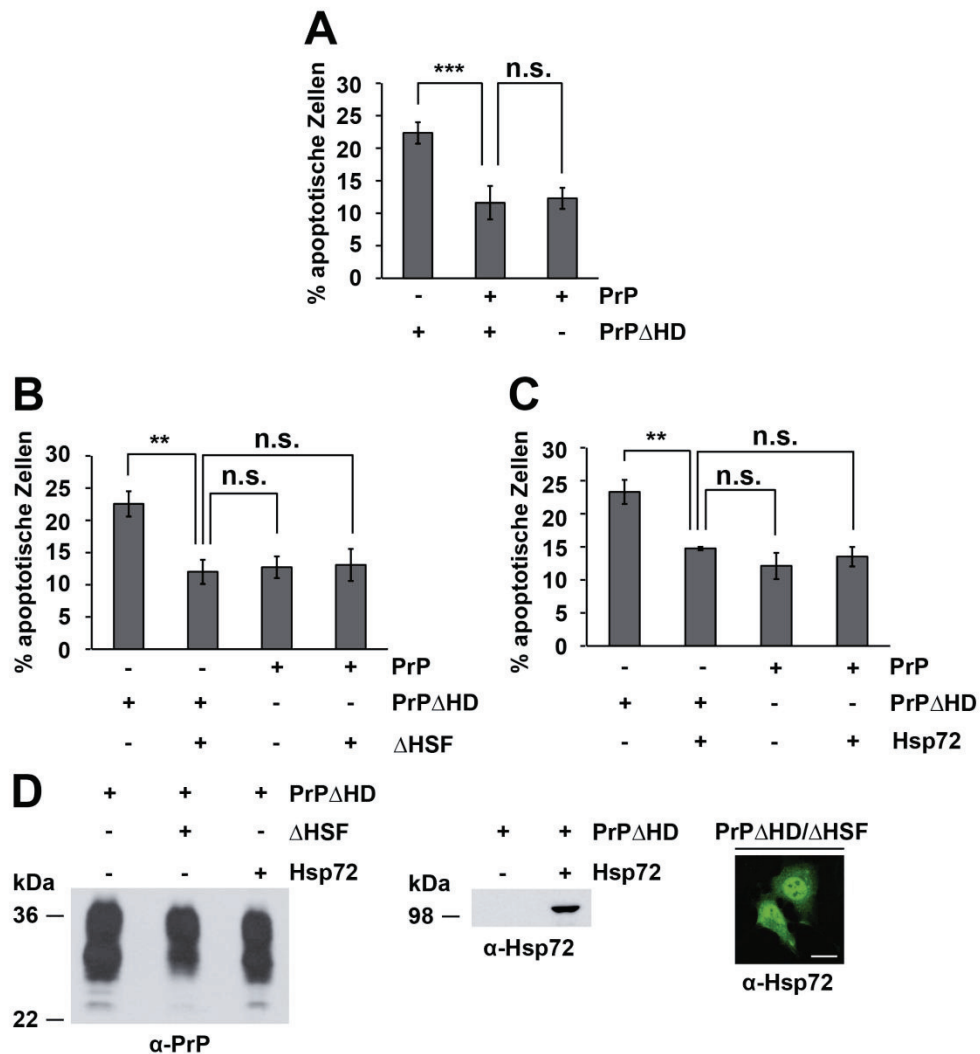


Abb. 38. Die toxische Aktivität der PrP-Mutante kann durch die Induktion der HSR oder die Expression von Hsp72 gehemmt werden.

(A-C) Die toxische Aktivität der PrP-Mutante wird durch die Co-Expression von PrP^C (A), die Induktion der HSR (B) oder die Expression von Hsp72 (C) verhindert. SH-SY5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. 20 h nach Transfektion wurde die Apoptoserate, wie unter Abb. 18 beschrieben, analysiert. (D) Die Expressionsmengen von PrP Δ HD werden durch die Induktion der HSR oder der Hsp72-Expression nicht beeinflusst. SH-SY5Y Zellen wurden parallel zu den Immunfluoreszenz-Analysen transfiziert, geerntet und in eiskalten Lysepuffer A lysiert. Die Expressionsmengen von PrP Δ HD und Hsp72 wurde mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörpers 3F4 oder anti-Hsp72 Antikörpers C92 analysiert. Die Induktion der HSR durch Expression des Δ HSF-Konstrukts wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des Antikörpers C92 untersucht. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt. n.s., nicht-signifikant; ** p < 0,005; *** p < 0,0005. Maßstab 10 μ M.

Anhand der drei Zellkulturmodelle konnte der Effekt einer Induktion der HSR und die Expression des molekularen Chaperons Hsp72 auf die toxischen Aktivitäten verschiedener Konformere untersucht werden. Die Ergebnisse demonstrieren, dass eine Aktivierung der HSR und die Hsp72-Expression, die toxischen Aktivitäten von PrP^{Sc} und A β als auch die der PrP-Mutante PrP Δ HD verhindern. Im nächsten Schritt wurde der Effekt eines extrazellulären Chaperons auf die toxischen Aktivitäten von PrP^{Sc}, A β und der PrP-Mutante untersucht.

2.3.2.3 Das extrazelluläre Chaperon Clusterin hemmt die toxischen Effekte von PrP^{Sc} und A β , jedoch nicht die einer toxischen PrP-Mutante

Vor Kurzem konnte anhand einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) gezeigt werden, dass das Gen des extrazellulären Chaperons Clusterin ein Risikogen für AD ist (Harold et al. 2009; Lambert et al. 2009). Interessanterweise wurde Clusterin bereits in vorangegangenen Studien mit AD und Prion-Erkrankungen in Verbindung gebracht. So kann Clusterin unter anderem die Bildung von amyloiden Aggregaten des PrP(106-126)-Peptids oder A β -Peptids *in vitro* verhindern (McHattie and Edington 1999; Matsubara et al. 1996; Yerbury et al. 2007). Zudem ist es mit Amyloid-Ablagerungen im erkrankten Gehirn von CJD- oder AD-Patienten assoziiert (Freixes et al. 2004; Calero et al. 2000).

Aufgrund dieser Beobachtungen haben wir unsere Systeme verwendet, um den Effekt von Clusterin, das sich in einem anderen Kompartiment befindet als Hsp72, auf die Toxizität von PrP^{Sc}, A β und der PrP-Mutante zu untersuchen. Hierfür wurden die SH-SY5Y Zellen mit Clusterin co-transfiziert und unter Verwendung der oben vorgestellten Zellkulturmodelle untersucht. Die Analyse der Proteine im konditionierten Medium transfizierter Zellen zeigte, dass Clusterin effektiv in das Medium sekretiert wird (Abb. 39B, rechte Spalte).

Als Erstes wurde das Zellsystem verwendet, in dem die Toxizität durch extrazelluläre Exposition zu PrP^{Sc} oder A β hervorgerufen wird. Hierfür wurden die SH-SY5Y Zellen mit PrP^C und Clusterin oder einem sekretorischen GFP co-transfiziert und mit ScN2a oder N2a Zellen co-kultiviert. Nach 16 h Co-Kultivierung wurde die Apoptoserate mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Im Vergleich zu mit N2a Zellen-co-kultivierten SH-SY5Y Zellen, wiesen die GFP-sekretierenden SH-SY5Y Zellen, die mit ScN2a Zellen co-kultiviert wurden, eine erhöhte Apoptoserate von etwa 18% auf. Wenn die mit

ScN2a Zellen-co-kultivierten SH-SY5Y Zellen jedoch Clusterin sekretierten, wurde eine signifikante Reduktion der Apoptoserate detektiert (etwa 10,5%) (Abb. 39A, linke Spalte). Analog zu diesem Versuch, wurden die transfizierten Zellen mit CHO-7PA2 oder CHO-Zellen co-kultiviert. Wie bei der PrP^{Sc}-Exposition verhinderte die Sekretion von Clusterin während der Co-Kultivierung mit A β -sekretierenden Zellen die durch A β -induzierte Toxizität (Abb. 39A, rechte Spalte). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass dieser Effekt auf eine reduzierte Expression von PrP^C begründet ist, wurde diese mittels Western Blot analysiert. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von Clusterin die Expression von PrP^C nicht beeinflusst (Abb. 39B).

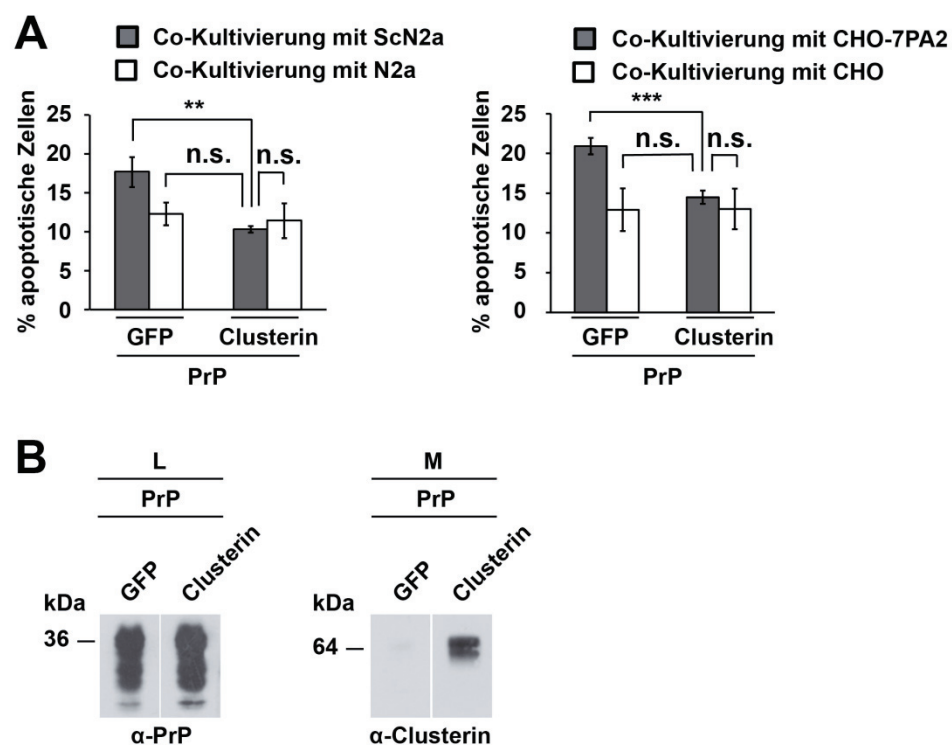


Abb. 39. Die Expression des extrazellulären Chaperons Clusterin kann die toxischen Effekte von PrP^{Sc} und A β verhindern.

(A) Die toxischen Signale von PrP^{Sc} und A β werden durch die Sekretion von Clusterin gehemmt. Die SH-SY5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und mit den ScN2a oder CHO-7PA2 Zellen co-kultiviert. Nach 16 h Co-Kultivierung wurde die Apoptoserate, wie unter Abb. 18 beschrieben, analysiert. (B) Die Expressionsmengen von PrP^C werden durch die Sekretion von Clusterin nicht beeinflusst. SH-SY5Y Zellen wurden parallel zu den Co-Kultivierungsexperimenten transfiziert, geerntet und in eiskalten Lysepuffer A lysiert. Die Expressionsmengen von PrP^C im Zelllysate (L) oder Clusterin im Medium (M) wurden mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörpers 3F4 oder anti-Clusterin Antikörpers 41D analysiert. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt. n.s., nicht-signifikant; ** p < 0,005; *** p < 0,0005.

Im nächsten Schritt haben wir uns dem anderen Zellkulturmodell zugewendet, in dem die Toxizität auf die Expression der PrP-Mutante PrP Δ HD zurückzuführen ist. In diesem Kontext ist es wichtig, dass die PrP-Mutante an der Oberfläche der Zelle lokalisiert ist (Winklhofer et al. 2003). Bislang konnte jedoch der zugrunde liegende Mechanismus dieser neurotoxischen Mutante noch nicht geklärt werden.

Um den Effekt von Clusterin auf die PrP Δ HD-induzierte Toxizität zu untersuchen, wurden die SH-SY5Y Zellen mit PrP Δ HD und Clusterin co-transfiziert und die Apoptoserate bestimmt. SH-SY5Y Zellen, die PrP Δ HD und Clusterin exprimierten, wiesen im Vergleich zu den Zellen, die kein Clusterin sekretierten, die gleiche Apoptoserate (etwa 24%) auf (Abb. 40A). Somit hat die Expression beziehungsweise Sekretion von Clusterin keinen Einfluss auf die toxische Aktivität der PrP-Mutante. Um sicherzustellen, dass Clusterin bei der Co-Expression von PrP Δ HD in das Medium sekretiert wird, wurde das konditionierte Medium auf die Anwesenheit von Clusterin untersucht. Die Western Blot Analyse zeigte, dass die Sekretion von Clusterin nicht durch die Expression von PrP Δ HD beeinflusst wird (Abb. 40B).

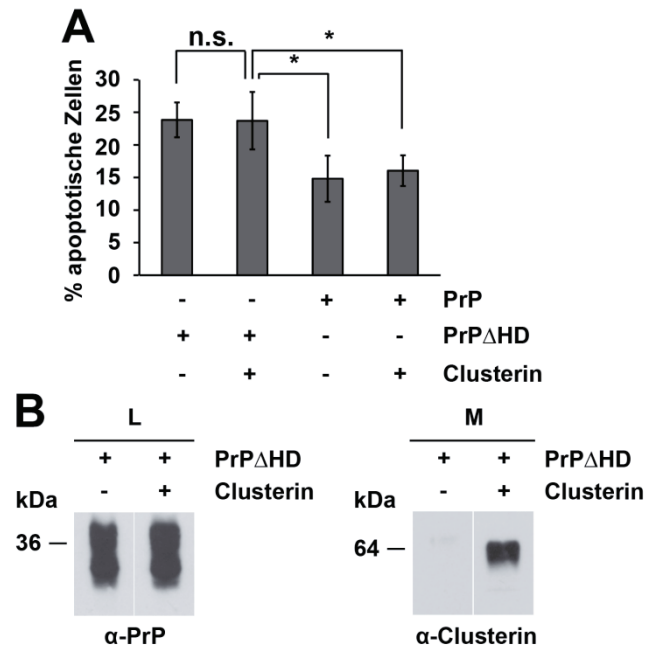


Abb. 40. Die Expression des extrazellulären Chaperons Clusterin interferiert nicht mit der toxischen Aktivität von PrP Δ HD.

(A) Die Sekretion von Clusterin hat keinen Einfluss auf die toxischen Signale von PrP Δ HD. Die SH-SY5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. 20 h nach Transfektion wurde die Apoptoserate, wie unter Abb. 18 beschrieben, analysiert. (B) Die Expressionsmengen von PrP Δ HD werden durch die Sekretion von Clusterin nicht beeinflusst. SH-SY5Y Zellen wurden parallel zu den Immunfluoreszenz-Analysen transfiziert, geerntet und in eiskaltem Lysepuffer A lysiert. Die Expressionsmengen von PrP Δ HD im Zelllysat (L) oder Clusterin im Medium (M) wurden mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-PrP Antikörpers 3F4 oder anti-Clusterin Antikörpers 41D analysiert. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt. n.s., nicht-signifikant; * p < 0,05.

Anhand der drei verschiedenen Zellkulturmodelle konnten die Auswirkungen von Clusterin auf die toxischen Effekte von PrP^{Sc}, A β und einer PrP-Mutante untersucht werden. Zusammenfassend zeigen die aufgeführten Ergebnisse, dass das extrazelluläre Chaperon Clusterin die toxischen Signale der Konformere PrP^{Sc} und A β verhindert, jedoch nicht mit der toxischen Aktivität der PrP-Mutante interferiert.

2.3.3 Zusammenfassung

Die Hitzeschock-Antwort (HSR) ist ein hochkonservierter Mechanismus, der als Reaktion auf proteotoxischen Stress und fehlgefaltete Proteine aktiviert wird. In diesem Teil der Arbeit wurden die Einflüsse von PrP^{Sc} und A β auf die HSR und die Auswirkungen einer induzierten HSR auf toxische Aktivitäten verschiedener Konformere adressiert.

Die Analyse von zwei verschiedenen Zellmodellen legte dar, dass die HSR der chronisch mit PrP^{Sc}- oder A β -exponierten Zellen dereguliert ist. So wiesen ScN2a oder CHO-7PA2 Zellen nach Hitzeschock signifikant verringerte Hsp72-Expressionsmengen auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Schwellenwert für die Induktion der HSR in den chronisch exponierten Zellen erhöht ist. Zudem scheint die gestörte Hsp72-Expression auf eine Deregulierung des Aktivierungs-/Deaktivierungsmechanismus von HSF1 zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu einer chronischen PrP^{Sc}-Exposition führte ein Hitzeschock bei Zellen, die kurzzeitig mit PrP^{Sc} exponiert wurden, zu einer erhöhten Intensität der HSR. Die akute PrP^{Sc}-Exposition induzierte jedoch per se keine HSR. Dies weist darauf hin, dass die Zellen durch PrP^{Sc} für weiteren Stress sensibilisiert werden und deren Schwellenwert für die HSR-Aktivierung erniedrigt ist.

Darüber hinaus wurde anhand von drei Zellkulturmodellen der Einfluss der HSR auf toxische Effekte untersucht, die durch PrP^{Sc}, A β oder einer PrP-Mutante induziert wurden. Die Aktivierung der HSR oder die Expression von Hsp72 konnte die Toxizität von PrP^{Sc} und A β sowie die der PrP-Mutante verhindern. Das extrazelluläre Chaperon Clusterin wies jedoch ausschließlich einen protektiven Effekt gegen die toxischen Aktivitäten der fehlgefalteten Proteine PrP^{Sc} und A β auf.

3 Diskussion

Prion-Erkrankungen sind durch die Bildung infektiöser Prionen und neuronalem Zellverlust charakterisiert. Anhand von Tier- und Zellkulturmodellen wurde gezeigt, dass die beiden Merkmale unabhängig voneinander vorkommen können und demnach zwei getrennte Prozesse darstellen. So kann die Vermehrung infektiöser Prionen in Abwesenheit von neuronalem Zellverlust und vice versa, Neurodegeneration ohne Vermehrung von infektiösen Prionen auftreten (Brandner et al. 1996; Mallucci et al. 2003; Chesebro et al. 2005; Rambold et al. 2008). Hierbei ist die Induktion toxischer Signale durch fehlgefaltetes PrP^{Sc} von der neuronalen Expression des GPI-verankerten PrP^C abhängig. Da die Fehlfaltung von Proteinen zu β -Faltblatt-reichen Konformeren ein gemeinsames Merkmal verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die zentrale Frage untersucht, über welchem Weg die Toxizität dieser Konformere vermittelt werden kann.

3.1 Das zelluläre Prion-Protein ist ein Rezeptor verschiedener β -Faltblatt-reicher Liganden

Die in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass PrP^C toxische Signale verschiedener β -Faltblatt-reicher Konformere unterschiedlicher Herkunft vermitteln kann. Anhand eines neuartigen Zellkulturmodells konnte zunächst gezeigt werden, dass PrP^C in der Lage ist toxische Effekte von heterologem PrP^{Sc} unabhängig von dessen Replikation zu übermitteln. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Spezies-Barriere vor allem bei der Übertragbarkeit der Prion-Erkrankungen und nicht bei der Induktion toxischer Signale eine Rolle spielt. Aufbauend auf diesen Befunden wurden β -Faltblatt-reiche Konformere unterschiedlicher Primärsequenz, wie A β , Oligomere eines Hefepriion-Proteins und ein *de novo*-entworfenes β -Faltblatt-reiches Peptid, untersucht. So konnte nachgewiesen werden, dass die verschiedenen fehlgefalteten Proteine toxische Effekte über PrP^C-abhängige Signalwege induzieren. Dieser Befund spezifiziert die Beobachtung einer vorangegangenen Studie, die zeigt, dass verschiedene β -Faltblatt-reiche Amyloid-Peptide über einen gemeinsamen Signalweg Toxizität auslösen können (Schubert et al. 1995).

Die wesentliche Gemeinsamkeit der untersuchten Proteine ist deren β -Faltblatt-reiche Konformation. In der Tat konnte die Toxizität der fehlgefalteten Proteine

anhand eines Antikörpers, der spezifisch löslich Oligomere erkennt, inhibiert werden. Die Bindung des Antikörpers verhindert offensichtlich die Interaktion der toxischen Proteine mit PrP^C. Dies weist darauf hin, dass die fehlgefalteten Proteine lösliche Oligomere ausbilden, die die gleiche Konformation aufweisen und toxische Signale PrP^C-abhängig induzieren. Da Proteine, die mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind, eine β -Faltblatt-reiche Struktur aufweisen (Eanes and Glenner 1968; Sunde et al. 1997; Eisenberg and Jucker 2012), deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass PrP^C zusätzlich zu den Prion-Erkrankungen auch eine pathophysiologische Rolle in anderen neurodegenerativen Erkrankungen haben könnte.

Trotzdem wird die physiologische Relevanz der A β -PrP^C-Interaktion bislang kontrovers diskutiert. Die ersten Hinweise für einen möglichen Zusammenhang von PrP und der Alzheimer-Krankheit wurden anhand verschiedener Studien festgestellt. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass PrP in extrazellulären Plaques in AD-Patienten-Gehirnen vorkommt (Ferrer et al. 2001; Esiri et al. 2000) und dass Plaques in CJD-Patienten-Gehirnen A β enthalten (Hainfellner et al. 1998; Miyazono et al. 1992). Den ersten experimentellen Hinweis für einen Zusammenhang von PrP^C-Expression und A β -induzierter Toxizität wurde von Strittmatter und Kollegen beschrieben. Sie konnten zeigen, dass sowohl die A β -induzierte Blockade der Langzeit-Potenzierung als auch die von A β ausgelöste Gedächtnisstörung von der PrP^C-Expression abhängig ist (Lauren et al. 2009; Gimbel et al. 2010). In nachfolgenden Studien wurde die vermutete direkte Bindung von A β an PrP^C mehrfach bestätigt (Zou et al. 2011; Chen et al. 2010; Balducci et al. 2010; Calella et al. 2010). Jedoch stellten manche Gruppen keine PrP^C-Abhängigkeit der A β -induzierten Toxizität fest (Balducci et al. 2010; Calella et al. 2010; Kessels et al. 2010; Cisse et al. 2011). Die widersprüchlichen Daten könnten auf die verschiedenen experimentellen Systeme zurückzuführen sein, die von den jeweiligen Arbeitsgruppen verwendet wurden. Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse und eine Vielzahl neuerer Veröffentlichungen deuten jedoch darauf hin, dass die PrP^C-vermittelte Toxizität von A β von pathophysiologischer Relevanz ist (Chung et al. 2010; Barry et al. 2011; Freir et al. 2011; Bate and Williams 2011; Alier et al. 2011; Kudo et al. 2012; Resenberger et al. 2011a). Dies schließt jedoch nicht aus, dass andere Signalwege existieren, über die A β mit neuronaler Vitalität interferiert. So binden

beispielsweise PrP^C-defiziente Neuronen immer noch A β , was auf andere Rezeptoren hinweist (Huang and Mucke 2012).

