

**Funktionelle Charakterisierung des Prion-Proteins:  
physiologische Aktivität und  
pathophysiologische Alteration**

Dissertation der  
Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Diplom-Biologin  
Angelika Rambold

1. Juli 2008



## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Dr. Stefan Jentsch. Ihm möchte ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit und seinem guten Händchen bei der Einstellung seiner Mitarbeiter, welche die Jentsch-Abteilung zu einem wunderbaren Arbeitsumfeld macht, danken.

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörg Tatzelt für die unermüdliche Unterstützung, die zahlreichen Diskussionen und die große Freiheit, die er mir beim Bearbeiten der Doktorarbeitsprojekte gelassen hat, bedanken. Zusätzlich zu der angenehmen Arbeitsatmosphäre in seiner Gruppe, hat dies maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Prof. Dr. Michael Schleicher bedanke ich mich für die freundliche Begutachtung dieser Arbeit.

Konstanze Winklhofer, Alexander Buchberger, Ulrich Hartl und Christian Haass möchte ich für die fortwährende Unterstützung danken.

Ein großes Dankeschön geht an die Mitarbeiter der Abteilung von Stefan Jentsch, Ulrich Hartl und Christian Haass. Vom ersten Praktikum bis hin zur Doktorarbeit sind mir dort freundliche, aufgeschlossene und hilfsbereite Menschen begegnet. Bei Till Bartke, Christian Schubert, Lucas Martin, Sylvia Fischer und Regina Fluhrer möchte ich mich hier besonders bedanken.

Ganz besonderer Dank geht an die Arbeitsgruppe Tatzelt/Winklhofer. Margit, Anita, Mareike, Veronika, Kerstin, Katrin, Julia, Lena, Vignesh und Uli möchte ich für die gute, enge, lustige und produktive Zusammenarbeit danken.

Margit, Anita und Mareike: Ich werde unsere Stunden in Cafés, an Seen, in fremden Städten und natürlich die vielen Lachanfälle im Labor (ab jetzt werde ich immer auf meinen Wecker und auf eingeschobene Konsekutivsätze achten) vermissen.

Danken möchte ich auch meinen Freunden die mir in allen Lebenslagen Herz, Hand und manchmal auch Verstand geschenkt haben.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern, meinem Bruder Michi, Anna-Lena und Tim. Ohne Euch wäre mein Leben nicht das Glück das es ist – Danke.





Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Angelika Rambold

München, den 1. Juli 2008

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen April 2004 und Juni 2008 am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried und am Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians Universität, München durchgeführt und von Herrn Prof. Dr. Stefan Jentsch betreut.

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

**Angelika S. Rambold**, Margit Miesbauer, Doron Rapaport, Till Bartke, Michael Baier, Konstanze F. Winklhofer and Jörg Tatzelt. Association of Bcl-2 with Misfolded Prion Protein Is Linked to the Toxic Potential of Cytosolic PrP, *MBC* (17), 2006

**Angelika S. Rambold**, Veronika Müller, Uri Ron, Nir Ben-Tal, Konstanze F. Winklhofer and Jörg Tatzelt. Stress-protective signaling of prion protein is corrupted by scrapie-prions, *EMBO Journal*, 2008, *in press*

**Angelika S. Rambold**, Margit Miesbauer, Diana Olschewski, Michael Baier, Christian Becker, Konstanze F. Winklhofer, Dieter Oesterheld and Jörg Tatzelt. Green tea extracts interfere with the stress-protective activity of PrP<sup>C</sup> and the formation of PrP<sup>Sc</sup>, *J. Neurochem in Revision*

Promotionsgesuch eingereicht am 1. Juli 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 30. September 2008

Erster Gutachter: Prof. Dr. Stefan Jentsch

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Michael Schleicher



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>PRION-ERKRANKUNGEN</b>	<b>2</b>
2.1.1	PRION-ERKRANKUNGEN BEIM TIER	3
2.1.2	PRION-ERKRANKUNGEN BEIM MENSCHEN	5
<b>2.2</b>	<b>DAS PRION-KONZEPT</b>	<b>9</b>
2.2.1	IDENTIFIZIERUNG DES PRION-PROTEINS	9
2.2.2	PRP <sup>C</sup> UND PRP <sup>Sc</sup>	9
2.2.3	PRIONEN-REPLIKATION	10
<b>2.3</b>	<b>DAS PRION-PROTEIN</b>	<b>12</b>
2.3.1	PRNP- KODIERENDES PRION-PROTEIN GEN	12
2.3.2	BIOGENESE VON PRP <sup>C</sup>	12
2.3.3	STRUKTUR DES PRION-PROTEINS	13
<b>2.4</b>	<b>DIE PHYSIOLOGISCHE FUNKTION DES PRION-PROTEINS</b>	<b>15</b>
2.4.1	PRP <sup>C</sup> <i>KNOCK-OUT</i> MÄUSE	15
2.4.2	PRP <sup>C</sup> – MÖGLICHE NEUROPROTEKTIVE KAPAZITÄT	16
2.4.3	PRP <sup>C</sup> – MÖGLICHE ROLLE IN SIGNALTRANSDUKTIONSPROZESSEN	17
2.4.4	PRP <sup>C</sup> UND KUPFER	17
<b>2.5</b>	<b>PRP MISSFALTUNG UND NEURODEGENERATION</b>	<b>18</b>
2.5.1	PRP <sup>Sc</sup> IST IN ABWESENHEIT VON NEURONALEM PRP <sup>C</sup> NICHT TOXISCH	19
2.5.2	PRP-MUTANTEN FÜHREN ZU NEURODEGENERATION IN ABWESENHEIT VON PRP <sup>Sc</sup>	19
<b>2.6</b>	<b>NEURODEGENERATION UND APOPTOSE</b>	<b>21</b>
2.6.1	MOLEKULARE MECHANISMEN DER APOPTOSE	21
2.6.2	DIE BCL-2-FAMILIE	22
<b>2.7</b>	<b>THERAPEUTISCHE ANSÄTZE FÜR PRION-ERKRANKUNGEN</b>	<b>25</b>
<b>2.8</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>TEIL 1: NEUROTOXISCHE MECHANISMEN BEI PRION-ERKRANKUNGEN: AGGREGATION VON MISSGEFALTETEM PRP IN VERSCHIEDENEN ZELLKOMPARTIMENTEN</b>	<b>27</b>
3.1.1	GENERIERUNG VON PRP-LOKALISATIONSMUTANTEN	27
3.1.2	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER LOKALISATIONSMUTANTEN	30

---

3.1.2.1	Löslichkeitsprofil der Lokalisationsmutanten	30
3.1.2.2	Proteinase K-Sensitivität der Lokalisationsmutanten	31
3.1.2.3	Aggregationsverhalten der Lokalisationsmutanten	32
3.1.3	ZYTOSOLISCHES PRP WIRD PROTEASOMAL DEGRADIERT	33
3.1.4	AGGREGATION VON PRP IM ZYTOSOL IST TOXISCH	34
3.1.5	ZYTOSOLISCHE FORMEN PATHOGENER DELETIONSMUTANTEN INDUZIEREN APOPTOSE	36
3.1.5.1	Pathogenen Mutanten werden nicht effizient ins ER importiert und im Zytosol proteasomal degradiert	36
3.1.5.2	Zytosolische Formen der pathogenen Mutanten induzieren Apoptose	37
3.1.6	ZYTOPRP ASSOZIIERT UND CO-AGGREGIERT MIT DEM ANTI-APOPTOTISCHEN PROTEIN BCL-2	38
3.1.7	KAUSALER ZUSAMMENHANG ZWISCHEN ZYTOPRP-TOXIZITÄT UND BINDUNG AN BCL-2	41
3.1.7.1	ZytoPrP vermittelte Apoptose kann durch die Expression von Bcl-2 verhindert werden	41
3.1.7.2	Identifizierung der toxischen Domäne von PrP	42
3.1.7.3	Nicht-toxische zytoPrP-Mutanten interagieren nicht mit Bcl-2	43
3.1.8	DIE INTERAKTION VON ZYTOPRP MIT BCL-2 INTERFERIERT MIT DER BINDUNG DES PRO-APOPTOTISCHEN PROTEINS BAX AN BCL-2	44
3.1.9	ZYTOSOLISCHE CHAPERONE BINDEN ZYTOPRP UND INTERFERIEREN MIT DER ZYTOPRP/BCL-2 INDUZierten APOPTOSE	45
3.1.9.1	Zytosolische Chaperone binden zytoPrP	46
3.1.9.2	Überexpression zytosolischer Chaperone verringert die zytoPrP-induzierte Apoptose und interferiert mit der Interaktion von zytoPrP und Bcl-2	48
<b>3.2</b>	<b>TEIL 2: DIE PHYSIOLOGISCHE FUNKTION VON PRP<sup>C</sup></b>	<b>50</b>
3.2.1	NEUROPROTEKTIVES POTENTIAL VON PRP	50
3.2.2	DIE PROTEKTIVE FUNKTION VON PRP IST ABHÄNGIG VON DER INTERNEN HYDROPHOBEN DOMÄNE UND DEM GPI-ANKER	51
3.2.3	DER VERLUST DER GPI-SIGNALSEQUENZ FÜHRT ZU EINER VERÄNDERTEN MEMBRANLOKALISATION	53
3.2.4	DIE HYDROPHOBE DOMÄNE VERMITTELT DIE DIMERISIERUNG VON PRP <sup>C</sup>	54
3.2.5	DIMERISIERUNG IST FÜR DIE PROTEKTIVE FUNKTION VON PRP <sup>C</sup> NÖTIG	56
<b>3.3</b>	<b>TEIL 3: DIE FUNKTION VON PRP<sup>C</sup> FÜR DIE TOXISCHE AKTIVITÄT VON PRP<sup>Sc</sup></b>	<b>57</b>
3.3.1	SCRAPIE-INFIZIERTE ZELLEN SIND GEGENÜBER STRESS SENSITIVER	57
3.3.2	PROPAGIERUNG VON PRP <sup>Sc</sup> INTERFERIERT MIT DER DIMERISIERUNG VON PRP <sup>C</sup>	58
3.3.3	SCRAPIE-PRIONEN-INDUZIERTE APOPTOSE IST ABHÄNGIG VON DER PRP <sup>C</sup> -EXPRESSION	59
3.3.4	PRP <sup>Sc</sup> INDUZIERTE APOPTOSE IN PRP <sup>C</sup> EXPRIMIERENDEN ZELLEN IST MIT DER AKTIVIERUNG DER JUN N-TERMINALEN KINASE GEKOPPELT	62