3.2 Der GPI-Anker und die N-terminale Domäne von PrP^C sind für die Vermittlung toxischer Signale von β -Faltblatt-reichen Proteinen essentiell

Mit Hilfe des Zellkulturmodells war es möglich, Domänen von PrP^C zu identifizieren, die für die Weiterleitung toxischer Signale essentiell sind. Aus der Analyse verschiedener PrP-Mutanten lässt sich schließen, dass die Induktion pro-apoptotischer Signale von dem C-terminalen GPI-Anker und der intrinsisch unstrukturierten N-terminalen Domäne abhängig ist. Welche Rolle könnten diese Domänen bei der Übermittlung der toxischen Signale übernehmen? GPI-verankerte Membranproteine sind in speziellen cholesterolreichen Mikrodomänen der Plasmamembran (*Lipid Rafts*) lokalisiert. PrP-CD4 weist anstatt eines GPI-Ankers eine heterologe C-terminale Transmembran-Domäne auf und ist nicht in den Mikrodomänen lokalisiert (Rambold et al. 2008). Die Experimente zeigen, dass PrP-CD4 zwar das β -Peptid binden, jedoch nicht dessen toxische Signale weiterleiten kann. Somit ist die Übermittlung der toxischen Signale über PrP^C von dessen GPI-Anker abhängig. Die Lokalisation von PrP^C in den *Lipid Rafts* scheint eine Voraussetzung für die Signaltransduktion zu sein. Des Weiteren könnte der GPI-Anker an der Interaktion von PrP^C mit einem putativen Kofaktor beteiligt sein. Auf diesen Aspekt wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

Neben dem GPI-Anker ist die intrinsisch unstrukturierte N-terminale Domäne von PrP^C für die Übermittlung der Toxizität notwendig. Die PrP-Mutante PrP Δ N weist eine Deletion der Aminosäuren 27 bis 89 auf, wobei dies dem größten Teil des unstrukturierten N-Terminus entspricht. Intrinsisch unstrukturierte Domänen vermitteln häufig Protein-Protein-Interaktionen (Tomba et al. 2009; Uversky 2009). In der Tat zeigen die Ergebnisse, dass die N-terminale Domäne an der Interaktion von PrP^C mit den β -Faltblatt-reichen Proteinen beteiligt ist. Wie bereits oben erwähnt, wurde die Bindung von A β an PrP^C anhand mehrerer Studien nachgewiesen. Hierbei konnten bei PrP^C die mehrbasige Region des N-Terminus (AS 23-27) und der Bereich zwischen den Aminosäuren 95 und 110 als Bindungsstellen von A β bestimmt werden (Zou et al. 2011; Chen et al. 2010; Balducci et al. 2010; Calella et al. 2010). Obwohl das in dieser Arbeit verwendete

PrP Δ N (Δ 27-89) die beiden beschriebenen Bindungsstellen enthält, kann das β -Peptid nicht an die PrP-Mutante binden. Dies lässt vermuten, dass der Bereich zwischen AS 27 und 89 möglicherweise für die Ausbildung und/oder Stabilisierung der Bindung eine Rolle spielt.

Aufgrund der Interaktion zwischen dem fehlgefalteten Protein und dem unstrukturierten N-Terminus war es möglich, durch Expression einer löslichen Version der N-terminalen Domäne von PrP^C (AS 1-120) (N.PrP/Fc) die Toxizität von A β zu verhindern. Zudem konnte mit Hilfe von dem N.PrP/Fc-Protein gezeigt werden, dass der N-Terminus von PrP^C an das β -Peptid bindet. Demnach lieferten die durchgeführten Experimente Evidenz dafür, dass die lösliche Form der N-terminalen Domäne mit toxischen Konformeren interagiert und dadurch dessen Interaktion mit PrP^C und die damit verbundene Induktion toxischer Effekte inhibiert. Unser Befund konnte in einer nachfolgenden Studie bestätigt werden (Guillot-Sestier et al. 2012).

Interessanterweise ist die protektive Eigenschaft von PrP^C ebenfalls von der Anwesenheit des GPI-Ankers und der N-terminalen Domäne abhängig (Mitteregger et al. 2007; Rambold et al. 2008; Sakthivelu et al. 2011). Aufgrund der Protein-bindenden Eigenschaft von intrinsisch unstrukturierten Domänen wäre es möglich, dass die N-terminale Domäne bei der Interaktion von PrP^C mit einem anderen, noch nicht identifizierten Protein beteiligt ist, wobei diese Interaktion für die neuroprotektive Wirkung von PrP^C essentiell wäre. Die Bindung eines β -Faltblatt-reichen Konformers an die N-terminale Domäne könnte die Interaktion von PrP^C und dem putativen Korezeptor und/oder Liganden verhindern beziehungsweise so beeinflussen, dass es zu einem Wechsel von einem protektiven zu einem toxischen Signal kommt. So könnte beispielsweise eine Konformationsänderung des Korezeptors zu dessen Überstimulation führen, wodurch toxische Effekte induziert werden. In diesem Kontext ist es wichtig zu erwähnen, dass der neuronale Zellverlust nicht nur auf einen Verlust der protektiven Funktion von PrP^C zurückgeführt werden kann, da PrP-*Knockout*-Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp aufweisen.

3.3 Welche Signalwege könnten bei den PrP^C-vermittelten toxischen Effekten involviert sein?

Ist der NMDA-Rezeptor ein potentieller Kofaktor von PrP^C?

Ebenso wie andere GPI-verankerte Membranproteine ist PrP^C nur in der äußeren Lipidschicht der Zellmembran verankert. Aus diesem Grund würde es einen potentiellen Kofaktor benötigen, um die Signale durch die Plasmamembran in das Innere der Zelle zu übermitteln (Paulick and Bertozzi 2008). Obwohl in den letzten Jahren bereits einige Interaktionspartner und PrP^C-abhängige Signalwege postuliert wurden (Caughey and Baron 2006), gibt es noch keine Evidenz für deren Rolle in der Transduktion toxischer Signale von PrP^{Sc} oder A β .

In diesem Kontext ist es wichtig, die möglichen Mechanismen der PrP^C-abhängigen Toxizität von PrP^{Sc} zu betrachten. Zwei verschiedene Modelle sind hierfür vorstellbar. Zum einen könnte die Toxizität direkt mit der Vermehrung von PrP^{Sc} in Neuronen verbunden sein. Dabei wäre die intrazelluläre Replikation von der Expression eines GPI-verankerten PrP^C abhängig. Zum Anderen wäre es möglich, dass PrP^{Sc} das toxische Signal über einen PrP^C-abhängigen Signalweg auslösen kann. Hierbei würde GPI-verankertes PrP^C an der Oberfläche der Zelle als Rezeptor von PrP^{Sc} fungieren. Die zweite Möglichkeit wird durch den Befund unterstützt, dass die Vernetzung von PrP^C durch einen anti-PrP Antikörper zu der Aktivierung der Tyrosinkinase Fyn führt (Mouillet-Richard et al. 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Toxizität von PrP^{Sc}, A β und dem β -Peptid durch Behandlung mit dem *N*-Methyl-*D*-Aspartat (NMDA)-Rezeptor-Antagonisten Memantin inhibiert wird. Somit scheint der NMDA-Rezeptor bei der Übermittlung der PrP^C-abhängigen, toxischen Signale der β -Faltblatt-reichen Proteine beteiligt zu sein. In der Tat wurde kürzlich dargestellt, dass PrP^C durch Interaktion mit dem NMDA-Rezeptor dessen Hyperaktivität in Abhängigkeit von Kupfer verhindert (Khosravani et al. 2008; You et al. 2012). Des Weiteren gibt es immer mehr Hinweise für eine wesentliche Rolle der NMDA-Rezeptor-vermittelten Exzitotoxizität in der Pathogenese von AD (Ondrejcek et al. 2010). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der A β -induzierte Verlust von dendritischen Dornfortsätzen von der Aktivität der NMDA-Rezeptoren abhängig ist (Shankar et al. 2007).

Zusammenfassend deuten die im Zuge dieser Arbeit generierten Ergebnisse darauf hin, dass die Bindung eines β -Faltblatt-reichen Oligomers an die N-terminale Domäne von PrP^C die Interaktion von PrP^C mit dem NMDA-Rezeptor und damit dessen Aktivität moduliert. Dieser Prozess könnte Signalwege beeinflussen, die schließlich zu einer neuronalen Dysfunktion führen. Diese Vermutung wurde bereits durch eine weitere Studie gestärkt, wonach A β durch Bindung an PrP^C dessen Interaktion mit dem NMDA-Rezeptor beeinträchtigt. Es wurde postuliert, dass dies die Bindung von Glycin an den NMDA-Rezeptor ermöglichen könnte. Da die Glycin-Bindung die Desensibilisierung der NMDA-Rezeptoren verlangsamt (Mayer et al. 1989), würde es bei andauernder Rezeptor-Stimulation zu einer verminderten Desensibilisierung der Rezeptoren und schließlich zur Schädigung der Zelle kommen (You et al. 2012; Stys et al. 2012).

Alternativ dazu könnten die fehlgefalteten Proteine über einen indirekten Signalweg den NMDA-Rezeptor modulieren. Hierbei wäre es möglich, dass ein anderes Transmembran-Protein oder ein zytosolisches Protein, das mit den *Lipid Rafts* assoziiert ist, die PrP^C-abhängigen Signale vermittelt. Ein möglicher Kandidat dafür wäre die intrazelluläre Tyrosinkinase Fyn (Mouillet-Richard et al. 2000; Mouillet-Richard et al. 2007), die durch Palmitoylierung eines N-terminalen Cystein-Motivs mit GPI-verankerten Proteinen interagieren kann (Shenoy-Scaria et al. 1993). In Abbildung 41 wurde die PrP^C-abhängige Signaltransduktion schematisch dargestellt.

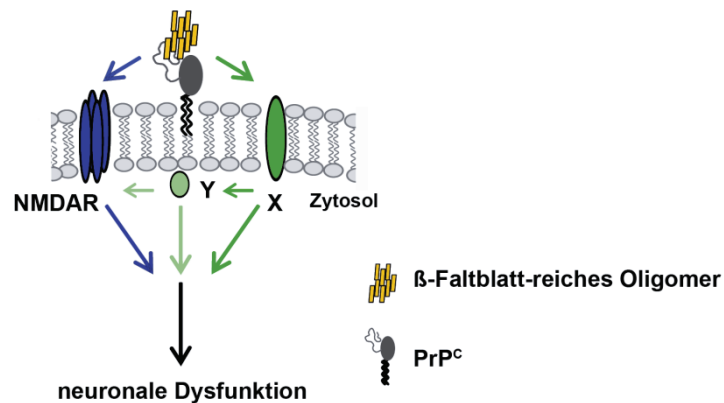


Abb. 41. Schematische Darstellung der PrP^C-abhängigen Transduktion toxischer Signale.

Die Bindung eines β -Faltblatt-reichen Oligomers an PrP^C führt zu der Aktivierung toxischer Signalwege, die neuronale Dysfunktionen auslösen. Bei der Transduktion der Signale sind zusätzliche Faktoren involviert, wie beispielsweise der NMDA-Rezeptor (NMDAR), ein anderes Transmembran-Protein (X) oder ein zytosolisches Protein, das mit den *Lipid Rafts* assoziiert ist (Y). Der NMDAR könnte direkt durch Interaktion mit dem Oligomer-PrP^C-Komplex oder indirekt durch Modulation anderer Faktoren aktiviert werden.

Wie könnte eine aktivierte HSR mit den PrP^{Sc}- oder A β -induzierten, toxischen Signalen interferieren?

Um weitere Erkenntnisse über die involvierten Signalwege zu erlangen, wurde untersucht, ob eine Induktion der HSR oder die Überexpression individueller Chaperone, wie beispielsweise Hsp72 oder Clusterin, mit der durch PrP^{Sc}- oder A β -induzierten Toxizität interferiert. So konnte gezeigt werden, dass diese Ansätze protektiv gegen die toxischen Effekte von PrP^{Sc} und A β sind. Unsere Ergebnisse bestätigen damit den Befund einer anderen Studie, die zeigt, dass die Induktion der HSR durch Hitzeschock die toxische Aktivität von A β verhindern kann (Behl and Schubert 1993). Hieraus ergibt sich nun die Frage, wie die molekularen Chaperone in die Weiterleitung der toxischen Signale eingreifen könnten. Chaperone sind in der Lage fehlgefaltete Proteine zu binden und damit deren korrekte Faltung oder Degradierung zu erleichtern. Neben ihrer Aktivität als Chaperon scheinen sie auch Vorgänge in apoptotischen Signalwegen zu modulieren (Beere 2004; Yenari et al. 2005). Die Induktion der HSR führt zu einer erhöhten Expression stressinduzierbarer Hsps, zu denen Hsp72 und Clusterin

zählen. Interessanterweise haben beide Chaperone einen protektiven Effekt, obwohl sie in unterschiedlichen Kompartimenten vorkommen.

Das im Zytosol lokalisierte Hsp72 könnte durch Bindung des intrazellulären, fehlgefalteten Proteins dessen Toxizität verhindern und/oder protektiv in die PrP^{Sc}- oder A β -induzierten Apoptosewege eingreifen. Da die bereits oben genannten Daten auf eine extrazelluläre Aktivierung der Signalwege hinweisen, scheint Hsp72 mit den induzierten Apoptosewegen zu interferieren. Dieser Effekt ist vergleichbar mit der Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 oder der Behandlung mit einem c-Jun N-terminale Kinasen (JNK)-Inhibitor, die beide protektiv gegen PrP^{Sc}-induzierte Apoptose waren (Rambold et al. 2008). In der Tat wurde beschrieben, dass Hsp72 die Aktivierung von JNK moduliert (Gabai et al. 1997) und eine Überexpression von Hsp70 zu einer erhöhten Expression von Bcl-2 führt (Yenari et al. 2005). Demnach könnte der JNK-Signalweg bei der Weiterleitung von PrP^{Sc}- oder A β -induzierten toxischen Signale involviert sein. Bislang gibt es jedoch noch keinen eindeutigen Beweis, dass die Aktivierung der Apoptose beim neuronalen Zelluntergang in Prion-Erkrankungen und AD *in vivo* eine Rolle spielt (Liberski et al. 2008; Su et al. 2001). Somit sind weitere Studien notwendig, um diesen anti-apoptotischen Mechanismus von Hsp72 *in vivo* zu bestätigen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass extrazelluläres Hsp72 fehlgefaltete Proteine bindet und somit die Interaktion mit PrP^C inhibiert. In der Tat wurde Hsp72 im extrazellulären Raum nachgewiesen (Calderwood et al. 2007). Jedoch liegen dort im Vergleich zu dem Zytosol deutlich geringere Mengen vor (Farias et al. 2005). Da zudem die Funktion von Hsp72 ATP-abhängig ist und davon nur wenig extrazellulär vorkommt, scheint dieser Mechanismus eher eine verminderte Rolle zu spielen. Trotzdem kann eine zusätzliche physiologische Funktion von Hsp72 im extrazellulären Qualitätskontrollsystem (eQKS) nicht ausgeschlossen werden (Yerbury et al. 2005).

Ein interessantes Chaperon im extrazellulären Raum stellt Clusterin dar, das durch Bindung an nicht-native Proteine deren Beseitigung aus dem extrazellulären Raum ermöglicht und somit wesentlich am eQKS beteiligt zu sein scheint (Wyatt et al. 2011; Yerbury et al. 2005; Dabbs et al. 2011). Erst kürzlich konnte in einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) das Clusterin-Gen (*CLU*) als Risikogen für AD identifiziert werden (Harold et al. 2009; Lambert et al. 2009). Da Clusterin protektiv gegen die PrP^{Sc}- oder A β -induzierte Toxizität ist,

stellt sich nun die Frage, welche Mechanismen diesem Effekt zugrunde liegen. Es wäre möglich, dass Clusterin die extrazellulären, fehlgefalteten Proteine beziehungsweise deren Aggregate bindet und somit deren Interaktion mit PrP^C verhindert. Überdies könnte der Komplex aus Clusterin und fehlgefaltetem Protein nach Bindung an einen Rezeptor endozytiert werden, wobei dies die intrazelluläre Degradierung des Komplexes ermöglicht (Klock et al. 2009).

Könnten die verschiedenen Ansätze, die die PrP^{Sc}- oder A β -induzierte Toxizität modulieren, potentielle therapeutische Strategien sein?

Im Folgenden wird kurz auf die Frage eingegangen, ob die verschiedenen Ansätze, mit denen es möglich war, die toxischen Effekte von PrP^{Sc} und A β zu modulieren, potentielle Strategien bei der Behandlung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen sein könnten. Hierzu zählen zum einen der Oligomer-spezifische Antikörper, der offensichtlich durch Bindung löslicher Oligomere deren Interaktion mit PrP^C verhindert, und der NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin. Die Antikörper-basierte Immuntherapie ist im Bereich der Prion- und AD-Forschung von besonderem Interesse (Delrieu et al. 2012; Sakaguchi et al. 2009). So konnte gezeigt werden, dass PrP- oder A β -Antikörper in Mausmodellen effektiv sind, allerdings scheiterte der Ansatz in anschließenden klinischen Studien. 2013/14 sollen anti-PrP Antikörper, die von John Collinge und Kollegen generiert wurden, in klinischen Studien bei CJD-Patienten getestet werden. Ein Oligomer-spezifischer Antikörper könnte eine mögliche Alternative dazu darstellen. Memantin wird bereits bei der Behandlung moderater bis schwerer Demenz-Formen der AD angewendet. Die hier generierten Daten deuten darauf hin, dass Memantin ebenso in anderen neurodegenerativen Erkrankungen, die durch die Ausbildung β -Faltblatt-reicher Proteine verursacht werden, eine Therapiemöglichkeit sein könnte. Zum anderen könnten HSF1, Hsp72 und Clusterin potentielle Kandidaten für therapeutische Interventionen darstellen. In der Tat hat diese potentielle Strategie in den letzten Jahren im Bereich der Fehlfaltungserkrankungen an Bedeutung gewonnen (Westerheide and Morimoto 2005; Muchowski and Wacker 2005; Abisambra et al. 2011). So könnten sich beispielsweise Hsp90-Inhibitoren wie Geldanamycin oder Radicolol, Arimocloamol, welches die Aktivität von HSF1 verlängert (Kieran et al. 2004), oder BGP-15, welches die Expression von Hsp72 induziert (Gehrig et al. 2012), als nützlich erweisen. Trotzdem wird der Einsatz dieser Modulatoren kontrovers

diskutiert (Muchowski and Wacker 2005), da eine dauerhafte starke Erhöhung molekularer Chaperone im Verdacht steht, die Entstehung von Tumoren zu begünstigen (Mosser and Morimoto 2004).

3.4 Führen PrP^{Sc}, A β und die PrP-Mutante PrP Δ HD zur Aktivierung gemeinsamer toxischer Signalwege?

Mit Hilfe von drei Zellkulturmodellen war es möglich, die Auswirkungen einer induzierten HSR oder molekularer Chaperone auf toxische Effekte von PrP^{Sc}, A β und der PrP-Mutante PrP Δ HD zu analysieren. Die toxische Aktivität der PrP-Mutante unterscheidet sich wesentlich von der der PrP^{Sc} beziehungsweise A β Konformere. So wird die Toxizität von PrP^{Sc} und A β durch extrazelluläre, fehlgefaltete Proteine induziert, wohingegen die Toxizität von PrP Δ HD durch dessen Expression hervorgerufen wird, ohne dass es zur Replikation infektiöser Prionen oder zur Ausbildung fehlgefalteter Proteine kommt (Li et al. 2007). Da die Co-Expression von Wildtyp-PrP die neurotoxische Aktivität von PrP Δ HD verhindert, scheint PrP^C und PrP Δ HD den gleichen putativen Kofaktor zu binden (Li et al. 2007; Rambold et al. 2008; Sakthivelu et al. 2011). Der hier zugrunde liegende Mechanismus wird wie folgt begründet: In Abwesenheit von PrP^C induziert die an der Zelloberfläche lokalisierte Mutante über einen Kofaktor ein toxisches Signal. Sobald PrP^C co-exprimiert wird, konkurrieren PrP^C und PrP Δ HD um die Bindungsstelle des Kofaktors, wobei PrP^C aufgrund seiner höheren Affinität PrP Δ HD verdrängt. Die Bindung von PrP^{Sc} oder A β an PrP^C könnte die Interaktion mit dem putativen Kofaktor so beeinträchtigen, dass es zur Induktion von toxischen Signalwegen kommt, die ebenso durch PrP Δ HD aktiviert werden würden.

Die in dieser Arbeit aufgeführten Daten zeigen, dass die Expression von Hsp72 nicht nur die toxischen Effekte von PrP^{Sc} und A β , sondern auch die von PrP Δ HD inhibiert. Diese Befunde unterstützen die oben dargelegte Annahme, dass die drei toxischen Konformere einen gemeinsamen, zellulären Signalweg aktivieren. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass anfangs verschiedene Wege induziert werden, die dann in einen gemeinsamen Weg münden, der durch die Hsp72 moduliert wird.

Neben Hsp72 wurde der Effekt von Clusterin auf die PrP Δ HD-induzierte Toxizität untersucht. Im Gegensatz zum intrazellulären Chaperon wies Clusterin keine

protektiven Eigenschaften auf. Da in PrP Δ HD-transgenen Mäusen keine Aggregate von fehlgefaltetem PrP Δ HD nachgewiesen werden konnten, ist es wahrscheinlich, dass Clusterin PrP Δ HD nicht erkennt und demnach keinen Einfluss auf dessen Toxizität hat.

3.5 Modulation der Hitzeschock-Antwort durch PrP^{Sc} und A β

Die im Zuge dieser Arbeit generierten Daten zeigen, dass die HSR der Zellen, die dauerhaft mit den fehlgefalteten Proteinen PrP^{Sc} oder A β exponiert werden, dereguliert ist. So konnten in chronisch-infizierten (ScN2a) oder stabil transfizierten (CHO-7PA2) Zellen nach Hitzeschock erniedrigte Hsp72-Expressionsmengen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den ScN2a Zellen wiesen die CHO-7PA2 Zellen zwar eine erhöhte Expression von Hsp72 auf, jedoch war die Effektivität der HSR-Aktivierung nach Hitzeschock im Vergleich zu den CHO Zellen signifikant vermindert. Demzufolge scheint der Schwellenwert, der überschritten werden muss, um die HSR zu aktivieren, bei den PrP^{Sc}- und A β -exponierten Zellen erhöht zu sein. Da erhöhte Schwellenwerte in Zellen beobachtet wurden, die länger andauerndem Stress ausgesetzt waren (Baler et al. 1992), deuten die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse darauf hin, dass PrP^{Sc} und A β einen chronischen Stress für die Zellen bedeuten. Hierbei sollte erwähnt werden, dass es sich bei den ScN2a und CHO-7PA2 Zellen um etablierte Zelllinien handelt. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Modifikation der HSR ein mutationsbedingter Effekt ist, der im Laufe der langen Kultivierung der Zellen entstanden ist. Es ist jedoch interessant, dass zwei unabhängige Zelllinien, die verschiedene pathogene Proteinkonformere vermehren beziehungsweise generieren, die gleiche Tendenz aufweisen.

Es stellt sich nun die Frage, welcher Mechanismus zu der defekten HSR führen könnte. Unsere Daten weisen darauf hin, dass die gestörte Hsp72-Expression in den ScN2a und CHO-7PA2 Zellen auf eine Deregulierung des äußerst komplexen Aktivierungs-/Deaktivierungsmechanismus von HSF1 und nicht auf eine Mutation in der Promotorregion des Hsp72-Gens zurückzuführen ist. Interessanterweise wurde in einer vorangegangenen Studie gezeigt, dass die Modulation der HSR in den ScN2a Zellen durch eine beschleunigte Deaktivierung des HSF1-Trimers hervorgerufen wird (Winklhofer et al. 2001). Dies könnte möglicherweise durch eine Deregulierung von Enzymen, wie beispielsweise der

Deacetylase SirT1, verursacht werden. Darüber hinaus konnte die defekte HSR der ScN2a durch die Behandlung mit dem Hsp90-Inhibitor Geldanamycin wieder hergestellt werden (Winklhofer et al. 2001). Die essentielle Rolle einer intakten HSR in Prion-Erkrankungen wurde mit Hilfe von HSF1-*Knockout*-Mäusen dargestellt. So wiesen diese nach Prion-Infektion im Vergleich zu infizierten Wildtyp-Mäusen eine deutlich kürzere Lebensdauer auf (Steele et al. 2008). Da unsere Daten zeigen, dass die HSR nicht nur von chronisch infizierten ScN2a Zellen, sondern auch von CHO-7PA2 Zellen dereguliert ist, wäre es möglich, dass eine defekte HSR, die im Laufe einer Prion-Erkrankung oder AD auftreten könnte, die Lebenserwartung verschlechtert. Demnach könnte die Aktivierung der HSR eine potentielle therapeutische Strategie in diesen Erkrankungen sein (vgl. Abschnitt 3.3).

Zudem war es mit Hilfe eines von uns etablierten Zellkultursystems möglich, den Effekt einer akuten PrP^{Sc}-Exposition auf die HSR der Zellen zu untersuchen. Die Analyse hat ergeben, dass PrP^{Sc} die HSR per se nicht aktiviert, die Intensität der HSR nach Hitzeschock jedoch im Vergleich zu nicht-exponierten Zellen deutlich erhöht ist. Demzufolge werden die Zellen durch PrP^{Sc} für weiteren Stress, wie beispielsweise einem Hitzeschock, sensibilisiert. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen, im Gegensatz zu chronisch mit PrP^{Sc}- oder A β -exponierten Zellen, einen niedrigeren Schwellenwert für die Aktivierung der HSR aufweisen. Somit scheint PrP^{Sc} in den 24 h Inkubation die HSR zu modulieren; wobei dies allerdings nicht ausreicht, um die Transkription der stressinduzierbaren Gene zu induzieren. Damit HSF1 an den Promotor binden und Transaktivierungskompetenz erlangen kann, muss er einen komplexen Prozess durchlaufen. Es wäre denkbar, dass PrP^{Sc} einen Teilprozess, wie beispielsweise die Translokation in den Nukleus oder post-translationalen Modifikationen von HSF1 induziert, HSF1 aber noch keine Transaktivierungskompetenz erhält.

Wie könnte PrP^{Sc} oder A β den Aktivierungs-/Deaktivierungsmechanismus von HSF1 modulieren? Da beide pathogene Proteine im Zytosol nachgewiesen wurden (Lai and McLaurin 2010; Kristiansen et al. 2005), könnten sie zum einen direkt mit HSF1 oder Chaperonen beziehungsweise Enzymen interagieren, die an der Regulation der Aktivität von HSF1 beteiligt sind. Zum anderen wäre es möglich, dass PrP^{Sc} und A β indirekt durch Störung der zellulären Proteinhomeostase einen Einfluss auf die Aktivität von HSF1 haben. So hemmt beispielsweise zytosolisches PrP^{Sc} die proteolytischen β -Untereinheiten des 26S-Proteasoms (Kristiansen et al. 2007).

Die hier dargelegten Ergebnisse zeigen, dass fehlgefaltete Proteine mit der Effektivität der HSR interferieren können. Es wäre demnach möglich, dass dies eine Rolle in der Pathogenese der Prion- oder der Alzheimer-Erkrankung spielt.

4 Zusammenfassung

Die Ausbildung β -Faltblatt-reicher Protein-Konformere ist ein charakteristisches Merkmal verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen, wie der Prion- oder der Alzheimer-Erkrankung. Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass neuronales PrP^C die toxischen Effekte seiner pathogenen Isoform PrP^{Sc} vermittelt. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals dargelegt werden, dass PrP^C die Toxizität von β -Faltblatt-reichen Konformeren unterschiedlichen Ursprungs, wie heterologem PrP^{Sc}, Amyloid β , Oligomeren eines Hefepriion-Proteins sowie eines *de novo* entworfenen β -Peptids, übermitteln kann. Überdies ergab die vorliegende Studie, dass die intrinsisch unstrukturierte N-terminale Domäne von PrP^C und der C-terminale GPI-Anker für die Transduktion der toxischen Signale essentiell sind. Verschiedene Ansätze zeigten, dass die Bindung der β -Faltblatt-reichen Proteine an PrP^C über dessen N-terminale Domäne erfolgt. Darüber hinaus konnten die PrP^C-vermittelten, toxischen Aktivitäten durch einen NMDA-Rezeptor-Antagonisten und einen Oligomer-spezifischen Antikörper verhindert werden. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass PrP^C nicht nur in Prion-Erkrankungen sondern ebenso in anderen neurodegenerativen Erkrankungen eine pathophysiologische Rolle spielen könnte.

Die Befunde dieser Arbeit erbrachten zudem Evidenz, dass die fehlgefalteten Konformere PrP^{Sc} und A β die Hitzeschock-Antwort der Zelle modulieren können. Eine chronische Exposition mit PrP^{Sc} oder A β verringert die Intensität der Hitzeschock-Antwort nach Stress. Eine akute PrP^{Sc}-Exposition hingegen führt per se zu keiner Aktivierung der Hitzeschock-Antwort, jedoch ist deren Effektivität nach zusätzlichem Stress erhöht. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine akute PrP^{Sc}-Exposition die Zellen für weiteren Stress sensibilisiert und damit den Schwellenwert für eine effiziente Hsp72-Expression senkt. Überdies kann die Induktion der Hitzeschock-Antwort sowie das molekulare Chaperon Hsp72 die PrP^C-abhängige toxische Aktivität von PrP^{Sc} oder A β und die Toxizität der PrP-Mutante PrP Δ HD verhindern. Das extrazelluläre Chaperon Clusterin zeigte sich allerdings nur gegen PrP^{Sc}- und A β -induzierte Toxizität protektiv. Dies lässt vermuten, dass die verschiedenen Konformere PrP^{Sc}, A β und PrP Δ HD denselben toxischen Signalweg induzieren. Die hier gewonnenen Erkenntnisse tragen zu einem besseren Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen der PrP^C-abhängigen Transduktion toxischer Signale bei.

5 Material

5.1 Biologisches Material

5.1.1 Immortalisierte Zelllinien

N2a	Typ: murine Neuroblastomzelllinie ATCC-Nr. CCI 131
ScN2a	Typ; murine Neuroblastomzelllinie Infiziert mit murinen Prionen
CHO	Typ: chinesische Hamster Ovarienzellen ATCC-Nr. CCL-61
CHO-7PA2	Typ: chinesische Hamster Ovarienzellen Stabil transfiziert mit der V717F Mutante des Amyloide-Vorläuferproteins APP ₇₅₁
SH-SY5Y	Typ: humane Neuroblastomzelllinie DSMZ-Nr. ACC 209

5.1.2 Bakterienstämme

DH5 α	Genotyp; <i>supE44</i> , Δ <i>lac169</i> (Φ <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> Herkunft: Hanahan, 1983
--------------	---

5.1.3 Vektoren und Plasmide

pcDNA3.1/Zeo(+)	Invitrogen, Karlsruhe
pFUSE-hlgG1-Fc1	InvivoGen, San Diego, CA, USA
pGL3	Promega, Mannheim
pRc/CMV	Invitrogen, Karlsruhe
pEYFP-C1	Clontech

5.1.4 Antikörper

Anti-ACTIVE Caspase3	Promega, Mannheim
Anti-A β 2D8	(Shirotni et al. 2007)
Anti-A β 3552	(Yamasaki et al. 2006)
Anti- β 3 Tubulin	Abcam, Cambridge, UK
Anti- β -Aktin	Sigma, Taufkirchen

Anti-Clusterin 41D	Mark R. Wilson, University of Wollongong, New South Wales, Australia
Anti-Hsp70 N27	(Winklhofer et al. 2003)
Anti-Hsp72 C92	(Winklhofer et al. 2003)
Anti-MAP2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Myc 4A6	Millipore, Schwalbach
Anti-NeuN	Millipore, Schwalbach
Anti-PrP 3F4	Signet Laboratories, Dedham, MA, USA (Kascsak et al. 1987)
Anti-PrP A7	Hergestellt durch Immunisierung von Kaninchen mit gereinigtem rekombinantem PrP (Winklhofer et al. 2003)
Anti-PrP 4H11	(Ertmer et al. 2004)
A11	(Kayed et al. 2003)
Anti-Kaninchen Antikörper Alexa Fluor 555	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Maus Antikörper Alexa Fluor 555	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Kaninchen Antikörper Alexa Fluor 488	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Maus Antikörper Alexa Fluor 488	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Mensch Antikörper (HRP gekoppelt) aus Schaf	Promega, Mannheim
Anti-Maus Antikörper (HRP gekoppelt) aus Schaf	Promega, Mannheim
Anti-Hase Antikörper (HRP gekoppelt) aus Schaf	Promega, Mannheim

5.1.5 Enzyme, Inhibitoren und Proteine

BSA	USB, Cleveland, OH, USA
DAPT	(<i>N</i> -[<i>N</i> -(3,5-difluorphenacetyl)- <i>L</i> -alanyl]- <i>S</i> - phenylglycine <i>t</i> -butyl ester)
FGF-basic Recombinant Human	Invitrogen, Karlsruhe
Memantihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nerve Growth Factor 2.5S	Invitrogen, Karlsruhe
Papain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pfu-Polymerase	Promega, Mannheim
Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Restriktionsendonucleasen	New England Biolabs, Schwalbach
Shrimp-Alkaline-Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
To-Pro3 iodid (642/661)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Gibco BRL life Technologies, Karlsruhe

5.1.6 Standardgrößenmarker für Proteine und Nucleinsäuren

See Blue Plus2	Invitrogen, Karlsruhe
Pre-stained Protein Standard	
1 kb DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
100 bp DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

5.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide (Primer) erfolgte von der Firma Thermo Fisher Scientific GmbH (Ulm).

Tabelle 5. Auflistung der verwendeten PCR-Primer.

Name	Sequenz (5'-3')	Restriktions-enzym
PrP_mo_fw	cccaagcttagggcgaaccttg	Hind III
PrP_mo_rev	atagtttagcggccgctcatcccacg	Not I
PrP_wap_fw	cccaagcttgggatggtgaaaagccacatag	Hind III
PrP_wap_rev	atagtttagcggccgattcttatctactatgagaa	Not I
PrP_ham_fw	cccaagcttagggcgaaccttagctactggctgctggcactcttggctatgtggactg	Hind III
PrP_ham_rev	atagtttagcggccgctcatcccaccatcagg	Not I
PrP_bov_fw	cccaagcttgggatggtgaaaagccacatagcagttggatcctggttctctt	Hind III
PrP_bov_rev	atagtttagcggccgattcttatctactatgagaaaaatgaggaaaga	Not I
PrP_hum_fw	cccaagcttgggatggcgaaccttggctgctggatgctggttctcttggcc	Hind III
PrP_hum_rev	atagtttagcggccgattcttatctactatcagggaagatgaggaaaga	Not I
PrP_fw	ggaattccatggcgaaccttggctactgg	EcoRI
PrP_ΔGPI_rev	ccgctcgagcgggatcttctcccgctgtaatagg	Xho I
PrP_N-term_rev	ccgctcgagcgtactgccccagctgccgag	Xho I
PrP_SS_rev	aaccatggtgctcgagcgttggccgcttttgcag	Xho I

5.2 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Boehringer Mannheim, Mannheim
Amplify®	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
APS	USB, Cleveland, OH, USA
Bacto Trypton	BD, Sparks, MD, USA
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
B27® Supplement Minus AO (50x)	Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt

Complete Protease-Inhibitor	Boehringer Mannheim, Mannheim
DAPI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Desoxycholat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Desoxynucleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrophosphat	Merck, Darmstadt
Dinatriumtetraborat-Decahydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA	USB, Cleveland, OH, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCS	Invitrogen, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt
Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerol	USB, Cleveland, OH, USA
Glycin	USB, Cleveland, OH, USA
G418	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Hepes	Biomol, Hamburg
Instant-Magermilchpulver	Uelzena, Uelzen
Kaliumacetat	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid	USB, Cleveland, OH, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe
Kupfersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipofectamin Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	USB, Cleveland, OH, USA
Manganchlorid	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
MitoTracker® Red CMXRos	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS Dulbecco's -/- Mg/Ca	Invitrogen, Karlsruhe
PBS Dulbecco's +/- Mg/Ca	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Plus Reagens	Invitrogen, Karlsruhe
Polyacrylamid/bisacrylamid (29:1) 40%	Roth, Karlsruhe
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ProMix ³⁵ S-Methionin/Cystein	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Protease-Inhibitor Mix	Sigma, Taufkirchen
Protein A-Sepharose	GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, GB
Protein G-Sepharose	GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, GB
Rubidiumchlorid	Sigma, Deisenhofen

Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sarkosyl	USB, Cleveland, OH, USA
SDS	Roth, Karlsruhe
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	USB, Cleveland, OH, USA
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris	USB, Cleveland, OH, USA
Triton-X 100	USB, Cleveland, OH, USA
Tropix® I-Block™	Applied Biosystems, Forster City, CA, USA
Trypan Blau	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsininhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
Tunicamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween-20	USB, Cleveland, OH, USA
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe

5.3 Lösungen und Puffer

Anodenpuffer (5x) (Bio-Rad-System)	1 M Tris-HCl pH 8.9 H ₂ O ad 1000 mL
APS-Lösung	10% Ammoniumperoxodisulfat in PBS
Blockierungsmilch für Western Blot	5% Magermilchpulver in 1x PBS-T
Blockierungspuffer für IF BSA (100x)	5% Pferdeserum in 0,1% Tween-20 in PBS New England Biolabs, Schwalbach
Coomassie-Entfärbelösung	40% Methanol 7% Essigsäure
DNA-Probenpuffer(6x)	0.25% Bromphenolblau 30% Glycerol
Fixierlösung	40% Methanol 7% Essigsäure
Gelpuffer für SDS-Page (Bio-Rad-System)	3 M Tris-HCl pH 8,45 0,3% SDS
I-Block-Puffer	0,8 g I-Block 400 µL Tween-20 400 mL PBS
Kathodenpuffer (1x) (Bio-Rad-System)	0,1 M Tris-HCl 0,1 M Tricin 0,1% SDS H ₂ O ad 1000 mL
Laemmli-Probenpuffer (2x)	120 mM Tris pH 6.8 2% SDS 20% Glycerol 0.5% Bromphenolblau 2% Mercaptoethanol
Laemmli-Probenpuffer (4x)	240 mM Tris pH 6.8 4% SDS 40% Glycerol 1% Bromphenolblau 4% Mercaptoethanol
Laufpuffer für SDS-Page	250 mM Tris, pH 6.8 1,9 M Glycin

Lysepuffer A	1% SDS 0,5% Triton X-100 0,5% DOC in PBS
Lysepuffer B	0,1% Triton X-100 in PBS
Lysepuffer IP	0,5% Triton X-100 0,5% DOC + Proteaseinhibitor in PBS
MOPS (10x)	0,2 M MOPS 10 mM Natriumacetat 10 mM EDTA
Mowiol	6 g Glycerol 2,4 g Mowiol 6 mL H ₂ O
NaCl-Sten-Puffer	12 mL Tris-HCl pH 8.5 35 mL 5 M NaCl
Papain-Lösung	1 x Sten-Puffer ad 500 mL 200 U Papain 0,01 g Cystein 9,7 mL DMEM pH 7.2
PCR-Mix	1200 µL H ₂ O 200 µL 10x Pfu/Taq-Puffer je 2 µL dNTP
PBS (Zellkultur)	Gibco, BRL Life Technologies, Karlsruhe
PBS (10x)	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ H ₂ O ad 1000 mL
PBS-T (10x)	1% Tween-20 in 1x PBS
Pfu-Polymerase-Puffer	Promega, Mannheim
Ponceau S-Färbelösung	0,2 g Ponceau S 5 mL Essigsäure H ₂ O ad 100 mL
Puffer A	10 mM Tris 75 mM Natriumchlorid 3 M Guanidiniumhydrochlorid 250 µM Kupfersulfat 250 µM Zinksulfat
Sammelgelpuffer für SDS-Page (Hoefer-System)	0,5 M Tris pH 6.8 0,4 % SDS pH 6.8
SDS-Sten-Puffer	5 mL 10% Sten 1 x Sten-Puffer ad 500 mL
Shrimp-Alkaline-Phosphatase- puffer (10x)	Roche Diagnostics, Mannheim
Sten-Puffer (1x)	50 mM Tris pH 7.6 150 mM Natriumchlorid 2 mM EDTA 1 mL NP-40 H ₂ O ad 500 mL
T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Base 57,1 mL Eisessig 50 mM Na ₂ EDTA x 2H ₂ O, pH 8.0 H ₂ O ad 1000 mL
TBS	20 mM Tris-HCl, pH 7.6 136 mM NaCl
TBS-T	20 mM Tris-HCl, pH 7.6 136 mM NaCl 1% Tween-20
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7.5 1 mM EDTA, pH 8.0
TFB1-Puffer	30 mM Kaliumacetat 100 mM RbCl 10 mM CaCl ₂ 50 mM MnCl ₂ 15% Glycerol pH 5.8
TFB1-Puffer	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl 15% Glycerol pH 6.5
Transferpuffer für Western Blot (Biorad-System)	2,9 g/L Tris 14,5 g/L Glycin 20% Methanol
Transferpuffer für Western Blot (Hoefer-System)	20 mM Tris-Base 150 mM Glycin 0,01% SDS 20% Methanol
Trenngelpuffer für SDS-Page (Hoefer-System)	1,5 M Tris, pH 8.8 0,4% SDS pH 8.8
Tunicamycin	10 mg/mL in H ₂ O

5.4 Medien

<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> 1x (HBSS)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Minimal Essential Medium (MEM)</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Minimal Essential Medium</i> ohne L-Methionin	Invitrogen, Karlsruhe
Neurobasal® Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Optimem	Invitrogen, Karlsruhe
LB-Medium	1% NaCl 1% Bacto Trypton 0,5% Hefeextrakt 100 µg/mL Ampicillin beziehungsweise 30 µg/mL Kanamycin (nach dem Autoklavieren)

LB-Agar	LB-Medium + 1,5% Bacto Agar 100 µg/mL Ampicillin beziehungsweise 30 µg/mL Kanamycin (nach dem Autoklavieren)
---------	---

5.5 Kits

ECL RPN 2106 Immobilon Western Chemolumineszenz HRP-Substrat Chemolumineszenz HRP-Substrat Nucleospin Mini-Kit Nucleospin Gelextraktionskit Endofree Plasmid Maxi Kit <i>Luciferase Assay System</i> mit Reporter Lyse Puffer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg Millipore, Schwalbbach GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK Millipore, Billerica, MR, USA Macherey, Nagel, Düren Macherey, Nagel, Düren Qiagen, Hilden Promega
---	---

5.6 Geräte

Agarosegel- -Elektrophoresekammern Analysenwaage Mettler Toledo AG285 Brutschränke Bio-Rad-Kammer Mini-Proteon® 3 Cell ChemiDot Imager Fujifilm LAS-4000 Filmentwickler X-Omat Geltrockner SGD300 Kühlschrank AEG Öko Santo Kühlzentrifuge GS-6R mit Rotor GH3.8 Kühlzentrifuge J2-21M mit Rotor JA-14 Kultur-Schüttler Forma Scientific4518 Luminometer LB96V Luminometer Mithras LB 940 Mikroskop Axiovert 25, 200M Mikroskop Axioscope 2 plus (Software Axiovision) Mikroskop Leica KL 200 LED Mikrowelle pH-Meter Phosphoimager FLA-2000 (mit Software AIDA) Pipetten (P2, P10, P20, P100,	Zentralwerkstatt, MPI, Martinsried Mettler, Toledo GmbH, Giessen Heraeus, Hanau Bio-Rad, Hercules, CA, USA Fujifilm Life Science, Stamford, CT, USA Kodak, Stuttgart Savant, Holbrook, NY, USA AEG, Frankfurt am Main Beckmann, Unterschleissheim Beckmann, Unterschleissheim ThermoQuest, Egelsbach Berthold Technologies, Bad Wildbad Berthold Technologies, Bad Wildbad Carl Zeiss, Göttingen Carl Zeiss, Göttingen Leica, Wetzlar Sharp, Osaka, Japan Fischer Scientific, Nidderau Fuji Photo Film, Düsseldorf Gilson Abimed, Langenfeld
--	---

P200, P1000)	
Pipettierhilfe Pipet-aid	Drummond Scientific, Bromall, PA, USA
Polyacrylamid-Elektrophorese-Kammer Hoefer SE6000	Amersham Biosciences, Freiburg
Power Supply EPS	Amersham Biosciences, Freiburg
Power Supply EPS 2A200	Amersham Biosciences, Freiburg
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Vancouver, Kanada
Reinstwasseranlage Milli-QPLUS	Millipore, Eschborn
Schwenktisch GFL 3017	Merck Eurolab, Ismaning
Spektralphotometer DU-640	Beckmann, Unterschleissheim
T1 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Transferkammer Hoefer TE-Serie	Amersham Biosciences, Freiburg
Überkopfmischer Heidolph REAX 2	Merck Eurolab, Ismaning
Ultraschallbad	Roth, Karlsruhe
UV-Tisch Foto/UV 21	Fotodyne, Hartland, WI, USA
Vortex	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Waage Mettler Toledo PB602	Mettler, Toledo GmbH, Giessen
Wasserbad MT	Roth, Karlsruhe
Zählkammer, Neubauer	Merck Eurolab, Ismaning
Zellkulturschränke Forma Scientific 3111	ThermoQuest, Egelsbach
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

5.7 Sonstige Materialien

Deckgläschen (diverse Grössen)	neoLab, Heidelberg und Roth, Karlsruhe
Elutip-D Minisäulchen	Schleicher & Schuell, Dassel
Einmalkanülen Neolus 21G, 23G, 27G	Terumo, Tokyo, Japan
Einmalpipetten, steril	Nunc, Wiesbaden
Einmalspritzen 20 mL, 50 mL	Braun, Melsungen
Expositionskassetten für Röntgenfilme	Fischer Scientific, Nidderau
Objektträger 76 x 26 mm	neoLab, Heidelberg
Indikatorpapier	Merck, Darmstadt
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen der Gilson P-Serie	Continental Lab Products, San Diego, CA, USA
Polypropylen-Zentrifugenröhren 15 mL, 50 mL	Falcon, Heidelberg
Polysterol-Röhrchen, steril, 18 x 95 mm	Greiner, Frickenhausen
Protran Nitrocellulose	Schleicher & Schuell, Dassel
ProbeQuant G50 Säulchen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Safe-Lock Micro Test Tubes	Eppendorf, Hamburg
Schraubdeckel-Reaktionsgefäße 1,5 mL, 2 mL	Sarstedt, Nürnberg
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 mL	Abgene, Hamburg
Röntgenfilme Kodak	Sigma, Deisenhofen
Röntgenfilme Fuji	Fujifilm Deutschland, Düsseldorf
Skalpellklinge	Bayha, Tuttlingen
Sterilfilter Millex®-HA 0,45 µm	Millipore, Eschborn
Sterilfilter Millex®-HA 0,22 µm	Millipore, Eschborn
Whatman Chromatographie- -Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkultur 6-well Platte	Nunc, Wiesbaden
Zellkultur 12-well Platte	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen	BD Biosciences Falcon, Heidelberg
Zellkulturschalen 3,5, 6, 10 cm	BD Biosciences Falcon, Heidelberg
Zellkulturschalen Easy Grip 3,5 cm	BD Biosciences Falcon, Heidelberg
Zellschaber	Corning Life Sciences, Pittston, PA, USA

6 Methoden

6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) dient zur selektiven Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase und Oligonukleotiden (*Primer*) (Saiki et al. 1988). Im Zuge dieser Arbeit wurden mehrere Konstrukte unter Verwendung des Standard-PCR-Verfahrens generiert.