---

<b>3.4 TEIL 4: STRATEGIEN ZUR INHIBIERUNG DER PRP<sup>Sc</sup>-PROPAGIERUNG</b>	<b>64</b>
3.4.1 EPIGALLOCATECHIN-GALLAT FÜHRT ZUR VERMINDERUNG VON PRP <sup>C</sup> UND PRP <sup>Sc</sup>	64
3.4.2 DIE AKTIVITÄT VON EGCG IST ABHÄNGIG VON DESSEN DREI HYDROXYL-GRUPPEN DER TRIHYDROXYPHENYL-SEITENKETTE	65
3.4.3 EGCG INDUZIERT DIE MISSFALTUNG, INTERNALISIERUNG UND LYSOSOMALE DEGRADIERUNG VON PRP <sup>C</sup>	66
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>69</b>
<b>4.1 PRP<sup>C</sup>, MISSFALTUNG UND NEURODEGENERATION</b>	<b>69</b>
<b>4.2 ZYTOSOLISCHES PRP</b>	<b>70</b>
4.2.1 PATHOPHYSIOLOGISCHE RELEVANZ VON AGGREGIERTEM PRP IM ZYTOSOL	70
4.2.2 DIE ZYTOPRP/BCL-2 INTERAKTION – EIN TOXISCHER KOMPLEX MIT MÖGLICHER PATHOPHYSIOLOGISCHER BEDEUTUNG	71
4.2.3 MODULATION DER ZYTOPRP-TOXIZITÄT – IMPLIKATIONEN FÜR PRION-ERKRANKUNGEN	74
<b>4.3 NEUROPROTEKTION UND TOXIZITÄT DES PRION-PROTEINS</b>	<b>75</b>
4.3.1 DIE PHYSIOLOGISCHE FUNKTION VON PRP	75
4.3.1.1 PrP <sup>C</sup> zeigt eine protektive Aktivität	76
4.3.1.2 Funktionelle Bedeutung der PrP <sup>C</sup> -Homodimerisierung	77
4.3.2 FUNKTIONELL AKTIVES PRP <sup>C</sup> IST FÜR DIE PRP <sup>Sc</sup> /PRIONEN-VERMITTELTE TOXIZITÄT NOTWENDIG	79
4.3.3 DEGRADIERUNG VON PRP <sup>C</sup> - NUTZUNG DIESES MECHANISMUS ALS THERAPIEFORM?	80
<b>4.4 IMPLIKATIONEN FÜR PRION-ERKRANKUNGEN</b>	<b>81</b>
<b>5 MATERIAL</b>	<b>84</b>
<b>5.1 BIOLOGISCHES MATERIAL</b>	<b>84</b>
5.1.1 ZELLINIEN	84
5.1.2 BAKTERIENSTÄMME	84
5.1.3 VEKTOREN UND PLASMIDE	84
5.1.4 ANTIKÖRPER	84
5.1.5 ENZYME, PROTEINE UND INHIBITOREN	85
5.1.6 STANDARD-GRÖßENMARKER FÜR PROTEINE UND NUKLEINSÄUREN	86
5.1.7 SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE	86
<b>5.2 CHEMIKALIEN</b>	<b>88</b>
<b>5.3 LÖSUNGEN UND PUFFER</b>	<b>89</b>
<b>5.4 MEDIEN</b>	<b>92</b>
<b>5.5 KITS</b>	<b>93</b>

---

<b>5.6 SONSTIGE MATERIALIEN</b>	<b>93</b>
<b>5.7 GERÄTE</b>	<b>94</b>
<b>6 METHODEN</b>	<b>97</b>
<b>6.1 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)</b>	<b>97</b>
6.1.1 STANDARD-PCR	97
6.1.2 REKOMBINANTE-PCR	97
6.1.3 PCR-BEDINGUNGEN	98
6.1.4 SEQUENZIERUNGEN	98
6.1.5 GENERIERUNG DER PRP- UND BCL-2-KONSTRUKTE	99
<b>6.2 BAKTERIENKULTUR</b>	<b>102</b>
6.2.1 HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN	102
6.2.2 TRANSFORMATION KOMPETENTER BAKTERIEN	103
6.2.3 DNA-PRÄPARATION	103
<b>6.3 ZELLKULTUR</b>	<b>103</b>
6.3.1 KULTIVIERUNG VON ZELLEN	103
6.3.2 PASSAGIERUNG VON ZELLEN	104
6.3.3 AUSPLATTIEREN VON ZELLEN	104
6.3.4 TRANSFEKTION	104
<b>6.4 PROTEINPRÄPARATION UND ANALYSE</b>	<b>104</b>
6.4.1 PROTEINEXTRAKTION AUS ZELLEN	104
6.4.2 HERSTELLUNG VON GESAMTLYSATEN	105
6.4.3 TRENNUNG VON DETERGENZ-LÖSLICHEN UND -UNLÖSLICHEN PROTEINEN	105
6.4.4 ISOLIERUNG VON GPI-VERANKERTEN PROTEINEN	105
6.4.5 FÄLLUNG VON PROTEINEN	105
6.4.6 AUFKONZENTRIEREN VON PROTEINEN	105
6.4.7 NACHWEIS DER SEKRETION VON PROTEINEN	106
6.4.8 PROTEINKONZENTRATION NACH BRADFORD	106
6.4.9 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	106
6.4.10 NATIVE-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE ZUR AUFTRENNUNG VON PROTEINEN IM NATIVEN ZUSTAND	106
6.4.11 PROTEINTRANSFER AUF NITROZELLULOSE (WESTERN BLOT)	107
6.4.12 IMMUNDETEKTION VON PROTEINEN	107
6.4.13 PONCEAU S – FÄRBUNG	107
6.4.14 IMMUNFLUORESZENZ	108
6.4.15 RADIOAKTIVE IMMUNPRÄZIPITATION	108
6.4.16 AUTORADIODIAGRAMME UND PHOSPHOIMAGING	110

---

6.4.17	<i>IN VITRO</i> TRANSLATION	110
6.4.18	MITOCHONDRIEN-IMPORT-ASSAY ( <i>IN VITRO</i> -IMPORT)	110
6.4.19	CO-IMMUNPRÄZIPITATION	111
6.4.20	SUCROSE-GRADIENT	112
6.4.21	ISOLATION VON PROTEINEN IN DETERGENZ-RESISTENTEN-MEMBRANEN	112
<b>6.5</b>	<b>INDUKTION VON ZELLSTRESS</b>	<b>113</b>
<b>6.6</b>	<b>CO-KULTIVIERUNGS-ANALYSEN</b>	<b>113</b>
<b>6.7</b>	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG</b>	<b>113</b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b>	<b><u>114</u></b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>GLOSSAR</u></b>	<b><u>124</u></b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>LEBENS LAUF</u></b>	<b><u>126</u></b>

## 1 Zusammenfassung

Prion-Erkrankungen sind tödlich verlaufende neurodegenerative Krankheiten, die in vererbbarer, übertragbarer und sporadischer Form auftreten. Für Prion-Erkrankungen ist die sequentielle Umfaltung des zellulären Prion-Proteins ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) in eine abnormal gefaltete Form ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) charakteristisch. Bis heute gilt es als gesichert, dass das Konformationsisomer  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  die Infektiosität der Krankheit vermittelt. Welche  $\text{PrP}$ -Form die neurodegenerativen Prozesse bei Prion-Erkrankungen vermittelt, ist hingegen noch immer unbekannt.

Die Untersuchung neurotoxischer  $\text{PrP}$ -Formen und die Identifikation des toxischen Mechanismus sind daher für ein tief greifendes Verständnis der pathophysiologischen Prozesse von Prion-Erkrankungen essentiell und stellen die zentrale Fragestellung dieser Arbeit dar.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass pathogene  $\text{PrP}$ -Mutanten (W145Stop und Q160Stop) durch ihre partiell zytosolische Lokalisation Apoptose induzieren. Mechanistisch wird die Toxizität von zytosolischem  $\text{PrP}$  durch die Bindung an das anti-apoptotische Protein Bcl-2 vermittelt. Die Sequestrierung von Bcl-2 führt zu dessen Inaktivierung und schließlich zum Zelltod. Die Bildung des  $\text{PrP}/\text{Bcl-2}$  Komplexes macht  $\text{PrP}$  im Zytosol zu einer vergleichsweise hoch-toxischen Form - andere Zellkompartimente sind gegenüber der Akkumulation von  $\text{PrP}$  resistent.

Die nächsten zwei Teile der Arbeit beschäftigten sich mit dem toxischen Mechanismus sporadischer Prion-Erkrankungen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -vermittelte Toxizität von der Expression von GPI-verankertem und funktionell aktivem  $\text{PrP}$  abhängig ist. Funktionell aktives  $\text{PrP}^{\text{C}}$  vermittelt in Abhängigkeit von der N-terminalen Domäne, der hydrophoben Domäne und dem GPI-Anker neuroprotektive Signale. Des Weiteren scheint für die physiologische Aktivität von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  die Bildung von  $\text{PrP}^{\text{C}}$ -Dimeren wichtig zu sein. Nur in Anwesenheit dieser funktionell aktiven Form von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  ist  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  in der Lage Toxizität zu induzieren. Dies deutet darauf hin, dass  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  die zelluläre Form von  $\text{PrP}$  nutzt um toxische Signalkaskaden zu aktivieren.

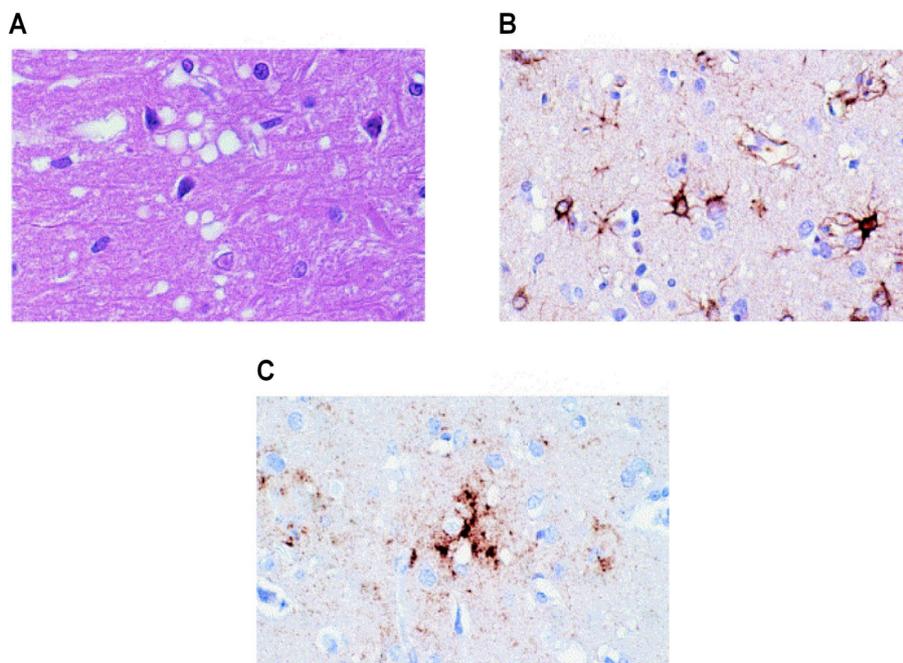
Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit leisteten einen wichtigen Beitrag zum mechanistischen Verständnis der Neurotoxizität toxischer  $\text{PrP}$ -Formen die mit hereditären oder sporadischen Prion-Erkrankungen gekoppelt sind. Der mechanistische Einblick in die neurodegenerativen Prozesse bei Prion-Erkrankungen ist für ein umfassendes Verständnis der Krankheit und die Generierung möglicher Therapieformen essentiell.

## 2 Einleitung

### 2.1 Prion-Erkrankungen

Prion-Erkrankungen sind eine Gruppe tödlich verlaufender, neurodegenerativer Krankheiten, die sowohl beim Menschen als auch beim Tier auftreten (Collinge, 2001; Prusiner, 1998). Aufgrund ihrer Übertragbarkeit (Transmissibilität) und Pathologie – einer schwammartigen Durchlöcherung des Gehirns (englisch: *sponge* - Schwamm) – werden Prion-Erkrankungen auch unter dem Begriff der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE) zusammengefasst. Weitere pathologische Charakteristika für Prion-Erkrankungen sind die Hypertrophie der Astroglia und Ablagerungen von missgefaltetem Prion-Protein in sogenannten Plaques (Abb. 1). Prion-Erkrankungen zeichnen sich durch extrem komplexe Ätiologien, lange Inkubationszeiten und einen äußerst progressiven Krankheitsverlauf aus. Die massive Degeneration neuronaler Zellen führt zu typischen neurologischen Symptomen wie Verhaltens- und Bewegungsstörungen.

Prion-Erkrankungen treten zumeist spontan auf, können aber auch durch Mutationen bedingt vererbt werden. Die Einzigartigkeit dieser Erkrankungen besteht allerdings darin, dass sie infektiös sind und somit übertragen werden können. Dies unterscheidet sie von anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimerschen oder Parkinsonschen Krankheit.



**Abbildung 1: Charakteristische neuropathologische Merkmale von Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE).** Hirnschnitte von einem CJK (Creutzfeldt-Jakob-Krankheit)-Patient. **(A)** Spongiforme, vakuolen-ähnliche Morphologie; **(B)** Proliferation der Astroglia; **(C)** Prion-Protein Ablagerungen; alle Darstellungen aus (Glatzel and Aguzzi, 2001).