6.1.1 Standard-PCR-Methode und Ligation

Die Standard-PCR-Methode wurde verwendet, um das gewünschte DNA-Fragment zu amplifizieren, Restriktionsschnittstellen einzufügen und anschließend mit einem Vektor zu ligieren (Abb. 42). Hierfür wurde der Matrizen-Strang, Primer 1 und 2, dNTP's und die Pfu-DNA-Polymerase in einem geeigneten Reaktionspuffer vermischt und die PCR mit den unter Abschnitt 6.1.2 beschriebenen PCR-Programm durchgeführt.

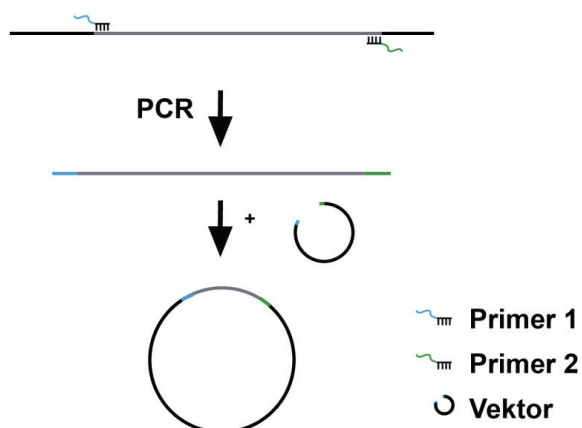


Abb. 42. Schematische Darstellung der Klonierung verschiedener Konstrukte mittels Standard-PCR.

Für die Klonierung eines Konstrukts in einem bestimmten Vektor wurde der Matrizen-Strang mittels PCR unter Verwendung des Primer 1 und 2, dNTP's und der Pfu-DNA-Polymerase in einem geeigneten Reaktionspuffer amplifiziert. Nach der Aufreinigung wurde das DNA-Fragment mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und mit dem bereits verdauten und dephosphorylierten Vektor ligiert.

Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut und anschließend mit einem Vektor ligiert, der bereits mit denselben Restriktionsenzymen verdaut und dephosphoryliert worden war. Nach der Hitzeinaktivierung der Enzyme (65°C, 20 min) wurde der Ligationsansatz in kompetente Bakterien (DH5 α) transformiert, 14 h bei 37°C in einem Schüttler inkubiert und mittels Nucleospin Mini-Kit aus den Bakterien isoliert. Das erhaltene Plasmid wurde anschließend sequenziert (vgl. Abb. 6.1.3).

6.1.2 PCR-Bedingungen

Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung von 100 ng Matrizen-DNA, je 4 pmol Primer 1 und 2, je 0,25 mM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 2,5 U DNA-Polymerase (*Pfu*) durchgeführt. Hierfür wurden die angegebenen Reagenzien auf Eis in Pfu-Reaktionspuffer zusammen pipettiert, wobei die *Pfu*-Polymerase als Letztes direkt vor dem Start der PCR hinzugegeben wurde. Bei der Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente wurde folgendes Standardprogramm verwendet (Tabelle 6).

Tabelle 6. Standardprogramm zur Amplifikation der DNA-Fragmente unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase.

Schritt	Temperatur	Dauer	
1	Denaturierung	96°C	3´
2	Denaturierung	96°C	45´´
3	Primer-Anlagerung	52-58°C	45´´
4	Elongation	72°C	2´
5	Finale Elongation	72°C	10´
6	Ende	4°C	unbegrenzt

In diesem Programm wurden die Schritte 2 bis 4 insgesamt 28 Mal wiederholt. Die Temperatur während der Primer-Anlagerung wurde in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur des Primers ausgewählt.

Nach erfolgter PCR wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese isoliert und unter Verwendung des Nucleospin Gelextraktionskits (Macherey) aufgereinigt. Das weitere Vorgehen wird in Abschnitt 6.1.1 beschrieben.

6.1.3 Sequenzierung

Um die Korrektheit des DNA-Fragments zu überprüfen, wurde die DNA von der Firma GATC Biotech (Konstanz) sequenziert. Die DNA-Sequenzierung wurde mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt (Sanger et al. 1992, 1977).

6.1.4 Generierung der PrP-Konstrukte

6.1.4.1 PrP-Konstrukte verschiedener Spezies

Die PrP-Konstrukte der verschiedenen Spezies wurden aus genomischer DNA amplifiziert und in den pcDNA3.1(Zeo+) Vektor (Invitrogen) eingefügt. Als Restriktionsschnittstellen wurden am 5´-Ende Hind III (Primer 1) und an dem 3´-Ende Not I (Primer 2) verwendet (Tabelle 7).

Tabelle 7. Übersicht über die generierten PrP-Konstrukte.

Konstrukt	Primer 1	Primer 2	GenBank™ Nummer
Hamster-PrP	PrP_ham_fw	PrP_ham_rev	P04273
Rind-PrP	PrP_bov_fw	PrP_bov_rev	AAQ64648
Wapiti-PrP	PrP_wap_fw	PrP_wap_rev	ABW79904
Mensch-PrP	PrP_hum_fw	PrP_hum_rev	AAA60182

6.1.4.2 PrP-Fc-Fusions-Konstrukte

Es wurden PrP-Fc-Fusions-Konstrukte generiert, die entweder den N-Terminus (AS 1-120), den C-Terminus (AS 90-231) oder die ER-Signalsequenz von Maus-PrP^C (GenBank™ Nummer NP 035300), fusioniert mit einem Fc-Teil des humanen IgG₁ enthielten. Die DNA-Fragmente wurden aus dem PrP^C-Matrizenstrang amplifiziert und in den pFUSE-hlgG1-Fc1 Vektor (InvivoGen) eingefügt. Als Restriktionsschnittstellen wurden am 5'-Ende EcoRI (Primer 1) und an dem 3'-Ende Xho I (Primer 2) verwendet (Tabelle 8).

Tabelle 8. Übersicht über die generierten PrP-Fc-Fusions-Konstrukte.

Konstrukt	AS von PrP	Primer 1	Primer 2
N.PrP/Fc	1-120	PrP_fw	PrP_N-term_rev
PrP.C/Fc	90-231	PrP_fw	PrP_ΔGPI_rev
SS/Fc	1-23	PrP_fw	PrP_SS_rev

6.1.5 Weitere verwendete Konstrukte

Weitere Konstrukte wurden entweder von vorherigen Doktoranden generiert oder von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Die Konstrukte mit den entsprechenden Referenzen sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9. Übersicht über weitere Konstrukte.

Die bereits im Labor vorhandenen Konstrukte wurden in den entsprechenden Referenzen beschrieben.

Konstrukt	Merkmal	Referenz
PrP	Maus-PrP ^C ; Wildtyp	(Winklhofer et al. 2003)
PrP Δ N	Maus-PrP ^C ; Deletion AS 27-89	(Winklhofer et al. 2003)
PrP-CD4	Maus-PrP ^C ; Austausch der GPI-SS mit CD4-TM-Domäne	(Winklhofer et al. 2003)
PrP Δ HD	Maus-PrP ^C ; Deletion AS 112-135	(Winklhofer et al. 2003)
HSE-Luc	Luziferase; Promotor: humanen Hsp70B Gens	(Voellmy et al. 1985)
Hsp72	EYFP-Hsp72	(Kim et al. 2002)
Δ HSF	Deletion AS 202-316	(Zuo et al. 1995; Winklhofer et al. 2001)
wtHSF	Wildtyp-HSF1	(Zuo et al. 1995; Winklhofer et al. 2001)
GFP-GPI	GPI-verankertes GFP	(Rambold et al. 2008)
Clusterin	Humanes Clusterin	Mark R. Wilson, University of Wollongong, New South Wales, Australia

6.2 Bakterienkultur

6.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien des *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stammes DH5 α wurde die Methode nach Sambrook verwendet (Sambrook et al. 1989). Hierbei wird die Bakterien-Zellwand mittels divalenter Kationen destabilisiert und somit für Plasmid-DNA permeabel gemacht. Zunächst wurden 2 mL *Luria Broth* (LB)-Medium mit einer Bakterienkolonie beimpft und als Vorkultur für 16 h bei 37°C geschüttelt. Nach der Inkubation wurde die Vorkultur in 250 mL LB-Medium gegeben, etwa 2-3 h bei 37°C geschüttelt bis ein OD₅₉₀-Wert zwischen 0,4 und 0,6 erreicht war. Anschließend wurde die Kultur für 5 min bei 4°C mit 3750 rpm zentrifugiert, das Zellpellet in 100 mL TFB1-Puffer resuspendiert und weitere 5 min bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde nochmals für 5 min bei 4°C mit 3750 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 10 mL TFB2-Puffer resuspendiert und 30-60 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden jeweils 100 μ L der Bakteriensuspension aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

6.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Um kompetente Bakterien zu transformieren (Sambrook et al. 1989), wurde ein Aliquot der Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 100 bis 1000 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 90 Sekunden bei 42°C und anschließend für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde unter semi-sterilen Bedingungen, d.h. an der Bunsenbrenner-Flamme, 400 µL LB-Medium (ohne Antibiotikum) dazugegeben. Diese Bakteriensuspension wurde anschließend für 1-1,5 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 150 µL der Bakteriensuspension unter semi-sterilen Bedingungen auf einer Agarose-Platte ausplattiert, wobei diese das jeweilige Antibiotikum enthielt, gegen das die transformierte Plasmid-DNA eine Resistenz aufweist. Die Agarose-Platte wurde etwa 17 h bei 37°C inkubiert.

6.2.3 DNA-Präparation aus Bakterien

Um die Plasmid-DNA aus den Bakterien zu isolieren, wurde das Nucleospin-Mini- oder Endofree-Plasmid-Maxi-Kit verwendet. Hierbei wurde nach den Angaben des Herstellers Macherey beziehungsweise Quiagen vorgegangen.

6.3 Zellkultur

6.3.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zelllinien wurden als adhärenente Einzelzellrasen in Zellkulturflaschen beziehungsweise –schalen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Die murinen Neuroblastomzelllinien (N2a und ScN2a) wurde in MEM (*Minimal Essential Medium*) kultiviert. Dem Medium wurden 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 1% Antibiotika-Lösung (Endkonzentration: 1 U/mL Penicillin G und 1 µg/mL Streptomycin) und 2 mM Glutamin zugesetzt. Das Medium der ScN2a Zellen wurde zusätzlich mit 5 mg G418 (Endkonzentration 10 mg/L) versetzt.

Die humane Neuroblastomzelllinie (SH-SY5Y) wurde in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) kultiviert. Dem Medium wurden 8% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum, 1% Antibiotika-Lösung (Endkonzentration: 1 U/mL Penicillin G und 1 µg/mL Streptomycin) und 2 mM Glutamin zugesetzt.

Die CHO- und CHO-7PA2-Zelllinie (Ovarialzellen des chinesischen Hamsters) wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) kultiviert. Dem Medium wurden 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum, 1% Antibiotika-Lösung (Endkonzentration: 1 U/mL Penicillin G und 1 µg/mL Streptomycin), 2 mM Glutamin und 10.5 µg/mL Prolin zugesetzt. Das Medium der CHO-7PA2 Zellen wurde zusätzlich mit 5 mg G418 (Endkonzentration 10 mg/L) versetzt.

6.3.2 Passagierung der Zellen

Zur Passagierung der verschiedenen Zelllinien wurde nach dem folgenden Verfahren vorgegangen. Das jeweilige Medium und PBS (ohne Calcium und Magnesium)(-/-) (Gibco) wurden 30 min bei 37°C und das Trypsin 30 min bei Raumtemperatur aufgewärmt. Die Zellen wurden zweimal mit 7 mL PBS(-/-) gewaschen, mit 0,5 mL Trypsin versetzt und nach entsprechender Inkubationszeit durch vorsichtiges Klopfen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in Vollmedium aufgenommen und in eine sterile Zellkulturflasche, in der 7 mL Vollmedium vorgelegt war, pipettiert. Die Zellen wurden je nach Linie alle 2-4 Tage passagiert.

6.3.3 Ausplattieren

Zum Ausplattieren der Zellen wurden die Medien und das PBS(-/-) für 30 min bei 37°C und das Trypsin 30 min bei Raumtemperatur aufgewärmt. Die Zellen wurden zweimal mit 7 mL PBS(-/-) gewaschen, mit 0,5 mL Trypsin versetzt und nach entsprechender Inkubationszeit durch vorsichtiges Klopfen vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in 7,5 mL Vollmedium aufgenommen. Die Menge der Zellen in der Suspension wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. In Abhängigkeit von der Zelllinie und von dem Kultivierungszeitraum wurde eine bestimmte Zellmenge in einer 12-well Platte (1 mL Vollmedium), einer 3,5 cm Schale (2 mL Vollmedium), 6 cm Schale (3 mL Vollmedium) oder 10 cm Schale (9 mL Vollmedium) ausplattiert. Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden vor dem Ausplattieren sterile Deckgläschen in der Schale platziert.

6.3.4 Transfektion

20 h nach Ausplattieren wurden die Zellen zweimal mit auf 37°C vorgewärmtem Medium ohne Zusätze gewaschen. Für die Transfektion wurde das Transfektions-Kit Lipofectamin (Invitrogen) verwendet. Die Zellen wurden mit Plasmid-DNA nach den Angaben des Herstellers in OPTIMEM transfiziert. Nach 2 h (SH-SY5Y Zellen) oder 3 h (N2a/ScN2a/CHO/CHO-7PA2 Zellen) Inkubation wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und die Zellen mit 2 mL Vollmedium versetzt.

6.3.5 Zellernte

16-24 h nach Transfektion wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS(-/-) gewaschen und in 0,5 mL eiskaltem PBS(-/-) auf Eis mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Die Zellen wurden für 10 Sekunden bei 12.000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet auf Eis weiterverarbeitet.

6.3.6 Isolierung und Kultivierung primärer kortikaler Neuronen

Die PrP-*Knockout*-Mäuse sind ursprünglich von der Arbeitsgruppe von Charles Weissmann generiert worden (Büeler et al. 1992). Hans Kretzschmar stellte uns freundlicherweise Wildtyp (PrP^{+/+})- und PrP-*Knockout* (PrP^{0/0})-Mäuse zur Verfügung. Die primären kortikalen Neuronen wurden aus PrP^{+/+} oder PrP^{0/0} 14,5–15,5 dpc (*days post coitum*) Mausembryonen isoliert. Die Gehirne wurden entnommen, die Meningen entfernt und die Kortizes in HBSS (+ 10 mM HEPES) überführt. Die isolierten Kortizes wurden mit aktivierter Papain-Lösung versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Kortizes mit DMEM (+10% FCS) gewaschen, mit 5 mL DMEM (+10% FCS) versetzt und mit Hilfe einer 2 mL Pipette tituiert. Die Suspension wurde mit 1000 rpm 4 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem DMEM (+10% FCS) aufgenommen und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Neuronen wurden in einer Poly-L-Lysin (100 µg/mL)-beschichteten 3,5 cm Schale mit einer Dichte von 1,3-1,4 x 10⁶ ausplattiert. Für Immunfluoreszenz-Analysen enthielten die Schalen Deckgläschen. Nach 4 h erfolgte ein Mediumwechsel zu Neurobasalmedium, das mit B27® supplement minus AO 50x (1x), basische Fibroblasten Wachstumsfaktor (10 ng/mL),

Nervenwachstumsfaktor (10 ng/mL) und L-Glutamin (0,5 mM) versetzt war. Die primären kortikalen Neurone wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

6.3.7 Beschichtung von Zellkulturschalen

Die Zellkulturschalen wurden mit einer sterilfiltrierten Beschichtungslösung, die 1,91% Natriumborat, 1,25% Borsäure und 1 mg Poly-L-Lysin pro 10 mL Lösung enthielt, für 16-24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schalen mehrmals mit sterilem, bidestilliertem Wasser gewaschen.

6.4 Protein- und Nukleinsäureanalytik

6.4.1 Gesamtzelllysat

Um Proteine im Gesamtlysat untersuchen zu können, wurden die Zellpellets in 0,5% TritonX-100/DOC oder 0,1% Triton X-100 für 10 min bei 4°C lysiert, wobei dem Lysepuffer ein Protease-Inhibitor-Mix in der Verdünnung 1:500 zugesetzt war. Nach Inkubation wurde das Zelllysat mit Laemmli-Proben-Puffer (mit oder ohne β -Mercaptoethanol) versetzt, 10 min bei 95°C inkubiert und die übrigen Zelltrümmer mit Hilfe einer Spritze mit einer Einmalkanüle der Größe 27G geschert und mittels Western Blot analysiert.

6.4.2 Nachweis der Löslichkeit im Lysat

Um die Löslichkeit von Proteinen in Detergentien zu untersuchen, wurden die Zellpellets in 0,5% TritonX-100/DOC für 10 min bei 4°C lysiert, wobei dem Lysepuffer ein Protease-Inhibitor-Mix in der Verdünnung 1:500 zugesetzt war. Nach Inkubation wurde das Zelllysat für 20 min bei 4°C zentrifugiert, wobei das Lysat in eine lösliche (S) und unlösliche (P) Fraktion geteilt wurde. Beide Fraktionen wurden mit Laemmli-Proben-Puffer versetzt, 10 min bei 95°C inkubiert, die übrigen Zelltrümmer mit Hilfe einer Spritze mit einer Einmalkanüle der Größe 27G geschert und mittels Western Blot analysiert.

6.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Gesamtproteinmenge der Zellysate wurde mit Hilfe des Protein Assay Kits nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Hierbei wurde nach Angaben des Herstellers Bio-Rad vorgegangen.

6.4.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli

Die Proteine im Zellysat wurden mittels eindimensionaler diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli analysiert (Laemmli 1970). Hierfür wurden SDS-Gele mit einem 4%igen Polyacrylamid-Sammelgel und einem 8-12%igen Polyacrylamid-Trenngel hergestellt. Die Polyacrylamid-Konzentration des Trenngels wurde je nach Größe des zu untersuchenden Proteins gewählt. Die Gelelektrophorese wurde bei 150-220 V in einer Hoefer-SE600-Kammer durchgeführt.

6.4.5 Schägger Gele

Anhand der Gelelektrophorese nach Schägger und Jagow können Proteine bis zu einem Molekulargewicht von 1 kDa analysiert werden (Schagger and von Jagow 1987). Das SDS-Gel besteht aus einem 4%igen Polyacrylamid-Sammelgel und einem Trenngel, das sich aus zwei Schichten zusammensetzt: die untere Schicht mit 16,5% Polyacrylamid und die obere Schicht mit 10% Polyacrylamid. Die Gelelektrophorese wurde bei 80-120 V in einer Bio-Rad-Kammer durchgeführt.

6.4.6 Proteintransfer auf Nitrozellulose (Western Blot)

Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE nach Laemmli oder Schägger wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran mit der Porengröße 0,45 μm transferiert. Hierbei wurden je nach SDS-PAGE-Methode folgende Parameter verwendet.

Nach Laemmli 90 min bei einer konstanten Stromstärke von 1000 mA

Nach Schägger 60 min bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA

6.4.7 Ponceau S-Färbung

Um die Effizienz des Proteintransfers zu überprüfen, wurde die Nitrozellulose-Membran mit einem roten Azofarbstoff Ponceau S reversibel angefärbt. Hierfür wurde die Membran für 2 min in der Farbstoff-Lösung geschwenkt und in Wasser entwickelt.

6.4.8 Immundetektion der Proteine

Nach dem Proteintransfer und gegebenenfalls der Ponceau S-Färbung wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Nitrozellulose-Membran geblockt, indem die Membran 1 h im Blockierungspuffer geschwenkt wurde. Um die gewünschten Proteine auf der Membran zu detektieren, wurden diese in dem jeweiligen Antikörper für 16-20 h bei 4°C geschwenkt. Nach Inkubation wurde die Membran dreimal je 10 min in PBS-T gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden sekundären Antikörper, an dem das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde nochmals dreimal je 10 min in PBS-T gewaschen und schließlich mit einem HRP-Substrat inkubiert. Das HRP wird in einer enzymatischen Reaktion umgesetzt, wobei Chemilumineszenz entsteht, die mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert werden kann. Somit können die Proteine auf dem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Für die Quantifizierung der Chemilumineszenz wurde ein ChemiDot Imager (Fujifilm LAS-4000) genutzt. Die Intensität der Hsp72-Bande wurde auf β -Aktin normalisiert. Die Werte der CHO-7PA2 Zellen wurden innerhalb eines Versuches auf die Werte der gleichbehandelten CHO Zellen bezogen.

Um A β detektieren zu können, wurden die Nitrozellulose-Membran nach dem Proteintransfer 10 min in PBS(-/-) gekocht und anschließend 1 h in I-Block-Puffer geschwenkt. Nachdem die Membran im jeweiligen Antikörper für 16-20 h bei 4°C geschwenkt worden war, wurde die Membran dreimal je 10 min in TBS gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden sekundären Antikörper, an dem das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde dreimal je 5 min in TBS gewaschen, mit einem HRP-Substrat inkubiert und entwickelt.

6.4.9 Immunpräzipitation von PrP

Die Zellen wurden in 0,5% TritonX-100/DOC für 10 min bei 4°C lysiert und anschließend für 20 min bei 4°C zentrifugiert, wobei das Lysat in einen löslichen Überstand (S) und ein unlösliches Pellet (P) geteilt wurde. Das unlösliche Pellet wurde in 0,5% TritonX-100/DOC/Sarkosyl/1% SDS aufgenommen, 10 min bei 95°C gekocht und mit 0,5% TritonX-100/DOC/Sarkosyl versetzt. Beiden Fraktionen wurde der Anti-PrP Antikörper zugesetzt und über Nacht bei 4°C mit Hilfe eines Überkopfschwenkers (ÜKS) geschwenkt. Nach der Inkubation wurde den Proben Protein A oder G-Sepharose zugesetzt und 1-1,5 h bei 4°C unter Verwendung des ÜKS inkubiert. Der Antigen-Antikörper-Protein A/G-Sepharose-Komplex wurde mittels Zentrifugation (6000 rpm, 5 min, 4°C) pelletiert, zweimal mit 0,5% TritonX-100/DOC/Sarkosyl und einmal mit 0,5% TritonX-100/DOC gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Pellets mit Laemmli-Proben-Puffer aufgenommen und 10 min bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden mittels Western Blot analysiert

6.4.10 Immunpräzipitation von A β

Um A β im konditionierten Medium zu analysieren, wurde das Medium von den CHO oder CHO-7PA2 Zellen abgenommen, 10 Sekunden bei 12.000 rpm zentrifugiert und der zellfreie Überstand in ein neues Probengefäß überführt. Das Medium wurde mit Protease-Inhibitor-Mix und einem Anti-A β Antikörper versetzt und 2 h bei 4°C mit Hilfe eines ÜKS geschwenkt. Nach der Inkubation wurde dem Medium Protein A-Sepharose zugesetzt und 16-20 h bei 4°C unter Verwendung des ÜKS inkubiert. Der Antigen-Antikörper-Protein A-Sepharose-Komplex wurde mittels Zentrifugation (6000 rpm, 5 min, 4°C) pelletiert und jeweils einmal mit dem NaCl-Sten-Puffer, SDS/Sten-Puffer und Sten-Puffer für 20 min bei 4°C mit Hilfe des ÜKS gewaschen. Die Sepharose-Kügelchen wurden stets durch Zentrifugation (6000 rpm, 5 min, 4°C) pelletiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Pellets mit Laemmli-Proben-Puffer aufgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden mittels Western Blot unter Verwendung eines Anti-A β Antikörpers analysiert.