### 2.1.1 Prion-Erkrankungen beim Tier

Folgende Prion-Erkrankungen sind bei Tieren bekannt (Tabelle 1): Die Traberkrankheit (*Scrapie*) bei Schafen und Ziegen, die Transmissible Nerz Enzephalopathie (*Transmissible Mink Encephalopathy*, TME), die chronische zehrende Hirschkrankheit (*Chronic Wasting Disease*, CWD) bei freilebenden Hirschen, die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rindern, die Exotische Huftier Enzephalopathie (*Exotic Ungulate Encephalopathy*, EUE) und die Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE) bei Haus- und Wildkatzen (Hartsough and Burger, 1965; Leopoldt, 1759; Pearson et al., 1991; Wells et al., 1987; Williams and Young, 1980).

Krankheit	Betroffene Tierart	Jahr der Erstdokumentation und Ort des Auftretens	Ursache
Scrapie	Schaf	1732, GB	unbekannt
TME	Nerz	1974, USA	Infektion
CWD	Elch, Hirsch	1980, USA	unbekannt
BSE	Rind	1986, GB	Infektion
EUE	Zootiere	1986, GB	Infektion
FSE	Katze	1990, GB	Infektion

**Tabelle 1: Übersicht über die Spongiformen Enzephalopathien der Tiere.** Geordnet nach dem Jahr der Erstdokumentation. TME: Transmissible Nerz Enzephalopathie, CWD: *Chronic Wasting Disease*, BSE: Bovine Spongiforme Enzephalopathie, EUE: Exotische Huftier Enzephalopathie, FSE: Feline Spongiforme Enzephalopathie.

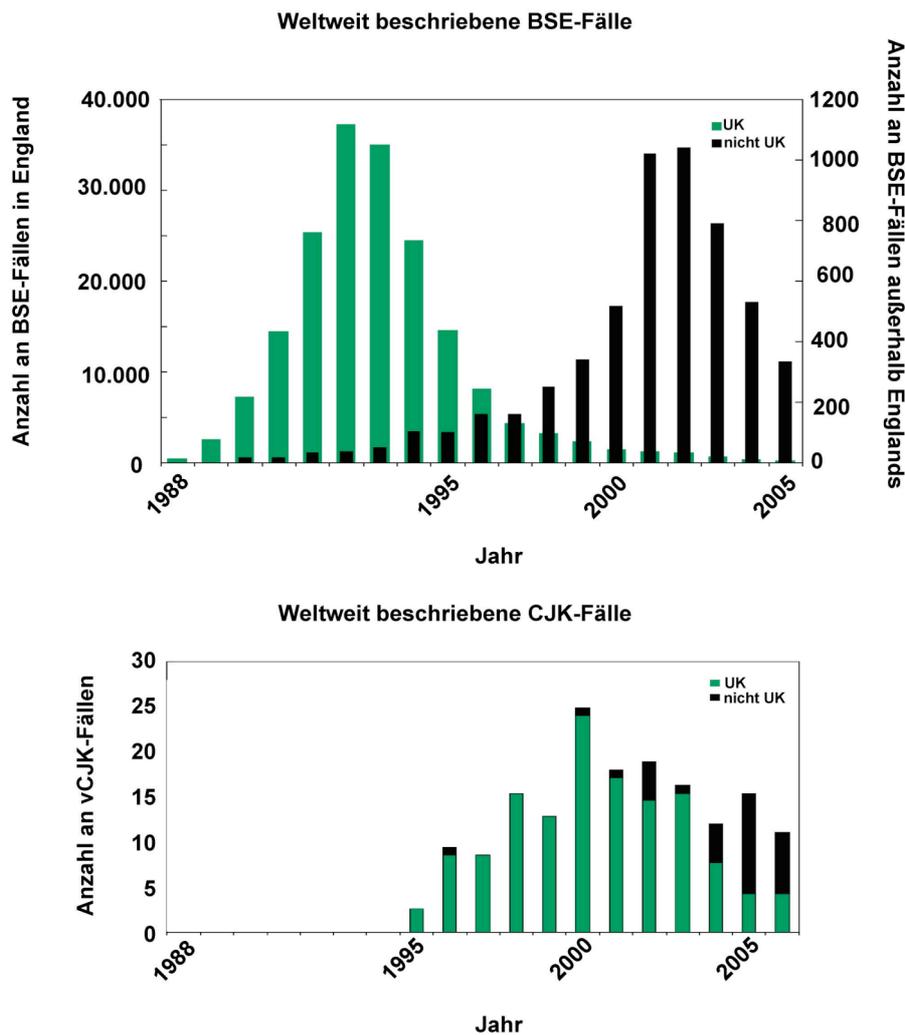
Im Weiteren wird auf Scrapie bei Schafen und BSE bei Rindern eingegangen, da diese beiden Erkrankungen epidemiologisch sowie wirtschaftlich die folgenschwersten Auswirkungen zeigten.

Die ersten Prion-Erkrankungen wurden in Großbritannien im Jahre 1732 beschrieben. Es wurde von der Traberkrankheit bei Schafen (*scrapie*) berichtet (nach: (Mc Gowan 1922)). Scrapie kann als der Prototyp der Prion-Erkrankungen beim Tier bezeichnet werden. Sie stellt die häufigste TSE dar. Charakteristisch für diese Störung sind Schafe, die sich aufgrund eines intensiven Juckreizes ihre Wolle abkratzen (engl.: *to scrape* – kratzen). Erkrankte Tiere sind nicht mehr in der Lage ihre Bewegungen zu koordinieren, was zu einem schwankenden und trabenden Gang führt (daher: Traberkrankheit). In Deutschland konnte bereits im Jahre 1759 festgestellt werden, dass es sich um eine übertragbare Krankheit handelt (Leopoldt, 1759); darauf folgend wurden auch Evidenzen für eine genetische Veranlagung veröffentlicht (Parry, 1962). Im Jahre 1898 wurden dann erstmals pathologische Veränderungen im Gehirn kranker Schafe beschrieben (Besnoit und Morel

1898). Der Einsatz eines kontaminierten Impfstoffes führte zur Erkrankung von 1.500 Schafen (Gordon, 1946). Wie bereits erwähnt, hatte der Ausbruch dieser Krankheit extreme wirtschaftliche Einbußen zur Folge. So wurde bereits Mitte des 18. Jahrhunderts von britischen Farmern eine Petition zur Scrapie-Bekämpfung eingereicht. Dies führte im englischen Parlament zu einer Diskussion über die Auswirkungen der Erkrankung auf die Textilindustrie (Journal of the House of Commons, 1755). Scrapie führte auch im letzten Jahrhundert zu enormen finanziellen Einbrüchen, insbesondere für Bauern, die Suffolk-Schafe züchteten. Der internationale Handel mit Suffolk-Schafen wird heute für die weltweite Verbreitung von Scrapie verantwortlich gemacht (Hourrigan et al., 1979). In England wurde schließlich 1993 die Meldepflicht für Scrapie eingeführt; jedoch mit geringem Erfolg, da viele Tierhalter aufgrund der finanziellen Einbußen davor zurückschrecken, verdächtige Fälle zur Anzeige zu bringen.

Die Erkrankung BSE, auch als Rinderwahnsinn bekannt, wurde erstmals 1986 beschrieben (Wells et al., 1987). Der britische Veterinärmediziner Gerald Wells und seine Kollegen entdeckten in Hirnschnitten erkrankter Tiere lichtmikroskopisch sichtbare Läsionen und erkannten, dass es sich um eine neuartige Rinderkrankheit mit eigenem Krankheitsbild handelt. Erkrankte Rinder zeigen ähnlich wie Scrapie-infizierte Schafe einen Verlust der lokomotorischen Kontrolle, sind außergewöhnlich schreckhaft und bekommen einen starren Blick. Innerhalb weniger Jahre breitete sich diese Erkrankung zu einer Epidemie aus, welche 1992 ihren Höhepunkt mit über 37.000 Fällen erreichte (Abb. 2). Es gilt als gesichert, dass Rinder durch die Verfütterung ungenügend sterilisierter Schlachtabfälle infiziert wurden. Ob es sich bei der ursprünglichen Ursache der Erkrankung um eine Übertragung von Scrapie auf Rinder oder um sporadische BSE-Fälle handelt, ist nicht geklärt. Schätzungen ergaben, dass bis zum heutigen Zeitpunkt über 1 Million Tiere infiziert sein könnten und um die 730.000 BSE-infizierte Rinder in der Nahrungsmittelindustrie verwendet wurden. Infolge des Verbots der Tiermehlfütterung an Wiederkäuer im Jahr 1988 sind die BSE-Fälle wieder rückläufig. Während 2003 weltweit noch 1646 Fälle beschrieben wurden, konnten 2004 noch 878 und 2005 nur noch 474 Krankheitsfälle festgestellt werden. Die Bewältigung der BSE-Krise kostete die britische Wirtschaft sowie den Steuerzahler Summen in Milliardenhöhe.

Auch wenn die BSE-Krise aus den Schlagzeilen verschwunden und die Epidemie ihren Höhepunkt überschritten zu haben scheint, ist das Ausmaß dieser Erkrankung für den Konsumenten von potentiell infiziertem Rinder-Material noch lange nicht abzusehen. Es wird davon ausgegangen, dass BSE-Prionen oral auf den Menschen übertragen werden können und zur nvCJK führen (siehe 1.1.2). Bis heute ist die Zahl der nvCJK weiter rückläufig und auch die lang befürchtete Pandemie ist bisher ausgeblieben (Abb. 2). Aufgrund der langen Inkubationszeit der Krankheit ist aber nicht auszuschließen, dass es in Zukunft wieder zu einem Anstieg von vCJK kommen könnte.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der weltweit beschriebenen BSE- und vCJK-Fälle seit 1988.** In den letzten 20 Jahren erkrankten mehr als 280.000 Rinder an BSE. Zusätzlich wird angenommen, dass die BSE-Krise Ursache für mehr als 200 Fälle der vCJK ist. Heutzutage ist die Fallzahl außerhalb von England etwas höher als in England. Abbildungen modifiziert aus (Aguzzi et al., 2008).

### 2.1.2 Prion-Erkrankungen beim Menschen

Folgende Prion-Erkrankungen sind beim Menschen bekannt (Tabelle 2): die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom (GSS), die Kuru-Krankheit und die Fatale Familiäre Insomnie (FFI) (Creutzfeldt 1920, Jakob 1921, Gerstmann et al., 1936, Gadjusek und Zigas 1957, Lugaresi et al., 1986). Humane Prion-Erkrankungen können in drei ätiologische Gruppen unterteilt werden: sporadische, vererbare und übertragbare Erkrankungen.

Krankheit	Jahr der Erstdokumentation und Ort des Auftretens	Ursache
sCJK	1920 Deutschland	unbekannt
fCJK	1924 Deutschland	Keimbahn-Mutation im PrP-Gen
GSS	1928 Österreich	Keimbahn-Mutation im PrP-Gen
Kuru	1957 Neu Guinea	ritueller Kannibalismus
iCJK	1974 USA	Infektion durch ärztliche Behandlung
FFI	1986 Italien	Keimbahn-Mutation im PrP-Gen
nvCJK	1996 Großbritannien	Infektion

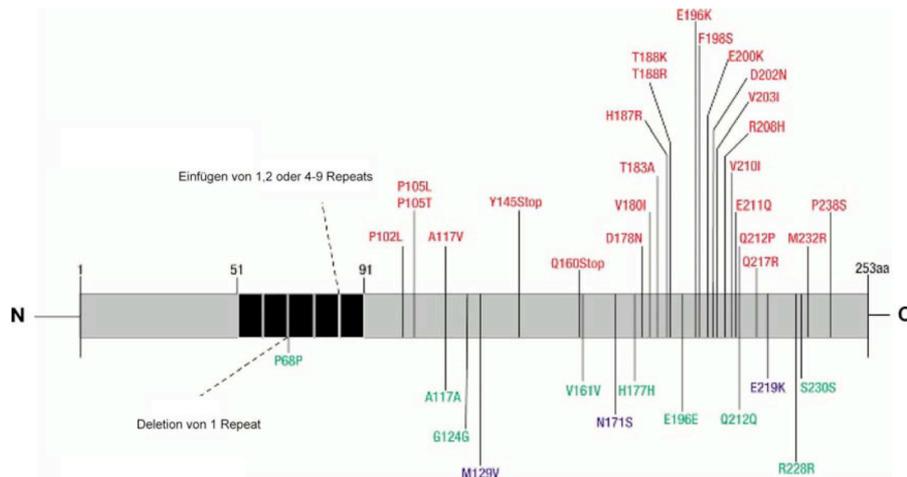
**Tabelle 2: Übersicht über die Spongiformen Enzephalopathien beim Menschen.** Geordnet nach dem Jahr der Erstdokumentation. sCJK: sporadische CJK, fCJK: familiäre CJK, GSS: Gerstmann-Stäussler-Scheinker-Syndrom, iCJK: iatrogene CJK, FFI: Fatale Familiäre Insomnie, nvCJK: neue Variante der CJK.