6.4.11 Nachweis von GPI-verankerten Oberflächenproteinen

Zur Analyse von GPI-verankerten Oberflächenproteinen wurden die Zellen mit dem entsprechenden Konstrukt transient transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS (mit Calcium und Magnesium)(+/+) gewaschen und mit der Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) in PBS(+/+) für 3 h bei 37°C inkubiert. Wasser wurde als Kontrolle verwendet. Nach Inkubation wurde das Medium abgenommen, 10 Sekunden bei 12.000 rpm zentrifugiert und der zellfreie Überstand in ein neues Probengefäß überführt. Die Proteine im Medium wurden mittels TCA-Fällung (vgl. Abschnitt 6.4.12) isoliert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und mit Laemmli-Proben-Puffer gekocht. Die Proteine im Zelllysate (L) oder im Medium (M) wurden mittels Western Blot analysiert.

6.4.12 Nachweis der Sekretion

Die von Zellen sekretierten Proteine wurden mittels TCA-Fällung im Medium nachgewiesen. Hierfür wurden die Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transient transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen und 3 h bei 37°C in serumfreiem Medium inkubiert. Nach Inkubation wurde das Medium abgenommen, 10 Sekunden mit 12.000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der zellfreie Überstand in ein neues Probengefäß überführt. Die sekretierten Proteine im Medium wurden mittels Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Hierfür wurde das Medium mit TCA (Endkonzentration 5%) versetzt, 10 min bei 4°C inkubiert und 10 min mit 12.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal mit Aceton gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend in Laemmli-Proben-Puffer aufgenommen und 10 min bei 95°C gekocht. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und mit Laemmli-Proben-Puffer gekocht. Die Proteine im Zelllysate (L) oder im Medium (M) wurden mittels Western Blot analysiert.

6.4.13 Indirekte Immunfluoreszenz

Um die Expression von Proteinen mittels indirekter Immunfluoreszenz nachzuweisen, wurden die Zellen zweimal mit 37°C-aufgewärmtem PBS(+/+) gewaschen und auf den Deckgläschen mit 3,7% Paraformaldehyd fixiert (20 min

bei Raumtemperatur). Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem PBS(-/-) gewaschen und mit Hilfe von 0,2% Triton X-100 (in PBS(-/-)) permeabilisiert. Nach 10-minütiger Inkubation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS(-/-) gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen mit Hilfe eines Blockierungspuffers blockiert (1 h bei Raumtemperatur). Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem PBS(-/-) gewaschen und für 16-20 h bei 4°C mit den entsprechenden primären Antikörpern inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS(-/-) und 0,1% Tween-20 (in PBS(-/-)) gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit sekundären Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten IgG Antikörpern (Alexa) inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit eiskaltem PBS(-/-) und 0,1% Tween-20 (in PBS(-/-)) wurden die Zellen in Mowiol eingebettet. Um die Kerne zu färben, wurden entweder die Zellen vor dem Einbetten für 10 min mit ToPro in PBS(-/-) (1:10.000) inkubiert oder es wurde der Mowiol-Lösung Dapi (1 µg/mL) zugesetzt. Die Präparate wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung des Zeiss Axiovert 200M oder Axioscope 2 plus Mikroskops (Carl Zeiss) analysiert.

6.4.14 Co-Kultivierungsexperimente der SH-SY5Y Zellen

Für Co-Kultivierungsexperimente wurden SH-SY5Y Zellen auf Glasdeckgläschen kultiviert und mit den jeweiligen Konstrukten transient transfiziert. 2 h nach Transfektion wurden die Deckgläschen in Schalen, die eine 90% konfluente Zellschicht der N2a, ScN2a, CHO oder CHO-7PA2 Zellen enthielten, überführt. Nach 16 h Co-Kultivierung wurde die Apoptoserate oder die mitochondriale Integrität der SH-SY5Y Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert.

6.4.15 Apoptose-Assay

Für die Quantifizierung der Apoptoserate wurden die SH-SY5Y Zellen auf Deckgläschen fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des aktiven Caspase 3-Antikörpers analysiert (vgl. Abschnitt 6.4.13). Der Anteil der aktiven Caspase 3-positiven Zellen oder der Anteil der Zellen mit fragmentiertem Zellkern von mindestens 1000 transfizierten Zellen wurde bestimmt. Alle Quantifizierungen basieren auf mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Um die Expressionsmengen der jeweiligen

Konstrukte zu überprüfen, wurden parallel geernteten Zellen mittels Western Blot analysiert.

6.4.16 Analyse der mitochondrialen Morphologie von SH-SY5Y Zellen

Um die mitochondriale Morphologie der SH-SY5Y Zellen nach der Co-Kultivierung mit ScN2a oder N2a Zellen zu analysieren, wurden die Zellen vor dem Fixieren mit MitoTracker® Red CMXRos (Invitrogen) (Endkonzentration 100 nM) inkubiert. Die Anzahl der SH-SY5Y Zellen mit nicht-tubulären, fragmentierten Mitochondrien von mindestens 500 transfizierten Zellen wurden bestimmt. Alle Quantifizierungen basieren auf mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten.

6.4.17 Behandlung mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT

Um die Generierung von A β zu verhindern, wurden die CHO-7PA2 Zellen mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT ((N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester)) (Endkonzentration 1 μ M) für 24 h behandelt. Nach Inkubation wurde A β im konditionierten Medium mittels Immunpräzipitation und anschließender Western Blot Analyse untersucht. Um den Effekt der fehlenden A β Generation in dem Co-Kultivierungsexperiment zu analysieren, wurden die CHO-7PA2 oder CHO Zellen 24 h vor und während der Co-Kultivierung mit DAPT (Endkonzentration 1 μ M) behandelt.

6.4.18 Behandlung mit einem Hefeprion-Protein NM

Die NM-Stammlösung wurde in Kollaboration mit der Gruppe von Susan Lindquist nach der bereits beschriebenen Methode hergestellt (Scheibel et al. 2001). Transient transfizierte SH-SY5Y Zellen wurden mit vernetzten, niedermolekularen NM Oligomeren (Endkonzentration 500 nM) oder dem Puffer A als Kontrolle behandelt. Nach 7 h Inkubation wurde die Apoptoserate bestimmt (vgl. Abschnitt 6.4.15).

6.4.19 Behandlung mit einem *de novo* entworfenen Peptid

Die Stammlösung des *de novo* entworfenen β -Peptids und des α -Peptids wurden in Kollaboration mit der Gruppe von Ullrich Hartl nach der bereits beschriebenen Methode hergestellt (Olzscha et al. 2011; West et al. 1999). Für die Analyse der Apoptoserate wurden SH-SY5Y Zellen transient transfiziert und mit dem β -Peptid, α -Peptid (Endkonzentration 200 nM) oder PBS behandelt. Nach 12 h Inkubation wurde die Apoptoserate bestimmt (vgl. Abschnitt 6.4.15).

6.4.20 Behandlung mit dem NMDA-Rezeptor-Antagonisten Memantin

Um den Effekt des NMDA-Rezeptor-Antagonisten Memantin auf die Apoptoserate co-kultivierter oder mit dem β -Peptid behandelter SH-SY5Y Zellen zu analysieren, wurden die SH-SY5Y Zellen 1 h vor und während der Co-Kultivierung beziehungsweise β -Peptid-Behandlung mit Memantin (Endkonzentration 10 μ M) inkubiert. Wasser wurde als Kontrolle verwendet. Die Apoptoserate wurde, wie in den entsprechenden Abschnitten beschrieben, bestimmt (vgl. Abschnitt 6.4.14 und 6.4.19).

6.4.21 Behandlung mit dem Oligomer-spezifischen Antikörper A11

Um den Effekt des Oligomer-spezifischen Antikörpers A11 auf die Apoptoserate co-kultivierter Zellen zu analysieren, wurden die N2a, ScN2a, CHO, CHO-7PA2 Zellen 1 h vor und während der Co-Kultivierung mit dem Antikörper A11 (Endkonzentration 1 μ g/mL) oder Kontrollserum inkubiert. Die Apoptoserate wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz bestimmt (vgl. Abschnitt 6.4.14).

6.4.22 Proteinase K-Verdau

Um PK-resistentes Material nachzuweisen, wurden die ScN2a oder N2a Zellen geerntet, in Lysepuffer B lysiert und mit Proteinase K (Endkonzentration 10 μ g/mL) für 30 min bei 37°C inkubiert. Der PK-Verdau wurde mit 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) abgestoppt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis, wurde dem Zelllysats Laemmli-Proben-Puffer zugesetzt und 10 min bei 95°C gekocht. Anschließend wurde die Probe mit Hilfe einer Spritze

mit einer Einmalkanüle der Größe 27G geschert und mittels Western Blot analysiert.

6.4.23 Co-Kultivierungsexperimente und Behandlung primärer Neuronen

Für Co-Kultivierungsexperimente wurden die primären kortikalen Neuronen direkt nach ihrer Isolierung in Poly-L-Lysin-beschichtete Schalen ausplattiert, die eine 20% konfluente Schicht der ScN2a oder N2a Zellen enthielten. Nach 4 oder 5 Tagen in Kultur wurden die Neuronen mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Für die Analyse der Überlebensrate der Neurone und der Länge der Dendriten wurden die primären Neuronen mit Anti-MAP2 Antikörper gefärbt. Die Zellkerne wurden mit TO-PRO®-3-iodid (642/661) sichtbar gemacht. Um die Überlebensrate zu untersuchen, wurde die Zellzahl MAP2-positiver Neuronen in einer Fläche von 1 mm² mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die dendritischen Längen von mindestens sechs primären Neuronen, die 4 Tage mit ScN2a oder N2a Zellen co-kultiviert wurden, wurden mit Hilfe eines Zeiss LSM Image Programmes quantifiziert. Um die mitochondriale Morphologie der primären Neuronen nach der Co-Kultivierung mit ScN2a oder N2a Zellen zu analysieren, wurden die Zellen vor dem Fixieren mit MitoTracker® Red CMXRos (Invitrogen) (Endkonzentration 250 nM) inkubiert. β 3 Tubulin diente als neuronaler Marker. Es wurde der Anteil der primären Neuronen mit perinukleär angehäuften Mitochondrien von mindestens 500 Neuronen bestimmt. Um den toxischen Effekt von einem *de novo* entworfenen β -Peptid auf primäre kortikale Neuronen zu analysieren, wurden diese am Tag 4 und Tag 5 mit dem β -Peptid (2 oder 5 μ M) versetzt. Am Tag 6 wurden die Neuronen fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des Anti- β 3 Tubulin Antikörpers analysiert. Alle Quantifizierungen basieren auf mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten.

6.4.24 Bestimmung der Luziferase-Aktivität im Gesamtzelllysat

Die Luziferase-Aktivität der Gesamtllysate wurde mit Hilfe des *Luciferase Assay Systems* nach Angaben des Herstellers Promega bestimmt. Hierbei wurden die Zellen geerntet, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das Zellpellet wurde in dem Reporter-Lyse-Puffer aufgenommen, 15 min bei

Raumtemperatur geschüttelt und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Luziferase-Aktivität des Lysates mit Hilfe des Luminometers LB96V oder des Luminometers Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad) vermessen. Die Auswertung erfolgte mit der WinGlow Software der Firma Berthold.

7 Bibliographie

- Abisambra, J. F., U. K. Jinwal, J. R. Jones, L. J. Blair, J. Koren, 3rd, and C. A. Dickey. 2011. Exploiting the diversity of the heat-shock protein family for primary and secondary tauopathy therapeutics. *Curr Neuropharmacol* 9 (4):623-631.
- Aguzzi, A. 2000. Prion diseases, blood and the immune system: concerns and reality. *Haematologica* 85 (1):3-10.
- Aguzzi, A., and A. M. Calella. 2009. Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev* 89 (4):1105-1152.
- Aguzzi, A., and M. Polymenidou. 2004. Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* 116:313-327.
- Alier, K., L. Ma, J. Yang, D. Westaway, and J. H. Jhamandas. 2011. Abeta inhibition of ionic conductance in mouse basal forebrain neurons is dependent upon the cellular prion protein PrPC. *J Neurosci* 31 (45):16292-16297.
- Alper, T., W. A. Cramp, D. A. Haig, and M. C. Clarke. 1967. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214:764-766.
- Alper, T., D. A. Haig, and M. C. Clarke. 1966. The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun* 22 (3):278-284.
- Antonyuk, S. V., C. R. Trevitt, R. W. Strange, G. S. Jackson, D. Sangar, M. Batchelor, S. Cooper, C. Fraser, S. Jones, T. Georgiou, A. Khalili-Shirazi, A. R. Clarke, S. S. Hasnain, and J. Collinge. 2009. Crystal structure of human prion protein bound to a therapeutic antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (8):2554-2558.
- Appel, T. R., C. Dumpitak, U. Matthiesen, and D. Riesner. 1999. Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold. *Biol Chem* 380 (11):1295-1306.
- Arantes, C., R. Nomizo, M. H. Lopes, G. N. Hajj, F. R. Lima, and V. R. Martins. 2009. Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. *Glia* 57 (13):1439-1449.
- Baeten, L. A., B. E. Powers, J. E. Jewell, T. R. Spraker, and M. W. Miller. 2007. A natural case of chronic wasting disease in a free-ranging moose (*Alces alces shirasi*). *J Wildl Dis* 43 (2):309-314.
- Balachandran, A., N. P. Harrington, J. Algire, A. Soutyrine, T. R. Spraker, M. Jeffrey, L. Gonzalez, and K. I. O'Rourke. 2010. Experimental oral transmission of chronic wasting disease to red deer (*Cervus elaphus elaphus*): early detection and late stage distribution of protease-resistant prion protein. *Can Vet J* 51 (2):169-178.
- Balducci, C., M. Beeg, M. Stravalaci, A. Bastone, A. Scip, E. Biasini, L. Tapella, L. Colombo, C. Manzoni, T. Borsello, R. Chiesa, M. Gobbi, M. Salmona, and G. Forloni. 2010. Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (5):2295-2300.
- Baler, R., W. J. Welch, and R. Voellmy. 1992. Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor. *J Cell Biol* 117 (6):1151-1159.
- Barry, A. E., I. Klyubin, J. M. Mc Donald, A. J. Mably, M. A. Farrell, M. Scott, D. M. Walsh, and M. J. Rowan. 2011. Alzheimer's disease brain-derived amyloid-beta-mediated inhibition of LTP in vivo is prevented by immunotargeting cellular prion protein. *J Neurosci* 31 (20):7259-7263.

- Basler, K., B. Oesch, M. Scott, D. Westaway, M. Walchli, D. F. Groth, M. P. McKinley, S. B. Prusiner, and C. Weissmann. 1986. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46 (3):417-428.
- Bate, C., and A. Williams. 2011. Amyloid-beta-induced synapse damage is mediated via cross-linkage of cellular prion proteins. *J Biol Chem* 286 (44):37955-37963.
- Baumann, F., M. Tolnay, C. Brabeck, J. Pahnke, U. Kloz, H. H. Niemann, M. Heikenwalder, T. Rulicke, A. Burkle, and A. Aguzzi. 2007. Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *Embo J* 26 (2):538-547.
- Beere, H. M. 2004. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* 117 (Pt 13):2641-2651.
- Behl, C., and D. Schubert. 1993. Heat shock partially protects rat pheochromocytoma PC12 cells from amyloid beta peptide toxicity. *Neurosci Lett* 154 (1-2):1-4.
- Belay, E. D., R. A. Maddox, E. S. Williams, M. W. Miller, P. Gambetti, and L. B. Schonberger. 2004. Chronic wasting disease and potential transmission to humans. *Emerg Infect Dis* 10 (6):977-984.
- Benestad, S. L., J. N. Arsaac, W. Goldmann, and M. Noremark. 2008. Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet Res* 39 (4):19.
- Benestad, S. L., P. Sarradin, B. Thu, J. Schonheit, M. A. Tranulis, and B. Bratberg. 2003. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec* 153 (7):202-208.
- Boggs, L. N., K. S. Fuson, M. Baez, L. Churgay, D. McClure, G. Becker, and P. C. May. 1996. Clusterin (Apo J) protects against in vitro amyloid-beta (1-40) neurotoxicity. *J Neurochem* 67 (3):1324-1327.
- Bolton, D. C., M. P. McKinley, and S. B. Prusiner. 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218:1309-1311.
- Braak, H., and E. Braak. 1991. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82 (4):239-259.
- Braak, H., U. Rub, W. P. Gai, and K. Del Tredici. 2003. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm* 110 (5):517-536.
- Brandner, S., S. Isenmann, A. Raeber, M. Fischer, A. Sailer, Y. Kobayashi, S. Marino, C. Weissmann, and A. Aguzzi. 1996. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379:339-343.
- Brandner, S., J. Whitfield, K. Boone, A. Puwa, C. O'Malley, J. M. Linehan, S. Joiner, F. Scaravilli, I. Calder, P. A. M, J. D. Wadsworth, and J. Collinge. 2008. Central and peripheral pathology of kuru: pathological analysis of a recent case and comparison with other forms of human prion disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363 (1510):3755-3763.
- Braun, U., U. Kihm, N. Pusterla, and M. Schonmann. 1997. [Clinical examination upon suspicion of bovine spongiform encephalopathy (BSE)]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 139 (1):35-41.
- Bremer, J., F. Baumann, C. Tiberi, C. Wessig, H. Fischer, P. Schwarz, A. D. Steele, K. V. Toyka, K. A. Nave, J. Weis, and A. Aguzzi. 2010. Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci* 13 (3):310-318.

- Brown, D. R., and A. Besinger. 1998. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J* 334 (Pt 2):423-429.
- Brown, D. R., K. Qin, J. W. Herms, A. Madlung, J. Manson, R. Stome, P. E. Fraser, T. Kruck, A. von Bohlen, W. Schulz-Schaeffer, A. Giese, D. Westaway, and H. Kretzschmar. 1997a. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390:684-687.
- Brown, D. R., W. J. Schulz-Schaeffer, B. Schmidt, and H. A. Kretzschmar. 1997b. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* 146:104-112.
- Brown, P., L. Cervenakova, and H. Diringer. 2001. Blood infectivity and the prospects for a diagnostic screening test in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Lab Clin Med* 137 (1):5-13.
- Brown, P., M. Preece, J. P. Brandel, T. Sato, L. McShane, I. Zerr, A. Fletcher, R. G. Will, M. Pocchiari, N. R. Cashman, J. H. d'Aignaux, L. Cervenakova, J. Fradkin, L. B. Schonberger, and S. J. Collins. 2000. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. *Neurology* 55 (8):1075-1081.
- Bruce, M. E., R. G. Will, J. W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttie, L. McCordle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, S. Cousens, H. Fraser, and C. J. Bostock. 1997. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389 (6650):498-501.
- Bruijn, L. I., M. K. Houseweart, S. Kato, K. L. Anderson, S. D. Anderson, E. Ohama, A. G. Reaume, R. W. Scott, and D. W. Cleveland. 1998. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281 (5384):1851-1854.
- Büeler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R.-A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet, and C. Weissmann. 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73:1339-1347.
- Büeler, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H.-P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet, and C. Weissmann. 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356:577-582.
- Bukau, B., J. Weissman, and A. Horwich. 2006. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125 (3):443-451.
- Butler, D. A., M. R. D. Scott, J. M. Bockman, D. R. Borchelt, A. Taraboulos, K. K. Hsiao, D. T. Kingsbury, and S. B. Prusiner. 1988. Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J. Virol.* 62:1558-1564.
- Caetano, F. A., M. H. Lopes, G. N. Hajj, C. F. Machado, C. Pinto Arantes, A. C. Magalhaes, P. Vieira Mde, T. A. Americo, A. R. Massensini, S. A. Priola, I. Vorberg, M. V. Gomez, R. Linden, V. F. Prado, V. R. Martins, and M. A. Prado. 2008. Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1. *J Neurosci* 28 (26):6691-6702.
- Calderwood, S. K., and D. R. Ciocca. 2008. Heat shock proteins: stress proteins with Janus-like properties in cancer. *Int J Hyperthermia* 24 (1):31-39.
- Calderwood, S. K., S. S. Mambula, P. J. Gray, Jr., and J. R. Theriault. 2007. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS Lett* 581 (19):3689-3694.
- Calella, A. M., M. Farinelli, M. Nuvolone, O. Mirante, R. Moos, J. Falsig, I. M. Mansuy, and A. Aguzzi. 2010. Prion protein and Abeta-related synaptic toxicity impairment. *EMBO Mol Med* 2 (8):306-314.

- Calero, M., A. Rostagno, E. Matsubara, B. Zlokovic, B. Frangione, and J. Ghiso. 2000. Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech* 50 (4):305-315.
- Calzolai, L., D. A. Lysek, D. R. Perez, P. Guntert, and K. Wuthrich. 2005. Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (3):651-655.
- Castilla, J., R. Morales, P. Saa, M. Barria, P. Gambetti, and C. Soto. 2008. Cell-free propagation of prion strains. *Embo J* 27 (19):2557-2566.
- Castilla, J., P. Saa, C. Hetz, and C. Soto. 2005. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 121 (2):195-206.
- Castilla, J., P. Saa, R. Morales, K. Abid, K. Maundrell, and C. Soto. 2006. Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies. *Methods Enzymol* 412:3-21.
- Caughey, B., and G. S. Baron. 2006. Prions and their partners in crime. *Nature* 443 (7113):803-810.
- Caughey, B., and P. T. Lansbury. 2003. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 26:267-298.
- Caughey, B. W., A. Dong, K. S. Bhat, D. Ernst, S. F. Hayes, and W. S. Caughey. 1991. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP^{Sc} 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30:7672-7680.
- Chen, S., A. Mange, L. Dong, S. Lehmann, and M. Schachner. 2003. Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol Cell Neurosci* 22 (2):227-233.
- Chen, S., S. P. Yadav, and W. K. Surewicz. 2010. Interaction between human prion protein and amyloid-beta (A β) oligomers: role of N-terminal residues. *J Biol Chem* 285 (34):26377-26383.
- Chesebro, B., R. Race, K. Wehrly, J. Nishio, M. Bloom, D. Lechner, S. Bergstrom, K. Robbins, L. Mayer, and J. M. Keith. 1985. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315 (6017):331-333.
- Chesebro, B., M. Trifilo, R. Race, K. Meade-White, C. Teng, R. LaCasse, L. Raymond, C. Favara, G. Baron, S. Priola, B. Caughey, E. Masliah, and M. Oldstone. 2005. Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* 308:1435-1439.
- Chiarini, L. B., A. R. Freitas, S. M. Zanata, R. R. Brentani, V. R. Martins, and R. Linden. 2002. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *Embo J* 21 (13):3317-3326.
- Chiesa, R., P. Piccardo, B. Ghetti, and D. A. Harris. 1998. Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. *Neuron* 21:1339-1351.
- Chiesa, R., P. Piccardo, E. Quaglio, B. Drisaldi, S. L. Si-Hoe, M. Takao, B. Ghetti, and D. A. Harris. 2003. Molecular distinction between pathogenic and infectious properties of the prion protein. *J Virol* 77 (13):7611-7622.
- Chung, E., Y. Ji, Y. Sun, R. J. Kascsak, R. B. Kascsak, P. D. Mehta, S. M. Strittmatter, and T. Wisniewski. 2010. Anti-PrP^{Sc} monoclonal antibody infusion as a novel treatment for cognitive deficits in an Alzheimer's disease model mouse. *BMC Neurosci* 11:130.
- Cisse, M., P. E. Sanchez, D. H. Kim, K. Ho, G. Q. Yu, and L. Mucke. 2011. Ablation of cellular prion protein does not ameliorate abnormal neural

- network activity or cognitive dysfunction in the J20 line of human amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 31 (29):10427-10431.
- Clavaguera, F., T. Bolmont, R. A. Crowther, D. Abramowski, S. Frank, A. Probst, G. Fraser, A. K. Stalder, M. Beibel, M. Staufenbiel, M. Jucker, M. Goedert, and M. Tolnay. 2009. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11 (7):909-913.
- Cleary, J. P., D. M. Walsh, J. J. Hofmeister, G. M. Shankar, M. A. Kuskowski, D. J. Selkoe, and K. H. Ashe. 2005. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8 (1):79-84.
- Coitinho, A. S., M. O. Dietrich, A. Hoffmann, O. P. Dall'Igna, D. O. Souza, V. R. Martins, R. R. Brentani, I. Izquierdo, and D. R. Lara. 2002. Decreased hyperlocomotion induced by MK-801, but not amphetamine and caffeine in mice lacking cellular prion protein (PrP(C)). *Brain Res Mol Brain Res* 107 (2):190-194.
- Colby, D. W., K. Giles, G. Legname, H. Wille, I. V. Baskakov, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 2009. Design and construction of diverse mammalian prion strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (48):20417-20422.
- Collinge, J. 1997. Human prion diseases and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Hum Mol Genet* 6 (10):1699-1705.
- Collinge, J. 2001. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* 24:519-550.
- Collinge, J., and M. Rossor. 1996. A new variant of prion disease. *Lancet* 347 (9006):916-917.
- Collinge, J., K. C. Sidle, J. Meads, J. Ironside, and A. F. Hill. 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383 (6602):685-690.
- Collinge, J., M. A. Whittington, K. C. Sidle, C. J. Smith, M. S. Palmer, A. R. Clarke, and J. G. Jefferys. 1994. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370 (6487):295-297.
- Collins, S., C. A. McLean, and C. L. Masters. 2001. Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies. *J Clin Neurosci* 8 (5):387-397.
- Creutzfeldt, H. G. 1920. Über eine eigenartige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Vorläufige Mitteilung. Z. f. d. ges. Neurol. und Psych.* 1-18.
- Cuillé, J., and P. L. Chelle. 1939. Experimental transmission of trembling to the goat. *C.R. Seances Acad. Sci.* 208:1058-1060.
- Cuillé, J., et al. 1936. La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *C. R. Acad. Sci. Paris* 203:1552-1554.
- Cuillé, J. 1938. La maladie dite tremblante du mouton est bien inoculable. *C. R. Acad. Sci. Paris* 206:78-79.
- Dabbs, R. A., A. R. Wyatt, J. J. Yerbury, H. Ecroyd, and M. R. Wilson. 2011. Extracellular Chaperones. *Top Curr Chem.*
- Deleault, N. R., B. T. Harris, J. R. Rees, and S. Supattapone. 2007. Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (23):9741-9746.
- Delrieu, J., P. J. Ousset, C. Caillaud, and B. Vellas. 2012. 'Clinical trials in Alzheimer's disease': immunotherapy approaches. *J Neurochem* 120 Suppl 1:186-193.

- Deng, Y. P., R. L. Albin, J. B. Penney, A. B. Young, K. D. Anderson, and A. Reiner. 2004. Differential loss of striatal projection systems in Huntington's disease: a quantitative immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat* 27 (3):143-164.
- Desplats, P., H. J. Lee, E. J. Bae, C. Patrick, E. Rockenstein, L. Crews, B. Spencer, E. Masliah, and S. J. Lee. 2009. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (31):13010-13015.
- Detwiler, L. 2001. Portrait der Traberkrankheit bei Schaf und Ziege (Scrapie). In: *Hörnlimann B., Riesner D., Kretzschmar H. Prionen und Prionkrankheiten*:165-172.
- DiFiglia, M., E. Sapp, K. O. Chase, S. W. Davies, G. P. Bates, J. P. Vonsattel, and N. Aronin. 1997. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277 (5334):1990-1993.
- Donne, D. G., J. H. Viles, D. Groth, I. Mehlhorn, T. L. James, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, P. E. Wright, and H. J. Dyson. 1997. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (25):13452-13457.
- Donnelly, C. A., N. M. Ferguson, A. C. Ghani, and R. M. Anderson. 2002. Implications of BSE infection screening data for the scale of the British BSE epidemic and current European infection levels. *Proc Biol Sci* 269 (1506):2179-2190.
- Duffy, P., J. Wolf, G. Collins, A. G. DeVoe, B. Streeten, and D. Cowen. 1974. Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 290 (12):692-693.
- Dumpitak, C., M. Beekes, N. Weinmann, S. Metzger, K. F. Winklhofer, J. Tatzelt, and D. Riesner. 2005. The polysaccharide scaffold of PrP 27-30 is a common compound of natural prions and consists of alpha-linked polyglucose. *Biol Chem* 386:1149-1155.
- Dupiereux, I., N. Falisse-Poirrier, W. Zorzi, N. T. Watt, O. Thellin, D. Zorzi, O. Pierard, N. M. Hooper, E. Heinen, and B. Elmoualij. 2008. Protective effect of prion protein via the N-terminal region in mediating a protective effect on paraquat-induced oxidative injury in neuronal cells. *J Neurosci Res* 86 (3):653-659.
- Eanes, E. D., and G. G. Glenner. 1968. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem* 16 (11):673-677.
- Eisele, Y. S., U. Obermuller, G. Heilbronner, F. Baumann, S. A. Kaeser, H. Wolburg, L. C. Walker, M. Staufienbiel, M. Heikenwalder, and M. Jucker. 2010. Peripherally applied Abeta-containing inoculates induce cerebral beta-amyloidosis. *Science* 330 (6006):980-982.
- Eisenberg, D., and M. Jucker. 2012. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* 148 (6):1188-1203.
- Ertmer, A., S. Gilch, S. W. Yun, E. Flechsig, B. Klebl, M. Stein-Gerlach, M. A. Klein, and H. M. Schatzl. 2004. The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrPSc in prion-infected cells. *J Biol Chem* 279 (40):41918-41927.
- Esiri, M. M., J. Carter, and J. W. Ironside. 2000. Prion protein immunoreactivity in brain samples from an unselected autopsy population: findings in 200 consecutive cases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26 (3):273-284.

- Evans, C. G., S. Wisen, and J. E. Gestwicki. 2006. Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid beta-(1-42) aggregation in vitro. *J Biol Chem* 281 (44):33182-33191.
- Farias, M., 3rd, M. W. Gorman, M. V. Savage, and E. O. Feigl. 2005. Plasma ATP during exercise: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288 (4):H1586-1590.
- Fernandez-Borges, N., J. de Castro, and J. Castilla. 2009. In vitro studies of the transmission barrier. *Prion* 3 (4):220-223.
- Ferrer, I., R. Blanco, M. Carmona, B. Puig, R. Ribera, M. J. Rey, and T. Ribalta. 2001. Prion protein expression in senile plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 101 (1):49-56.
- Fevrier, B., D. Vilette, F. Archer, D. Loew, W. Faigle, M. Vidal, H. Laude, and G. Raposo. 2004. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (26):9683-9688.
- Flechsig, E., I. Hegyi, R. Leimeroth, A. Zuniga, D. Rossi, A. Cozzio, P. Schwarz, T. Rulicke, J. Gotz, A. Aguzzi, and C. Weissmann. 2003. Expression of truncated PrP targeted to Purkinje cells of PrP knockout mice causes Purkinje cell death and ataxia. *Embo J* 22:3095-3101.
- Ford, M. J., L. J. Burton, R. J. Morris, and S. M. Hall. 2002. Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience* 113 (1):177-192.
- Forno, L. S. 1996. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55 (3):259-272.
- Fournier, J. G. 2001. Nonneuronal cellular prion protein. *Int Rev Cytol* 208:121-160.
- Freir, D. B., A. J. Nicoll, I. Klyubin, S. Panico, J. M. Mc Donald, E. Risse, E. A. Asante, M. A. Farrow, R. B. Sessions, H. R. Saibil, A. R. Clarke, M. J. Rowan, D. M. Walsh, and J. Collinge. 2011. Interaction between prion protein and toxic amyloid beta assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. *Nat Commun* 2:336.
- Freixes, M., B. Puig, A. Rodriguez, B. Torrejon-Escribano, R. Blanco, and I. Ferrer. 2004. Clusterin solubility and aggregation in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 108 (4):295-301.
- Frost, B., and M. I. Diamond. 2010. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 11 (3):155-159.
- Frost, B., R. L. Jacks, and M. I. Diamond. 2009. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 284 (19):12845-12852.
- Gabai, V. L., A. B. Meriin, D. D. Mosser, A. W. Caron, S. Rits, V. I. Shifrin, and M. Y. Sherman. 1997. Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem* 272 (29):18033-18037.
- Gajdusek, D. C., C. J. J. Gibbs, and M. Alpers. 1966. Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209:794-796.
- Gajdusek, D. C., and V. Zigas. 1957. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med* 257:974-978.
- Gehrig, S. M., C. van der Poel, T. A. Sayer, J. D. Schertzer, D. C. Henstridge, J. E. Church, S. Lamon, A. P. Russell, K. E. Davies, M. A. Febbraio, and G. S. Lynch. 2012. Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. *Nature* 484 (7394):394-398.

- Georgopoulos, C., and W. J. Welch. 1993. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol* 9:601-634.
- Gerstmann, J., E. Straussler, and I. Scheinker. 1936. Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 154:736-762.
- Giannakopoulos, P., E. Kovari, L. E. French, I. Viard, P. R. Hof, and C. Bouras. 1998. Possible neuroprotective role of clusterin in Alzheimer's disease: a quantitative immunocytochemical study. *Acta Neuropathol* 95 (4):387-394.
- Giffard, R. G., L. Xu, H. Zhao, W. Carrico, Y. Ouyang, Y. Qiao, R. Sapolsky, G. Steinberg, B. Hu, and M. A. Yenari. 2004. Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury. *J Exp Biol* 207 (Pt 18):3213-3220.
- Gilch, S., N. Chitoor, Y. Taguchi, M. Stuart, J. E. Jewell, and H. M. Schatzl. 2011. Chronic wasting disease. *Top Curr Chem* 305:51-77.
- Gilmore, R., G. Blobel, and P. Walter. 1982a. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J Cell Biol* 95 (95):463-469.
- Gilmore, R., P. Walter, and G. Blobel. 1982b. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* 95:470-477.
- Gimbel, D. A., H. B. Nygaard, E. E. Coffey, E. C. Gunther, J. Lauren, Z. A. Gimbel, and S. M. Strittmatter. 2010. Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J Neurosci* 30 (18):6367-6374.
- Glabe, C. G. 2006. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol Aging* 27 (4):570-575.
- Glatzel, M., and A. Aguzzi. 2001. The shifting biology of prions. *Brain Res Brain Res Rev* 36:241-248.
- Glenner, G. G., and C. W. Wong. 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120 (3):885-890.
- Glover, J. R., A. S. Kowal, E. C. Schirmer, M. M. Patino, J. J. Liu, and S. Lindquist. 1997. Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae*. *Cell* 89 (5):811-819.
- Gossert, A. D., S. Bonjour, D. A. Lysek, F. Fiorito, and K. Wuthrich. 2005. Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (3):646-650.
- Greig, J. R. 1940. Scrapie. Transcript, Highland and Agriculture Society, Scotland. 52:71-90.
- Griffith, J. S. 1967. Self-replication and scrapie. *Nature* 215:1043-1044.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, M. Quinlan, Y. C. Tung, M. S. Zaidi, and H. M. Wisniewski. 1986. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261 (13):6084-6089.
- Guillot-Sestier, M. V., C. Sunyach, S. T. Ferreira, M. P. Marzolo, C. Bauer, A. Thevenet, and F. Checler. 2012. alpha-Secretase-derived fragment of cellular prion, N1, protects against monomeric and oligomeric amyloid beta (A β)-associated cell death. *J Biol Chem* 287 (7):5021-5032.

- Haass, C., and D. J. Selkoe. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2):101-112.
- Hadlow, W. J. 1959. Scrapie and Kuru. *Lancet* 2:289-290.
- Hahn, G. M., and G. C. Li. 1982. Thermotolerance and heat shock proteins in mammalian cells. *Radiat Res* 92 (3):452-457.
- Haigh, C. L., and D. R. Brown. 2006. Prion protein reduces both oxidative and non-oxidative copper toxicity. *J Neurochem* 98 (3):677-689.
- Hainfellner, J. A., J. Wanschitz, K. Jellinger, P. P. Liberski, F. Gullotta, and H. Budka. 1998. Coexistence of Alzheimer-type neuropathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 96 (2):116-122.
- Hamir, A. N., R. A. Kunkle, R. C. Cutlip, J. M. Miller, K. I. O'Rourke, E. S. Williams, M. W. Miller, M. J. Stack, M. J. Chaplin, and J. A. Richt. 2005. Experimental transmission of chronic wasting disease agent from mule deer to cattle by the intracerebral route. *J Vet Diagn Invest* 17 (3):276-281.
- Hamir, A. N., R. A. Kunkle, R. C. Cutlip, J. M. Miller, E. S. Williams, and J. A. Richt. 2006. Transmission of chronic wasting disease of mule deer to Suffolk sheep following intracerebral inoculation. *J Vet Diagn Invest* 18 (6):558-565.
- Hamir, A. N., J. M. Miller, R. A. Kunkle, S. M. Hall, and J. A. Richt. 2007. Susceptibility of cattle to first-passage intracerebral inoculation with chronic wasting disease agent from white-tailed deer. *Vet Pathol* 44 (4):487-493.
- Hansen, C., E. Angot, A. L. Bergstrom, J. A. Steiner, L. Pieri, G. Paul, T. F. Outeiro, R. Melki, P. Kallunki, K. Fog, J. Y. Li, and P. Brundin. 2011. alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J Clin Invest* 121 (2):715-725.
- Harmeier, A., C. Wozny, B. R. Rost, L. M. Munter, H. Hua, O. Georgiev, M. Beyermann, P. W. Hildebrand, C. Weise, W. Schaffner, D. Schmitz, and G. Multhaup. 2009. Role of amyloid-beta glycine 33 in oligomerization, toxicity, and neuronal plasticity. *J Neurosci* 29 (23):7582-7590.
- Harold, D., R. Abraham, P. Hollingworth, R. Sims, A. Gerrish, M. L. Hamshere, J. S. Pahwa, V. Moskvina, K. Dowzell, A. Williams, N. Jones, C. Thomas, A. Stretton, A. R. Morgan, S. Lovestone, J. Powell, P. Proitsi, M. K. Lupton, C. Brayne, D. C. Rubinsztein, M. Gill, B. Lawlor, A. Lynch, K. Morgan, K. S. Brown, P. A. Passmore, D. Craig, B. McGuinness, S. Todd, C. Holmes, D. Mann, A. D. Smith, S. Love, P. G. Kehoe, J. Hardy, S. Mead, N. Fox, M. Rossor, J. Collinge, W. Maier, F. Jessen, B. Schurmann, H. van den Bussche, I. Heuser, J. Kornhuber, J. Wiltfang, M. Dichgans, L. Frolich, H. Hampel, M. Hull, D. Rujescu, A. M. Goate, J. S. Kauwe, C. Cruchaga, P. Nowotny, J. C. Morris, K. Mayo, K. Sleegers, K. Bettens, S. Engelborghs, P. P. De Deyn, C. Van Broeckhoven, G. Livingston, N. J. Bass, H. Gurling, A. McQuillin, R. Gwilliam, P. Deloukas, A. Al-Chalabi, C. E. Shaw, M. Tsolaki, A. B. Singleton, R. Guerreiro, T. W. Muhleisen, M. M. Nothen, S. Moebus, K. H. Jockel, N. Klopp, H. E. Wichmann, M. M. Carrasquillo, V. S. Pankratz, S. G. Younkin, P. A. Holmans, M. O'Donovan, M. J. Owen, and J. Williams. 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41 (10):1088-1093.

- Hartl, F. U., A. Bracher, and M. Hayer-Hartl. 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475 (7356):324-332.
- Hartl, F. U., and M. Hayer-Hartl. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295 (5561):1852-1858.
- Hartsough, G. R., and D. Burger. 1965. Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis* 115 (4):387-392.
- Hegde, R. S., J. A. Mastrianni, M. R. Scott, K. A. DeFea, P. Tremblay, M. Torchia, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and V. R. Lingappa. 1998. A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* 279 (5352):827-834.
- Helenius, A., and M. Aebi. 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291 (5512):2364-2369.
- Horiuchi, M., and B. Caughey. 1999. Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *Embo J* 18 (12):3193-3203.
- Hornemann, S., B. Christen, C. von Schroetter, D. R. Perez, and K. Wuthrich. 2009. Prion protein library of recombinant constructs for structural biology. *FEBS J* 276 (8):2359-2367.
- Hornemann, S., C. Korth, B. Oesch, R. Riek, G. Wider, K. Wuthrich, and R. Glockshuber. 1997. Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Lett* 413 (2):277-281.
- Hoshino, T., N. Murao, T. Namba, M. Takehara, H. Adachi, M. Katsuno, G. Sobue, T. Matsushima, T. Suzuki, and T. Mizushima. 2011. Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. *J Neurosci* 31 (14):5225-5234.
- Hourigan, J., and E. al. 1979. Epidemiology of scrapie in the United States. In: *Prusiner, S.B., et al. (eds). Slow Transmissible diseases of the nervous system. Academic Press, New York, NY* 1:331.
- Hsu, A. L., C. T. Murphy, and C. Kenyon. 2003. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 300 (5622):1142-1145.
- Huang, Y., and L. Mucke. 2012. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell* 148 (6):1204-1222.
- Jaattela, M. 1993. Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. *Journal of immunology* 151 (8):4286-4294.
- Jaattela, M., and D. Wissing. 1993. Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection. *J Exp Med* 177 (1):231-236.
- Jakob, A. 1921. Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunden (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit dissemierten Degenerationsherden). *Vorläufige Mitteilung. Z. Ges. Neurol. Psychiatr.* 64:147-228.
- James, T. L., H. Liu, N. B. Ulyanov, S. Farr-Jones, H. Zhang, D. G. Donne, K. Kaneko, D. Groth, I. Mehlhorn, S. B. Prusiner, and F. E. Cohen. 1997. Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (19):10086-10091.
- Jarrett, J. T., and P. T. Lansbury, Jr. 1992. Amyloid fibril formation requires a chemically discriminating nucleation event: studies of an amyloidogenic

- sequence from the bacterial protein OsmB. *Biochemistry* 31 (49):12345-12352.
- Jarrett, J. T. 1993. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73:1055-1058.
- Jeffrey, M., and G. A. Wells. 1988. Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angasi*). *Vet Pathol* 25 (5):398-399.
- Kakimura, J., Y. Kitamura, K. Takata, M. Umeki, S. Suzuki, K. Shibagaki, T. Taniguchi, Y. Nomura, P. J. Gebicke-Haerter, M. A. Smith, G. Perry, and S. Shimohama. 2002. Microglial activation and amyloid-beta clearance induced by exogenous heat-shock proteins. *Faseb J* 16 (6):601-603.
- Kane, M. D., W. J. Lipinski, M. J. Callahan, F. Bian, R. A. Durham, R. D. Schwarz, A. E. Roher, and L. C. Walker. 2000. Evidence for seeding of beta -amyloid by intracerebral infusion of Alzheimer brain extracts in beta -amyloid precursor protein-transgenic mice. *J Neurosci* 20 (10):3606-3611.
- Kascsak, R. J., R. Rubenstein, P. A. Merz, M. Tonna-DeMasi, R. Fersko, R. I. Carp, H. M. Wisniewski, and H. Diringier. 1987. Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J Virol* 61 (12):3688-3693.
- Kayed, R., E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman, and C. G. Glabe. 2003. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300 (5618):486-489.
- Kenward, N., J. Hope, M. Landon, and R. J. Mayer. 1994. Expression of polyubiquitin and heat-shock protein 70 genes increases in the later stages of disease progression in scrapie-infected mouse brain. *J Neurochem* 62 (5):1870-1877.
- Kessels, H. W., L. N. Nguyen, S. Nabavi, and R. Malinow. 2010. The prion protein as a receptor for amyloid-beta. *Nature* 466 (7308):E3-4; discussion E4-5.
- Khosravani, H., Y. Zhang, S. Tsutsui, S. Hameed, C. Altier, J. Hamid, L. Chen, M. Villemaire, Z. Ali, F. R. Jirik, and G. W. Zamponi. 2008. Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J Cell Biol* 181 (3):551-565.
- Kieran, D., B. Kalmar, J. R. Dick, J. Riddoch-Contreras, G. Burnstock, and L. Greensmith. 2004. Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nat Med* 10 (4):402-405.
- Kim, J. I., I. Cali, K. Surewicz, Q. Kong, G. J. Raymond, R. Atarashi, B. Race, L. Qing, P. Gambetti, B. Caughey, and W. K. Surewicz. 2010. Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors. *J Biol Chem* 285 (19):14083-14087.
- Kim, J. I., K. Surewicz, P. Gambetti, and W. K. Surewicz. 2009. The role of glycoposphatidylinositol anchor in the amplification of the scrapie isoform of prion protein in vitro. *FEBS Lett* 583 (22):3671-3675.
- Kim, S., E. A. Nollen, K. Kitagawa, V. P. Bindokas, and R. I. Morimoto. 2002. Polyglutamine protein aggregates are dynamic. *Nat Cell Biol* 4 (10):826-831.
- Kirkwood, J. K., G. A. Wells, J. W. Wilesmith, A. A. Cunningham, and S. I. Jackson. 1990. Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Oryx*

- leucoryx) and a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). *Vet Rec* 127 (17):418-420.
- Kirschbaum, W. R. 1924. Zwei eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems nach Art der spastischen Pseudosklerose (Jakob). *Z Ges Neurol Psychiatr*.
- Kirschbaum, W. R. 1968. *Jakob-Creutzfeldt Disease*. American Elsevier: New York.
- Klein, T. R., D. Kirsch, R. Kaufmann, and D. Riesner. 1998. Prion rods contain small amounts of the two host sphingolipids as revealed by thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Biol. Chem.* 379:655-666.
- Klock, G., M. Baiersdorfer, and C. Koch-Brandt. 2009. Chapter 7: Cell protective functions of secretory Clusterin (sCLU). *Adv Cancer Res* 104:115-138.
- Knaus, K. J., M. Morillas, W. Swietnicki, M. Malone, W. K. Surewicz, and V. C. Yee. 2001. Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat Struct Biol* 8 (9):770-774.
- Koch, T. K., B. O. Berg, S. J. De Armond, and R. F. Gravina. 1985. Creutzfeldt-Jakob disease in a young adult with idiopathic hypopituitarism. Possible relation to the administration of cadaveric human growth hormone. *N Engl J Med* 313 (12):731-733.
- Kocisko, D. A., J. H. Come, S. A. Priola, B. Chesebro, G. J. Raymond, P. T. Lansbury, and B. Caughey. 1994. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370 (6489):471-474.
- Kornfeld, R., and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54:631-664.
- Kourtis, N., and N. Tavernarakis. 2011. Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships. *Embo J* 30 (13):2520-2531.
- Kretzschmar, H. A., S. B. Prusiner, L. E. Stowring, and S. J. DeArmond. 1986. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* 122 (1):1-5.
- Kretzschmar, H. A., T. Tings, A. Madlung, A. Giese, and J. Herms. 2000. Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse. *Arch Virol Suppl* 16 (16):239-249.
- Kristiansen, M., P. Deriziotis, D. E. Dimcheff, G. S. Jackson, H. Ovaa, H. Naumann, A. R. Clarke, F. W. van Leeuwen, V. Menendez-Benito, N. P. Dantuma, J. L. Portis, J. Collinge, and S. J. Tabrizi. 2007. Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome. *Mol Cell* 26 (2):175-188.
- Kristiansen, M., M. J. Messenger, P. C. Klohn, S. Brandner, J. D. Wadsworth, J. Collinge, and S. J. Tabrizi. 2005. Disease-related prion protein forms aggregates in neuronal cells leading to caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem* 280 (46):38851-38861.
- Kudo, W., H. P. Lee, W. Q. Zou, X. Wang, G. Perry, X. Zhu, M. A. Smith, R. B. Petersen, and H. G. Lee. 2012. Cellular prion protein is essential for oligomeric amyloid-beta-induced neuronal cell death. *Hum Mol Genet* 21 (5):1138-1144.
- Kumar, P., R. K. Ambasta, V. Veereshwarayya, K. M. Rosen, K. S. Kosik, H. Band, R. Mestrlil, C. Patterson, and H. W. Querfurth. 2007. CHIP and HSPs interact with beta-APP in a proteasome-dependent manner and influence Abeta metabolism. *Hum Mol Genet* 16 (7):848-864.
- Kuwahara, C., A. M. Takeuchi, T. Nishimura, K. Haraguchi, A. Kubosaki, Y. Matsumoto, K. Saeki, Y. Matsumoto, T. Yokoyama, S. Itohara, and T.