Die ersten bekannten Dokumentationen einer humanen Prion-Erkrankung wurden unabhängig voneinander 1920/21 von Hans Creutzfeldt und Alfons Jakob, beide deutsche Neurologen, verfasst (Creutzfeldt 1920, Jakob 1921). Sie beschrieben das Phänomen der *spastischen Pseudosklerose*. Heute ist diese Erkrankung nach ihren Entdeckern als Creutzfeldt-Jakob-Krankheit benannt.

Man unterscheidet vier verschiedene CJK-Varianten: sporadische CJK (sCJK), familiäre CJK (fCJK), iatrogenen CJK (iCJK) und neuen Variante CJK (nvCJK).

Die häufigste humane Prion-Erkrankung ist die sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJK), die 80-90% aller humanen TSE ausmacht. Die Krankheitsursache ist noch immer unbekannt; man geht von einer sporadischen Mutation und einer seltenen spontanen Umfaltung des Prion-Proteins aus.

Die familiäre CJK (fCJK) gehört zu den vererbaren Formen humaner Prion-Erkrankungen. Die fCJK wird autosomal dominant vererbt und liegt bei etwa 10% aller CJK vor. Die familiäre Form der CJK, wie auch das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom und die Fatale Familiäre Insomnie (FFI), sind mit Mutationen in dem für das Prion-Protein kodierenden Gen (PRNP) assoziiert. Es wurden eine Reihe unterschiedlicher Punktmutationen, Deletions- und Insertionsmutationen im PRNP Gen betroffener Familien identifiziert (Abb. 3).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Prion-Protein.** Pathogene Mutationen sind rot, polymorphe Varianten grün und blau eingefärbt dargestellt. Abbildung aus (Collinge, 2001).

Die iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (iCJK) wird durch medizinische „Unfälle“ auf den Menschen übertragen. Diese Variante der Erkrankung wurde erstmals 1974 dokumentiert und umfasst weniger als 1% der CJK-Fälle. Am häufigsten wurde die Krankheit durch das Verwenden von Prion-kontaminiertem Somatotropin übertragen. Das Wachstumshormon wurde früher aus Hypophysen von Leichen gewonnen, unter denen sich offensichtlich ein unentdeckter CJK-Fall befand. Auch die Verwendung kontaminierter chirurgischer Instrumente oder die Transplantation infizierter Gewebe führte zur Übertragung der Krankheit. (Bernoulli et al., 1977; Davanipour et al., 1984; Duffy et al., 1974; Kondo and Kuroiwa, 1982).

Als Prototyp infektiöser TSE beim Menschen gilt Kuru. Diese Krankheit tritt im Volk der Fore Papua-Neuguineas auf und wurde durch rituellen Kannibalismus übertragen. Diese Erkrankung war unter den am Ritus beteiligten Frauen und Kindern die häufigste Todesursache. Nach dem Verbot des Ritus ist die Zahl der Betroffenen stark zurückgegangen (Alpers 1979).

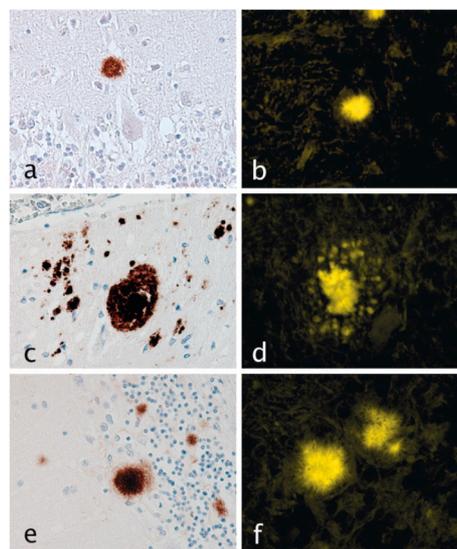
Die seit 1966 bekannte Neue Variante der CJK (nvCJK) gehört ebenfalls zu den durch Infektion erworbenen Erkrankungen und geht höchstwahrscheinlich auf eine orale Übertragung mit BSE-infektiösem Material zurück. Nachdem die BSE-Erkrankung in Großbritannien ihren Höhepunkt erreicht hatte, konnte zeitversetzt ein Anstieg an nvCJK beobachtet werden (Abb. 2). Biochemische Studien zeigten, dass BSE- und nvCJK-Prionen in Bezug auf ihr Glykosylierungsmuster und ihre Sensitivität gegenüber proteolytischem Verdau nahezu identisch sind. Zusätzlich teilen beide Erkrankungen dieselben charakteristischen neuropathologischen Eigenschaften wie neuronale Vakuolisierung und Prion-Protein Ablagerungen im Gehirn der Infizierten.

Alle Prion-Erkrankungen teilen das Merkmal langer Inkubationszeiten, doch zeigen sie ansonsten verschiedenste Ätiologien. Unterschiede zwischen den Krankheiten bestehen in

der Symptomatik, der Krankheitsdauer und den pathologischen Charakteristika. So bricht die sporadische Form der CJK bei Patienten im Alter zwischen 60 und 70 Jahren auf; die nvCJK dahingegen schon wesentlich früher, hier liegt das Durchschnittsalter bei 29 Jahren. Hereditäre Formen der Erkrankung wie das Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom (GSS) zeigen mit einem Durchschnittsalter von 45 Jahren einen intermediären Krankheitsverlauf. Bei Kuru schwankt das Alter durch die hohe Varianz der aufgenommenen Erregermenge, sowie durch die Abhängigkeit des Zeitpunktes der Exposition und des Infektionsweges, zwischen 4 und 60 Jahren.