- Onodera. 1999. Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400 (6741):225-226.
- Lai, A. Y., and J. McLaurin. 2010. Mechanisms of amyloid-Beta Peptide uptake by neurons: the role of lipid rafts and lipid raft-associated proteins. *Int J Alzheimers Dis* 2011:548380.
- Lambert, J. C., S. Heath, G. Even, D. Champion, K. Sleegers, M. Hiltunen, O. Combarros, D. Zelenika, M. J. Bullido, B. Tavernier, L. Letenneur, K. Bettens, C. Berr, F. Pasquier, N. Fievet, P. Barberger-Gateau, S. Engelborghs, P. De Deyn, I. Mateo, A. Franck, S. Helisalmi, E. Porcellini, O. Hanon, M. M. de Pancorbo, C. Lendon, C. Dufouil, C. Jaillard, T. Leveillard, V. Alvarez, P. Bosco, M. Mancuso, F. Panza, B. Nacmias, P. Bossu, P. Piccardi, G. Annoni, D. Seripa, D. Galimberti, D. Hannequin, F. Licastro, H. Soininen, K. Ritchie, H. Blanche, J. F. Dartigues, C. Tzourio, I. Gut, C. Van Broeckhoven, A. Alperovitch, M. Lathrop, and P. Amouyel. 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41 (10):1094-1099.
- Lasmezas, C. I. 2003. Putative functions of PrP(C). *Br Med Bull* 66:61-70.
- Lassle, M., G. L. Blatch, V. Kundra, T. Takatori, and B. R. Zetter. 1997. Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. *J Biol Chem* 272 (3):1876-1884.
- Latarjet, R., B. Muel, D. A. Haig, M. C. Clarke, and T. Alper. 1970. Inactivation of the scrapie agent by near monochromatic ultraviolet light. *Nature* 227 (5265):1341-1343.
- Lauren, J., D. A. Gimbel, H. B. Nygaard, J. W. Gilbert, and S. M. Strittmatter. 2009. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457 (7233):1128-1132.
- Lee, K. S., and B. Caughey. 2007. A simplified recipe for prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (23):9551-9552.
- Leggett, M. M., J. Dukes, and H. M. Pirie. 1990. A spongiform encephalopathy in a cat. *Vet Rec* 127 (24):586-588.
- Legname, G., I. V. Baskakov, H. O. Nguyen, D. Riesner, F. E. Cohen, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 2004. Synthetic mammalian prions. *Science* 305 (5684):673-676.
- Li, A., H. M. Christensen, L. R. Stewart, K. A. Roth, R. Chiesa, and D. A. Harris. 2007. Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105-125. *Embo J* 26 (2):548-558.
- Li, G. C., and G. M. Hahn. 1990. Thermotolerance, Thermoresistance, and Thermosensitization. In *Stress proteins in Biology and Medicine* (ed. R.I. Morimoto, A. Tissieres and C.E. Georgopoulos); Cold Spring Harbor Press:79-100.
- Li, L., and S. Lindquist. 2000. Creating a protein-based element of inheritance. *Science* 287 (5453):661-664.
- Liberski, P. P., D. R. Brown, B. Sikorska, B. Caughey, and P. Brown. 2008. Cell death and autophagy in prion diseases (transmissible spongiform encephalopathies). *Folia Neuropathol* 46 (1):1-25.
- Lima, F. R., C. P. Arantes, A. G. Muras, R. Nomizo, R. R. Brentani, and V. R. Martins. 2007. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. *J Neurochem* 103 (6):2164-2176.

- Linden, R., V. R. Martins, M. A. Prado, M. Cammarota, I. Izquierdo, and R. R. Brentani. 2008. Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 88 (2):673-728.
- Lindquist, S. 1997. Mad cows meet psi-chotic yeast: the expansion of the prion hypothesis. *Cell* 89 (4):495-498.
- Lindquist, S., and E. A. Craig. 1988. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22:631-677.
- Locht, C., B. Chesebro, R. Race, and J. M. Keith. 1986. Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (17):6372-6376.
- Longshaw, V. M., J. P. Chapple, M. S. Balda, M. E. Cheetham, and G. L. Blatch. 2004. Nuclear translocation of the Hsp70/Hsp90 organizing protein mSTI1 is regulated by cell cycle kinases. *J Cell Sci* 117 (Pt 5):701-710.
- Lopes, M. H., G. N. Hajj, A. G. Muras, G. L. Mancini, R. M. Castro, K. C. Ribeiro, R. R. Brentani, R. Linden, and V. R. Martins. 2005. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci* 25 (49):11330-11339.
- Lu, X., P. L. Wintrode, and W. K. Surewicz. 2007. Beta-sheet core of human prion protein amyloid fibrils as determined by hydrogen/deuterium exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (5):1510-1515.
- Lugaresi, E., R. Medori, P. Montagna, A. Baruzzi, P. Cortelli, A. Lugaresi, P. Tinuper, M. Zucconi, and P. Gambetti. 1986. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* 315 (16):997-1003.
- Lysek, D. A., C. Schorn, L. G. Nivon, V. Esteve-Moya, B. Christen, L. Calzolari, C. von Schroetter, F. Fiorito, T. Herrmann, P. Guntert, and K. Wuthrich. 2005. Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (3):640-645.
- Ma, J., R. Wollmann, and S. Lindquist. 2002. Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* 298 (5599):1781-1785.
- Magalhaes, A. C., G. S. Baron, K. S. Lee, O. Steele-Mortimer, D. Dorward, M. A. Prado, and B. Caughey. 2005. Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells. *J Neurosci* 25 (21):5207-5216.
- Magrane, J., R. C. Smith, K. Walsh, and H. W. Querfurth. 2004. Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. *J Neurosci* 24 (7):1700-1706.
- Mailhos, C., M. K. Howard, and D. S. Latchman. 1993. Heat shock protects neuronal cells from programmed cell death by apoptosis. *Neuroscience* 55 (3):621-627.
- Mallucci, G., A. Dickinson, J. Linehan, P. C. Klohn, S. Brandner, and J. Collinge. 2003. Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 302 (5646):871-874.
- Manson, J. C., A. R. Clarke, P. A. McBride, I. McConnell, and J. Hope. 1994. PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology. *Neurodegeneration* 3 (4):331-340.

- Marella, M., S. Lehmann, J. Grassi, and J. Chabry. 2002. Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *J Biol Chem* 277 (28):25457-25464.
- Martins, V. R., F. H. Beraldo, G. N. Hajj, M. H. Lopes, K. S. Lee, M. M. Prado, and R. Linden. 2010. Prion protein: orchestrating neurotrophic activities. *Curr Issues Mol Biol* 12 (2):63-86.
- Martins, V. R., E. Graner, J. Garcia-Abreu, S. J. de Souza, A. F. Mercadante, S. S. Veiga, S. M. Zanata, V. M. Neto, and R. R. Brentani. 1997. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat Med* 3 (12):1376-1382.
- Mastrianni, J. A., R. Nixon, R. Layzer, G. C. Telling, D. Han, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1999. Prion protein conformation in a patient with sporadic fatal insomnia. *N Engl J Med* 340 (21):1630-1638.
- Mathiason, C. K., S. A. Hays, J. Powers, J. Hayes-Klug, J. Langenberg, S. J. Dahmes, D. A. Osborn, K. V. Miller, R. J. Warren, G. L. Mason, and E. A. Hoover. 2009. Infectious prions in pre-clinical deer and transmission of chronic wasting disease solely by environmental exposure. *PLoS ONE* 4 (6):e5916.
- Matsubara, E., C. Soto, S. Governale, B. Frangione, and J. Ghiso. 1996. Apolipoprotein J and Alzheimer's amyloid beta solubility. *Biochem J* 316 (Pt 2):671-679.
- Mayer, M. L., L. Vyklicky, Jr., and J. Clements. 1989. Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. *Nature* 338 (6214):425-427.
- McBain, C. J., and M. L. Mayer. 1994. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev* 74 (3):723-760.
- McGowan, J. P. 1914. Investigation into the disease of sheep called scrapie with special reference to its association with sarcosporidiosis. *Rept. 223, Edinburgh and East of Scotland College of Agriculture. Blackwood, Edinburgh.*
- McGowan, J. P. 1922. Scrapie in sheep. *Scottish J. Agric.* 5:365-375.
- McHattie, S., and N. Edington. 1999. Clusterin prevents aggregation of neuropeptide 106-126 in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 259 (2):336-340.
- McKinley, M. P., R. K. Meyer, L. Kenaga, F. Rahbar, R. Cotter, A. Serban, and S. B. Prusiner. 1991. Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J Virol* 65 (3):1340-1351.
- McLennan, N. F., P. M. Brennan, A. McNeill, I. Davies, A. Fotheringham, K. A. Rennison, D. Ritchie, F. Brannan, M. W. Head, J. W. Ironside, A. Williams, and J. E. Bell. 2004. Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *Am J Pathol* 165 (1):227-235.
- McMillan, D. R., X. Xiao, L. Shao, K. Graves, and I. J. Benjamin. 1998. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem* 273 (13):7523-7528.
- Meier, P., N. Genoud, M. Prinz, M. Maissen, T. Rulicke, A. Zurbriggen, A. J. Raeber, and A. Aguzzi. 2003. Soluble dimeric prion protein binds PrP(Sc) in vivo and antagonizes prion disease. *Cell* 113 (1):49-60.
- Mestel, R. 1996. Putting prions to the test. *Science* 273 (5272):184-189.
- Meyer-Luehmann, M., J. Coomaraswamy, T. Bolmont, S. Kaeser, C. Schaefer, E. Kilger, A. Neuenschwander, D. Abramowski, P. Frey, A. L. Jaton, J. M.

- Vigouret, P., Paganetti, D. M., Walsh, P. M., Mathews, J., Ghiso, M., Staufenbiel, L. C., Walker, and M. Jucker. 2006. Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* 313 (5794):1781-1784.
- Meyer, D. I., and B. Dobberstein. 1980. Identification and characterization of a membrane component essential for the translocation of nascent proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 87:503-508.
- Meyer, R. K., A. Lustig, B. Oesch, R. Fatzer, A. Zurbriggen, and M. Vandevelde. 2000. A monomer-dimer equilibrium of a cellular prion protein (PrP^C) not observed with recombinant PrP. *J Biol Chem* 275 (48):38081-38087.
- Meyer, R. K., M. P. McKinley, K. A. Bowman, M. B. Braunfeld, R. A. Barry, and S. B. Prusiner. 1986. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2310-2314.
- Michel, D., G. Chatelain, S. North, and G. Brun. 1997. Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene. *Biochem J* 328 (Pt 1):45-50.
- Miesbauer, M., N. V. Pfeiffer, A. S. Rambold, V. Muller, S. Kiachopoulos, K. F. Winklhofer, and J. Tatzelt. 2009. Alpha-helical domains promote translocation of intrinsically disordered polypeptides into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 284:24384-24393.
- Milhavet, O., A. Mange, D. Casanova, and S. Lehmann. 2000. Effect of Congo red on wild-type and mutated prion proteins in cultured cells. *J Neurochem* 74 (1):222-230.
- Mitteregger, G., M. Vosko, B. Krebs, W. Xiang, V. Kohlmannsperger, S. Nolting, G. F. Hamann, and H. A. Kretzschmar. 2007. The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein. *Brain Pathol* 17 (2):174-183.
- Miyazono, M., T. Kitamoto, T. Iwaki, and J. Tateishi. 1992. Colocalization of prion protein and beta protein in the same amyloid plaques in patients with Gerstmann-Straussler syndrome. *Acta Neuropathol* 83 (4):333-339.
- Moleres, F. J., and J. L. Velayos. 2005. Expression of PrP(C) in the rat brain and characterization of a subset of cortical neurons. *Brain Res* 1056 (1):10-21.
- Morillas, M., D. L. Vanik, and W. K. Surewicz. 2001. On the mechanism of alpha-helix to beta-sheet transition in the recombinant prion protein. *Biochemistry* 40 (23):6982-6987.
- Morimoto, R. I. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12 (24):3788-3796.
- Morimoto, R. I. 2008. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev* 22 (11):1427-1438.
- Morley, J. F., H. R. Brignull, J. J. Weyers, and R. I. Morimoto. 2002. The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (16):10417-10422.
- Moser, M., R. J. Colello, U. Pott, and B. Oesch. 1995. Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* 14 (3):509-517.
- Mosser, D. D., and R. I. Morimoto. 2004. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 23 (16):2907-2918.
- Mougenot, A. L., S. Nicot, A. Bencsik, E. Morignat, J. Verchere, L. Lakhdar, S. Legastelois, and T. Baron. 2011. Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol Aging*.

- Mouillet-Richard, S., M. Ermonval, C. Chebassier, J. L. Laplanche, S. Lehmann, J. M. Launay, and O. Kellermann. 2000. Signal Transduction Through Prion Protein. *Science* 289:1925-1928.
- Mouillet-Richard, S., B. Schneider, E. Pradines, M. Pietri, M. Ermonval, J. Grassi, J. G. Richards, V. Mutel, J. M. Launay, and O. Kellermann. 2007. Cellular prion protein signaling in serotonergic neuronal cells. *Ann N Y Acad Sci* 1096:106-119.
- Muchowski, P. J., and J. L. Wacker. 2005. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci* 6 (1):11-22.
- Muller, W. E., H. Ushijima, H. C. Schroder, J. M. Forrest, W. F. Schatton, P. G. Rytik, and M. Heffner-Lauc. 1993. Cytoprotective effect of NMDA receptor antagonists on prion protein (PrionSc)-induced toxicity in rat cortical cell cultures. *Eur J Pharmacol* 246 (3):261-267.
- Munter, L. M., P. Voigt, A. Harmeier, D. Kaden, K. E. Gottschalk, C. Weise, R. Pipkorn, M. Schaefer, D. Langosch, and G. Multhaup. 2007. GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of A β 42. *Embo J* 26 (6):1702-1712.
- Muramoto, T., S. J. DeArmond, M. Scott, G. C. Telling, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. 1997. Heritable disorder resembling neuronal storage disease in mice expressing prion protein with deletion of an α -helix. *Nat. Med.* 3:750-755.
- Narayan, P., A. Orte, R. W. Clarke, B. Bolognesi, S. Hook, K. A. Ganzinger, S. Meehan, M. R. Wilson, C. M. Dobson, and D. Klenerman. 2012. The extracellular chaperone clusterin sequesters oligomeric forms of the amyloid-beta(1-40) peptide. *Nat Struct Mol Biol* 19 (1):79-83.
- Nazor, K. E., T. Seward, and G. C. Telling. 2007. Motor behavioral and neuropathological deficits in mice deficient for normal prion protein expression. *Biochim Biophys Acta* 1772 (6):645-653.
- Nico, P. B., F. de-Paris, E. R. Vinade, O. B. Amaral, I. Rockenbach, B. L. Soares, R. Guarnieri, L. Wichert-Ana, F. Calvo, R. Walz, I. Izquierdo, A. C. Sakamoto, R. Brentani, V. R. Martins, and M. M. Bianchin. 2005. Altered behavioural response to acute stress in mice lacking cellular prion protein. *Behav Brain Res* 162 (2):173-181.
- Nicolas, O., R. Gavin, and J. A. del Rio. 2009. New insights into cellular prion protein (PrP^c) functions: the "ying and yang" of a relevant protein. *Brain Res Rev* 61 (2):170-184.
- Oesch, B., D. Westaway, M. Wälchli, M. P. McKinley, S. B. H. Kent, R. Aebersold, R. A. Barry, P. Tempst, D. B. Teplow, L. E. Hood, S. B. Prusiner, and C. Weissmann. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP^{Sc} 27-30 protein. *Cell* 40:735-746.
- Olzscha, H., S. M. Schermann, A. C. Woerner, S. Pinkert, M. H. Hecht, G. G. Tartaglia, M. Vendruscolo, M. Hayer-Hartl, F. U. Hartl, and R. M. Vabulas. 2011. Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions. *Cell* 144 (1):67-78.
- Ondrejcek, T., I. Klyubin, N. W. Hu, A. E. Barry, W. K. Cullen, and M. J. Rowan. 2010. Alzheimer's disease amyloid beta-protein and synaptic function. *Neuromolecular Med* 12 (1):13-26.
- Owen, F., M. Poulter, J. Collinge, M. Leach, R. Lofthouse, T. J. Crow, and A. E. Harding. 1992. A dementing illness associated with a novel insertion in the prion protein gene. *Brain Res Mol Brain Res* 13 (1-2):155-157.

- Pan, K.-M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. 1993. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10962-10966.
- Parchi, P., S. Capellari, S. Chin, H. B. Schwarz, N. P. Schecter, J. D. Butts, P. Hudkins, D. K. Burns, J. M. Powers, and P. Gambetti. 1999. A subtype of sporadic prion disease mimicking fatal familial insomnia. *Neurology* 52 (9):1757-1763.
- Parodi, A. J. 2000. Protein glycosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem* 69:69-93.
- Parry, H. B. 1983. Scrapie disease in sheep. In: *Oppenheimer, D.R. (ed.). Academic Press, London.*
- Pattison, I. H. 1965. Experiments with Scrapie with Special Reference to the Nature of the Agent and the Pathology of the disease. In: *Gajdusek CJ, Gibbs CJ, Alpers MP, editors. Slow, Latent and Temperate Virus Infections, NINDB Monograph 2. Washington DC: U.S. Government Printing:249-257.*
- Paulick, M. G., and C. R. Bertozzi. 2008. The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry* 47 (27):6991-7000.
- Pearson, G. R., T. J. Gruffydd-Jones, J. M. Wyatt, J. Hope, A. Chong, A. C. Scott, M. Dawson, and G. A. Wells. 1991. Feline spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 128 (22):532.
- Perez, N., J. Sugar, S. Charya, G. Johnson, C. Merrill, L. Bierer, D. Perl, V. Haroutunian, and W. Wallace. 1991. Increased synthesis and accumulation of heat shock 70 proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 11 (3-4):249-254.
- Peters, P. J., A. J. Mironov, D. Peretz, E. Van Donselaar, E. Leclerc, S. Erpel, S. J. DeArmond, D. R. Burton, R. A. Williamson, M. Vey, and S. B. Prusiner. 2003. Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol* 162 (4):703-717.
- Podlisny, M. B., B. L. Ostaszewski, S. L. Squazzo, E. H. Koo, R. E. Rydell, D. B. Teplow, and D. J. Selkoe. 1995. Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture. *J Biol Chem* 270 (16):9564-9570.
- Polymenidou, M., and D. W. Cleveland. 2011. The seeds of neurodegeneration: prion-like spreading in ALS. *Cell* 147 (3):498-508.
- Prusiner, S. B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144.
- Prusiner, S. B. 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science* 252:1515-1522.
- Prusiner, S. B. 1997. Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 278 (5336):245-251.
- Prusiner, S. B. 1998. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (23):13363-13383.
- Prusiner, S. B., D. Groth, A. Serban, R. Koehler, D. Foster, M. Torchia, D. Burton, S. L. Yang, and S. J. DeArmond. 1993. Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (22):10608-10612.
- Prusiner, S. B., D. F. Groth, D. C. Bolton, S. B. Kent, and L. E. Hood. 1984. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* 38:127-134.

- Prusiner, S. B., M. Scott, D. Foster, K.-M. Pan, D. Groth, C. Miranda, M. Torchia, S.-L. Yang, D. Serban, G. A. Carlson, P. C. Hoppe, D. Westaway, and S. J. DeArmond. 1990a. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 63:673-686.
- Prusiner, S. B., M. Scott, D. Foster, K. M. Pan, D. Groth, C. Miranda, M. Torchia, S. L. Yang, D. Serban, G. A. Carlson, and et al. 1990b. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 63 (4):673-686.
- Prusiner, S. B., M. R. Scott, S. J. DeArmond, and F. E. Cohen. 1998. Prion protein biology. *Cell* 93 (3):337-348.
- Rajdev, S., K. Hara, Y. Kokubo, R. Mestrlil, W. Dillmann, P. R. Weinstein, and F. R. Sharp. 2000. Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction. *Ann Neurol* 47 (6):782-791.
- Rambold, A. S., M. Miesbauer, D. Rapaport, T. Bartke, M. Baier, K. F. Winklhofer, and J. Tatzelt. 2006. Association of Bcl-2 with misfolded prion protein is linked to the toxic potential of cytosolic PrP. *Mol Biol Cell* 17:3356-3368.
- Rambold, A. S., V. Müller, U. Ron, N. Ben-Tal, K. F. Winklhofer, and J. Tatzelt. 2008. Stress-protective activity of prion protein is corrupted by scrapie-prions. *Embo J* 27:1974-1984.
- Rane, N. S., J. L. Yonkovich, and R. S. Hegde. 2004. Protection from cytosolic prion protein toxicity by modulation of protein translocation. *Embo J* 23:4550-4559.
- Rangel, A., F. Burgaya, R. Gavin, E. Soriano, A. Aguzzi, and J. A. Del Rio. 2007. Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: Role of AMPA/kainate receptors. *J Neurosci Res* 85:2741-2755.
- Ravits, J., P. Laurie, Y. Fan, and D. H. Moore. 2007. Implications of ALS focality: rostral-caudal distribution of lower motor neuron loss postmortem. *Neurology* 68 (19):1576-1582.
- Ren, P. H., J. E. Lauckner, I. Kachirskaia, J. E. Heuser, R. Melki, and R. R. Kopito. 2009. Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. *Nat Cell Biol* 11 (2):219-225.
- Resenberger, U. K., A. Harmeier, A. C. Woerner, J. L. Goodman, V. Muller, R. Krishnan, R. M. Vabulas, H. A. Kretzschmar, S. Lindquist, F. U. Hartl, G. Multhaup, K. F. Winklhofer, and J. Tatzelt. 2011a. The cellular prion protein mediates neurotoxic signalling of beta-sheet-rich conformers independent of prion replication. *Embo J* 30 (10):2057-2070.
- Resenberger, U. K., K. F. Winklhofer, and J. Tatzelt. 2011b. Neuroprotective and neurotoxic signaling by the prion protein. *Top Curr Chem* 305:101-119.
- Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, and K. Wuthrich. 1996. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* 382 (6587):180-182.
- Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, R. Glockshuber, and K. Wuthrich. 1997. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett* 413 (2):282-288.
- Riesner, D. 2003. Biochemistry and structure of PrP(C) and PrP(Sc). *Br Med Bull* 66:21-33.

- Saborio, G. P., B. Permanne, and C. Soto. 2001. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411 (6839):810-813.
- Saborio, G. P., C. Soto, R. J. Kascsak, E. Levy, R. Kascsak, D. A. Harris, and B. Frangione. 1999. Cell-lysate conversion of prion protein into its protease-resistant isoform suggests the participation of a cellular chaperone. *Biochem Biophys Res Commun* 258 (2):470-475.
- Safar, J., P. P. Roller, D. C. Gajdusek, and C. J. Gibbs, Jr. 1993. Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Protein Sci* 2 (12):2206-2216.
- Safar, J. G., K. Kellings, A. Serban, D. Groth, J. E. Cleaver, S. B. Prusiner, and D. Riesner. 2005. Search for a prion-specific nucleic acid. *J Virol* 79 (16):10796-10806.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839):487-491.
- Sailer, A., H. Büeler, M. Fischer, A. Aguzzi, and C. Weissmann. 1994. No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* 77:967-968.
- Sakaguchi, S., D. Ishibashi, and H. Matsuda. 2009. Antibody-based immunotherapeutic attempts in experimental animal models of prion diseases. *Expert Opin Ther Pat* 19 (7):907-917.
- Sakthivelu, V., R. P. Seidel, K. F. Winklhofer, and J. Tatzelt. 2011. Conserved stress-protective activity between prion protein and Shadoo. *J Biol Chem* 286 (11):8901-8908.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and t. Maniatis. 1989. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (12):5463-5467.
- Sanger, F., S. 1992. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 24:104-108.
- Schagger, H., and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166 (2):368-379.
- Scheibel, T., A. S. Kowal, J. D. Bloom, and S. L. Lindquist. 2001. Bidirectional amyloid fiber growth for a yeast prion determinant. *Curr Biol* 11 (5):366-369.
- Schubert, D., C. Behl, R. Lesley, A. Brack, R. Dargusch, Y. Sagara, and H. Kimura. 1995. Amyloid peptides are toxic via a common oxidative mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (6):1989-1993.
- Schumacher, M. C., U. Resenberger, R. P. Seidel, C. F. Becker, K. F. Winklhofer, D. Oesterhelt, J. Tatzelt, and M. Engelhard. 2010. Synthesis of a GPI anchor module suitable for protein post-translational modification. *Biopolymers* 94 (4):457-464.
- Scott, M., D. Foster, C. Miranda, D. Serban, F. Coufal, M. Walchli, M. Torchia, D. Groth, G. Carlson, S. J. DeArmond, D. Westaway, and S. B. Prusiner. 1989. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59 (5):847-857.
- Scott, M., D. Groth, D. Foster, M. Torchia, S. L. Yang, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1993. Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell* 73 (5):979-988.

- Scott, M. R., D. Groth, J. Tatzelt, M. Torchia, P. Tremblay, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1997. Propagation of prion strains through specific conformers of the prion protein. *J Virol* 71 (12):9032-9044.
- Scott, M. R., R. Will, J. Ironside, H. O. Nguyen, P. Tremblay, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1999. Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (26):15137-15142.
- Seelig, D. M., G. L. Mason, G. C. Telling, and E. A. Hoover. 2010. Pathogenesis of chronic wasting disease in cervidized transgenic mice. *Am J Pathol* 176 (6):2785-2797.
- Seidel, R., and M. Engelhard. 2011. Chemical biology of prion protein: tools to bridge the in vitro/vivo interface. *Top Curr Chem* 305:199-223.
- Shankar, G. M., B. L. Bloodgood, M. Townsend, D. M. Walsh, D. J. Selkoe, and B. L. Sabatini. 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27 (11):2866-2875.
- Shankar, G. M., and D. M. Walsh. 2009. Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and Aβeta. *Molecular neurodegeneration* 4:48.
- Shenoy-Scaria, A. M., L. K. Gauen, J. Kwong, A. S. Shaw, and D. M. Lublin. 1993. Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol Cell Biol* 13 (10):6385-6392.
- Shirotani, K., M. Tomioka, E. Kremmer, C. Haass, and H. Steiner. 2007. Pathological activity of familial Alzheimer's disease-associated mutant presenilin can be executed by six different gamma-secretase complexes. *Neurobiol Dis* 27 (1):102-107.
- Shmerling, D., I. Hegyi, M. Fischer, T. Blättler, S. Brandner, J. Götz, T. Rülcke, E. Flechsig, A. Cozzio, C. von Mehring, C. Hangartner, A. Aguzzi, and C. Weissmann. 1998. Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* 93:203-214.
- Shorter, J., and S. Lindquist. 2005. Prions as adaptive conduits of memory and inheritance. *Nat Rev Genet* 6 (6):435-450.
- Shyng, S. L., J. E. Heuser, and D. A. Harris. 1994. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol* 125 (6):1239-1250.
- Shyu, W. C., S. Z. Lin, M. F. Chiang, D. C. Ding, K. W. Li, S. F. Chen, H. I. Yang, and H. Li. 2005. Overexpression of PrPC by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model. *J Neurosci* 25 (39):8967-8977.
- Sigurdson, C. J., K. P. Nilsson, S. Hornemann, M. Heikenwalder, G. Manco, P. Schwarz, D. Ott, T. Rulicke, P. P. Liberski, C. Julius, J. Falsig, L. Stitz, K. Wuthrich, and A. Aguzzi. 2009. De novo generation of a transmissible spongiform encephalopathy by mouse transgenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (1):304-309.
- Sigurdson, C. J., K. P. Nilsson, S. Hornemann, G. Manco, N. Fernandez-Borges, P. Schwarz, J. Castilla, K. Wuthrich, and A. Aguzzi. 2010. A molecular switch controls interspecies prion disease transmission in mice. *J Clin Invest* 120 (7):2590-2599.

- Sigurdsson, B. 1954. Rida, a chronic encephalitis of sheep with general remarks in infections which develop slowly and some of their special characteristics. *BrVetJ* 110:341-354.
- Simon, M. M., A. Reikerstorfer, A. Schwarz, C. Krone, T. A. Luger, M. Jaattela, and T. Schwarz. 1995. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J Clin Invest* 95 (3):926-933.
- Smith, D. F., W. P. Sullivan, T. N. Marion, K. Zaitso, B. Madden, D. J. McCormick, and D. O. Toft. 1993. Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. *Mol Cell Biol* 13 (2):869-876.
- Soto, C. 2003. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 4 (1):49-60.
- Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, and M. Goedert. 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388 (6645):839-840.
- Spudich, A., R. Frigg, E. Kilic, U. Kilic, B. Oesch, A. Raeber, C. L. Bassetti, and D. M. Hermann. 2005. Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/2 and STAT-1. *Neurobiol Dis* 20 (2):442-449.
- Stahl, N., M. A. Baldwin, D. B. Teplow, L. Hood, B. W. Gibson, A. L. Burlingame, and S. B. Prusiner. 1993. Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 32 (8):1991-2002.
- Steele, A. D., G. Hutter, W. S. Jackson, F. L. Heppner, A. W. Borkowski, O. D. King, G. J. Raymond, A. Aguzzi, and S. Lindquist. 2008. Heat shock factor 1 regulates lifespan as distinct from disease onset in prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (36):13626-13631.
- Stella, R., M. L. Massimino, M. Sandri, M. C. Sorgato, and A. Bertoli. 2010. Cellular prion protein promotes regeneration of adult muscle tissue. *Mol Cell Biol* 30 (20):4864-4876.
- Stys, P. K., H. You, and G. W. Zamponi. 2012. Copper-dependent regulation of NMDA receptors by cellular prion protein: implications for neurodegenerative disorders. *J Physiol* 590 (Pt 6):1357-1368.
- Su, J. H., M. Zhao, A. J. Anderson, A. Srinivasan, and C. W. Cotman. 2001. Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: correlation with Alzheimer pathology. *Brain Res* 898 (2):350-357.
- Sunde, M., L. C. Serpell, M. Bartlam, P. E. Fraser, M. B. Pepys, and C. C. Blake. 1997. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol* 273 (3):729-739.
- Sunyach, C., A. Jen, J. Deng, K. T. Fitzgerald, Y. Frobert, J. Grassi, M. W. McCaffrey, and R. Morris. 2003. The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *Embo J* 22:3591-3601.
- Surewicz, W. K., and M. I. Apostol. 2011. Prion protein and its conformational conversion: a structural perspective. *Top Curr Chem* 305:135-167.
- Swietnicki, W., M. Morillas, S. G. Chen, P. Gambetti, and W. K. Surewicz. 2000. Aggregation and fibrillization of the recombinant human prion protein huPrP90-231. *Biochemistry* 39 (2):424-431.

- Tamguney, G., K. Giles, E. Bouzamondo-Bernstein, P. J. Bosque, M. W. Miller, J. Safar, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 2006. Transmission of elk and deer prions to transgenic mice. *J Virol* 80 (18):9104-9114.
- Tatzelt, J., S. B. Prusiner, and W. J. Welch. 1996. Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *Embo J* 15 (23):6363-6373.
- Tatzelt, J., and K. F. Winklhofer. 2004. Folding and misfolding of the prion protein in the secretory pathway. *Amyloid* 11:162-172.
- Tatzelt, J., J. R. Zuo, R. Voellmy, M. Scott, U. Hartl, S. B. Prusiner, and W. J. Welch. 1995. Scrapie prions selectively modify the stress response in neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (7):2944-2948.
- Telling, G. C., M. Scott, J. Mastrianni, R. Gabizon, M. Torchia, F. E. Cohen, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1995. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83:79-90.
- Tobler, I., S. E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rüllicke, M. Moser, B. Oesch, P. A. McBride, and J. C. Manson. 1996. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380:639-642.
- Tompa, P., M. Fuxreiter, C. J. Oldfield, I. Simon, A. K. Dunker, and V. N. Uversky. 2009. Close encounters of the third kind: disordered domains and the interactions of proteins. *Bioessays* 31 (3):328-335.
- Townsend, M., G. M. Shankar, T. Mehta, D. M. Walsh, and D. J. Selkoe. 2006. Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol* 572 (Pt 2):477-492.
- Tranulis, M. A., S. L. Benestad, T. Baron, and H. Kretzschmar. 2011. Atypical prion diseases in humans and animals. *Top Curr Chem* 305:23-50.
- Tuite, M. F., R. Marchante, and V. Kushnirov. 2011. Fungal prions: structure, function and propagation. *Top Curr Chem* 305:257-298.
- Uversky, V. N. 2009. Intrinsic disorder in proteins associated with neurodegenerative diseases. *Front Biosci* 14:5188-5238.
- Van Molle, W., B. Wielockx, T. Mahieu, M. Takada, T. Taniguchi, K. Sekikawa, and C. Libert. 2002. HSP70 protects against TNF-induced lethal inflammatory shock. *Immunity* 16 (5):685-695.
- Viles, J. H., F. E. Cohen, S. B. Prusiner, D. B. Goodin, P. E. Wright, and H. J. Dyson. 1999. Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2042-2047.
- Voellmy, R., A. Ahmed, P. Schiller, P. Bromley, and D. Rungger. 1985. Isolation and functional analysis of a human 70,000-dalton heat shock protein gene segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (15):4949-4953.
- Wadsworth, J. D., A. F. Hill, J. A. Beck, and J. Collinge. 2003. Molecular and clinical classification of human prion disease. *Br Med Bull* 66:241-254.
- Wadsworth, J. D., S. Joiner, A. F. Hill, T. A. Campbell, M. Desbruslais, P. J. Luthert, and J. Collinge. 2001. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 358 (9277):171-180.
- Walsh, D. M., I. Klyubin, J. V. Fadeeva, W. K. Cullen, R. Anwyl, M. S. Wolfe, M. J. Rowan, and D. J. Selkoe. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* 416 (6880):535-539.

- Walsh, D. M., and D. J. Selkoe. 2007. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101 (5):1172-1184.
- Walter, P., and G. Blobel. 1980. Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:7112-7116.
- Walter, P., and G. Blobel. 1982. Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* 299:691-698.
- Walter, P., R. Gilmore, and G. Blobel. 1984. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell* 38:5-8.
- Walz, R., O. B. Amaral, I. C. Rockenbach, R. Roesler, I. Izquierdo, E. A. Cavalheiro, V. R. Martins, and R. R. Brentani. 1999. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 40 (12):1679-1682.
- Wang, F., X. Wang, C. G. Yuan, and J. Ma. 2010. Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* 327 (5969):1132-1135.
- Wang, X., S. L. Bowers, F. Wang, X. A. Pu, R. J. Nelson, and J. Ma. 2009. Cytoplasmic prion protein induces forebrain neurotoxicity. *Biochim Biophys Acta*.
- Watt, N. T., D. R. Taylor, A. Gillott, D. A. Thomas, W. S. Perera, and N. M. Hooper. 2005. Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *J Biol Chem* 280 (43):35914-35921.
- Wei, Y., T. Liu, S. L. Sazinsky, D. A. Moffet, I. Pelczer, and M. H. Hecht. 2003. Stably folded de novo proteins from a designed combinatorial library. *Protein Sci* 12 (1):92-102.
- Weise, J., R. Sandau, S. Schwarting, O. Crome, A. Wrede, W. Schulz-Schaeffer, I. Zerr, and M. Bahr. 2006. Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* 37 (5):1296-1300.
- Weissmann, C., H. Bueler, M. Fischer, A. Sauer, and M. Aguet. 1994. Susceptibility to scrapie in mice is dependent on PrPC. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 343 (1306):431-433.
- Weissmann, C., M. Fischer, A. Raeber, H. Büeler, A. Sailer, D. Shmerling, T. Rüllicke, S. Brandner, and A. Aguzzi. 1996. The role of PrP in pathogenesis of experimental scrapie. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61:511-522.
- Weissmann, C., and E. Flechsig. 2003. PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Br Med Bull* 66:43-60.
- Wells, G. A., A. C. Scott, C. T. Johnson, R. F. Gunning, R. D. Hancock, M. Jeffrey, M. Dawson, and R. Bradley. 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 121 (18):419-420.
- West, M. W., W. Wang, J. Patterson, J. D. Mancias, J. R. Beasley, and M. H. Hecht. 1999. De novo amyloid proteins from designed combinatorial libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (20):11211-11216.
- Westergard, L., H. M. Christensen, and D. A. Harris. 2007. The cellular prion protein (PrP(C)): Its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* 1772:629-644.

- Westerheide, S. D., and R. I. Morimoto. 2005. Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J Biol Chem* 280 (39):33097-33100.
- Wickner, R. B. 1994. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae* [see comments]. *Science* 264 (5158):566-569.
- Wickner, R. B., H. K. Edskes, M. L. Maddelein, K. L. Taylor, and H. Moriyama. 1999. Prions of yeast and fungi. Proteins as genetic material. *J Biol Chem* 274 (2):555-558.
- Wilesmith, J. W., J. B. Ryan, and M. J. Atkinson. 1991. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec* 128 (9):199-203.
- Will, R. G., J. W. Ironside, M. Zeidler, S. N. Cousens, K. Estibeiro, A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari, A. Hofman, and P. G. Smith. 1996. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347 (9006):921-925.
- Williams, E. S., and M. W. Miller. 2002. Chronic wasting disease in deer and elk in North America. *Rev Sci Tech* 21 (2):305-316.
- Williams, E. S., and S. Young. 1980. Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis* 16 (1):89-98.
- Williams, E. S. 1982. Spongiform encephalopathy of Rocky Mountain elk. *J Wildl Dis* 18 (4):465-471.
- Winklhofer, K. F., and C. Haass. 2010. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1802 (1):29-44.
- Winklhofer, K. F., J. Heske, U. Heller, A. Reintjes, W. Muranji, I. Moarefi, and J. Tatzelt. 2003. Determinants of the in vivo-folding of the prion protein: a bipartite function of helix 1 in folding and aggregation. *J Biol Chem* 278 (17):14961-14970.
- Winklhofer, K. F., A. Reintjes, M. C. Hoener, R. Voellmy, and J. Tatzelt. 2001. Geldanamycin restores a defective heat shock response *in vivo*. *J Biol Chem* 276:45160-45167.
- Winklhofer, K. F., J. Tatzelt, and C. Haass. 2008. The two faces of protein misfolding: Gain and loss of function in neurodegenerative diseases. *Embo J* 27:336-349.
- Wopfner, F., G. Weidenhöfer, R. Schneider, A. von Brunn, S. Gilch, T. F. Schwarz, T. Werner, and H. M. Schätzl. 1999. Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol* 289 (5):1163-1178.
- Wu, C. 1995. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:441-469.
- Wuthrich, K., and R. Riek. 2001. Three-dimensional structures of prion proteins. *Adv Protein Chem* 57:55-82.
- Wyatt, A. R., J. J. Yerbury, P. Berghofer, I. Greguric, A. Katsifis, C. M. Dobson, and M. R. Wilson. 2011. Clusterin facilitates in vivo clearance of extracellular misfolded proteins. *Cell Mol Life Sci* 68 (23):3919-3931.
- Yamasaki, A., S. Eimer, M. Okochi, A. Smialowska, C. Kaether, R. Baumeister, C. Haass, and H. Steiner. 2006. The GxGD motif of presenilin contributes to catalytic function and substrate identification of gamma-secretase. *J Neurosci* 26 (14):3821-3828.
- Yang, Y. L., K. T. Lu, H. J. Tsay, C. H. Lin, and M. T. Lin. 1998. Heat shock protein expression protects against death following exposure to heatstroke in rats. *Neurosci Lett* 252 (1):9-12.

- Yenari, M. A., J. Liu, Z. Zheng, Z. S. Vexler, J. E. Lee, and R. G. Giffard. 2005. Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection. *Ann N Y Acad Sci* 1053:74-83.
- Yerbury, J. J., S. Poon, S. Meehan, B. Thompson, J. R. Kumita, C. M. Dobson, and M. R. Wilson. 2007. The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *Faseb J* 21 (10):2312-2322.
- Yerbury, J. J., E. M. Stewart, A. R. Wyatt, and M. R. Wilson. 2005. Quality control of protein folding in extracellular space. *EMBO Rep* 6 (12):1131-1136.
- Yoo, B. C., R. Seidl, N. Cairns, and G. Lubec. 1999. Heat-shock protein 70 levels in brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 57:315-322.
- You, H., S. Tsutsui, S. Hameed, T. J. Kannanayakal, L. Chen, P. Xia, J. D. Engbers, S. A. Lipton, P. K. Stys, and G. W. Zamponi. 2012. Abeta neurotoxicity depends on interactions between copper ions, prion protein, and N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (5):1737-1742.
- Zahn, R., A. Liu, T. Luhrs, R. Riek, C. von Schroetter, F. Lopez Garcia, M. Billeter, L. Calzolari, G. Wider, and K. Wuthrich. 2000. NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (1):145-150.
- Zanata, S. M., M. H. Lopes, A. F. Mercadante, G. N. Hajj, L. B. Chiarini, R. Nomizo, A. R. Freitas, A. L. Cabral, K. S. Lee, M. A. Juliano, E. de Oliveira, S. G. Jachieri, A. Burlingame, L. Huang, R. Linden, R. R. Brentani, and V. R. Martins. 2002. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *Embo J* 21 (13):3307-3316.
- Zou, W. Q., X. Xiao, J. Yuan, G. Puoti, H. Fujioka, X. Wang, S. Richardson, X. Zhou, R. Zou, S. Li, X. Zhu, P. L. McGeer, J. McGeehan, G. Kneale, D. E. Rincon-Limas, P. Fernandez-Funez, H. G. Lee, M. A. Smith, R. B. Petersen, and J. P. Guo. 2011. Amyloid-beta42 interacts mainly with insoluble prion protein in the Alzheimer brain. *J Biol Chem* 286 (17):15095-15105.
- Zuo, J., D. Rungger, and R. Voellmy. 1995. Multiple layers of regulation of human heat shock transcription factor 1. *Mol Cell Biol* 15 (8):4319-4330.

8 Glossar

Abb.	Abbildung
A β	Amyloid β
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CWD	Chronisch zehrende Hirschkrankheit (<i>chronic wasting disease</i>)
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholat
dpc	<i>days post coitum</i>
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhances Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPSP	Exzitatorisches post-synaptisches Potential
eQKS	Extrazelluläres Qualitätskontrollsystem
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FFI	Fatale Familiäre Insomnie
FSE	Feline spongiforme Enzephalopathie
GFAP	Saure Gliafaserprotein (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HD	Hydrophobe Domäne
HMW	Hohes Molekulargewicht
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Hsp	Hitzeschock-Protein
HSR	Hitzeschock-Antwort
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
LTP	Langzeit-Potenzierung
MEM	Minimal Essential Medium
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)

kb	Kilobasenpaare
kDa	Molekulargewicht von Proteinen (Kilodalton)
LTP	Langzeit-Potenzierung
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
Oligo	Oligomer-Fraktion
OR	Oktarepeat
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ - Ionenkonzentration
PK	Proteinase K
PRNP	PrP-Gen
PrP	Prion-Protein
Ponceau S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfophenylazo)-phenylazo]-2,7- naphthalendisulfonsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
Sarkosyl	N-Lauroylsarkosin
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfat</i>)
SEC	Größenausschlusschromatographie
SOD	Superoxiddismutase
SS	Signalsequenz
STI1	Stress-induzierbares Protein 1
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	Tabacco Etch Virus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol
TSE	Transmissible spongiforme Enzephalopathien
Tween-20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	Enzymaktivität, Umsetzung von 1 μ mol Substanz/min
UPR	<i>Unfolded stress response</i>
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Aminosäuren wurden nach dem Einbuchstaben-Code bezeichnet. Gewichts- und andere Einheiten wurden nach dem internationalen SI-System benannt.

9 Veröffentlichungen

Resenberger, U. K., V. Müller, M. Baier, M. R. Wilson, K. F. Winklhofer, and J. Tatzelt. 2012. The heat shock response is modulated by and interferes with toxic effects of scrapie prion protein and amyloid β .

Zur Publikation eingereicht.

McCarthy, J. M., M. Franke, **U. K. Resenberger**, S. Waldron, J. Tatzelt, D. Appelhans, and M. Rogers. 2012. Intracellular efficacy and method of action of mPPIg5.

Zur Publikation eingereicht.

Resenberger, U. K., K. F. Winklhofer, and J. Tatzelt. 2011c. Neuroprotective and neurotoxic signaling by the prion protein. *Top Curr Chem* 305:101-119.

Resenberger, U. K., K. F. Winklhofer, and J. Tatzelt. 2011b. Cellular Prion Protein Mediates Toxic Signaling of Amyloid Beta. *Neurodegener Dis*.

Resenberger, U. K., A. Harmeyer, A. C. Woerner, J. L. Goodman, V. Muller, R. Krishnan, R. M. Vabulas, H. A. Kretschmar, S. Lindquist, F. U. Hartl, G. Multhaup, K. F. Winklhofer, and J. Tatzelt. 2011a. The cellular prion protein mediates neurotoxic signalling of beta-sheet-rich conformers independent of prion replication. *Embo J* 30 (10):2057-2070.

Schumacher, M. C., **U. Resenberger**, R. P. Seidel, C. F. Becker, K. F. Winklhofer, D. Oesterhelt, J. Tatzelt, and M. Engelhard. 2010. Synthesis of a GPI anchor module suitable for protein post-translational modification. *Biopolymers* 94 (4):457-464.