Die vielfältige Symptomatik der humanen Prion-Erkrankungen könnte sich durch den variablen Befall verschiedener Hirnregionen erklären lassen. Auch die hohe Varianz an Plaque-Formen in den einzelnen Krankheiten könnte dazu beitragen (Abb. 4). Während die CJK vor allem durch voranschreitende Demenz und darauf folgende Koordinationsstörungen gekennzeichnet ist, zeigt Kuru einen umgekehrten Krankheitsverlauf. FFI zeichnet sich dahingegen vor allem durch Schlaflosigkeit und Störung des vegetativen Nervensystems aus.

Grundsätzlich zählen Seh-, Sprach- und Bewegungsstörungen in humanen Prion-Erkrankungen zu den anfänglichen Symptomen. Im weiteren Verlauf sind starke Persönlichkeitsveränderungen und Gedächtnisstörungen festzustellen. Der totale Ausfall des Großhirns führt schließlich unweigerlich zum Tod der Patienten.



**Abbildung 4: Unterschiedliche Plaque-Formen bei humanen Prion-Erkrankungen.** Gewebeschnitte des menschlichen Kleinhirns. (a, b) Kuru-Plaque eines sCJK-Falls. (c, d) Multizentrische Plaques eines GSS-Falls. (e, f) Floride Plaques eines nvCJK-Falls. Immunohistochemische Anfärbungen von Prion-Protein Ablagerungen (Bilder a, c, e) sowie Plaque-Färbungen mit 2-(1-(6-[(2-Fluoroethyl) (Methyl) Amino]-2-Naphthyl) Ethyliden) Malononitril (FDDNP) (b, d, f). Abbildung aus (Bresjanac et al., 2003).

## 2.2 Das Prion-Konzept

### 2.2.1 Identifizierung des Prion-Proteins

Die Infektiosität und Diversität der Prion-Erkrankungen stellen Forscher vor die Frage, wie diese Krankheit übertragen wird und wie sie zu den beobachteten Symptomen führt. Zunächst hielt man langsam wirkende Viren (*Slow Virus*) für die Ursache der TSE. Doch Behandlungsmethoden wie massiv DNA- und RNA-schädigende Strahlung führten zu keiner Verminderung der Transmissibilität der erregerrhaltigen Hirnhomogenate (Alper et al., 1967). Diese Daten sprachen gegen die Beteiligung eines Virus oder eines anderen konventionell-infektiösen Agens. Im Jahr 1967 wurde postuliert, dass es sich um ein sich autokatalytisch replizierendes Protein handeln könnte (Griffith, 1967). Diese Theorie wurde von Stanley Prusiner aufgenommen. Ihm und seinen Kollegen gelang schließlich Anfang der 80er Jahre die Isolierung einer ausreichend reinen und infektiösen Fraktion aus Gehirnen infizierter Hamster, deren Infektiosität nur durch Protein- aber nicht durch Nukleinsäure-schädigende Substanzen verringert werden konnte (Prusiner, 1982; Prusiner et al., 1981). Stanley Prusiner prägte schlussendlich den Begriff „**Prion**“ [pri:on] als Abkürzung für *proteinaceous infectious particles* (proteinartige infektiöse Partikel); zugunsten der leichteren Aussprache wurde die Abkürzung Proin in Prion geändert. Ein weiterer Meilenstein in der Prion-Forschung war die Entdeckung eines Proteinase-resistenten, 26-30 kDa großen Glykoproteins in Gehirnhomogenaten von Scrapie-infizierten Hamstern (Bolton et al., 1982). Dieses Protein konnte als Hauptbestandteil des infektiösen Agens identifiziert werden, welches *in vitro* schwer lösliche Aggregate bildet und Ablagerungen in infizierten Gehirnen ähnelt (Bolton et al., 1982; McKinley et al., 1983; Prusiner, 1982).

Mit einer von diesem isolierten Protein abgeleiteten DNA-Sonde gelang schließlich die Identifizierung des für das Prion-Protein kodierenden Gens (PRNP) (Oesch et al., 1985). Hierbei handelt es sich nicht - wie zunächst angenommen - um ein Fremd- sondern ein Wirtsgen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass dieses Gen in verschiedenen Spezies, auch im Menschen, exprimiert wird (Basler et al., 1986; Chesebro et al., 1985; Oesch et al., 1985; Stahl et al., 1993). Überraschenderweise wird das Prion-Protein (PrP) nicht nur in erkrankten sondern auch in gesunden Individuen exprimiert (Chesebro et al., 1985; Oesch et al., 1985). Die Erkenntnis, dass jede Spezies PrP auch unter physiologischen Bedingungen herstellt ohne dadurch zu erkranken, ließ den Schluss zu, dass zwei verschiedene Formen des Proteins existieren: die normale, zelluläre Form (PrP<sup>C</sup>, *cellular Prion-Protein*) und eine aberrante, pathogene Form (PrP<sup>Sc</sup>, *scrapie Prion-Protein*).

### 2.2.2 PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>

Die zelluläre und pathogene Form des Prion-Proteins (PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>) besitzen die gleiche Aminosäuresequenz und die gleichen kovalenten Modifikationen, unterscheiden sich aber in

ihren biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften (Tabelle 3). Zelluläres PrP<sup>C</sup> ist im Gegensatz zur infektiösen PrP<sup>Sc</sup>-Form in nicht-ionischen Detergenzien löslich und sensitiv gegenüber Proteinase K (PK). Messungen des Circular dichroismus und Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) mit hoch aufgereinigtem PrP<sup>C</sup> ergaben, dass die zelluläre Form hauptsächlich  $\alpha$ -helikale Strukturen aufweist, wohingegen das pathogene PrP<sup>Sc</sup> vorwiegend aus  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen besteht und unlösliche Aggregate bildet (Caughey et al., 1991b; Pan et al., 1993). Diese Sekundärstrukturunterschiede führten zu der Annahme, dass es sich bei den pathogenen Isoformen um posttranslational generierte Konformationsisomere handelt. Für diese Strukturveränderungen wurde ein direkter Kontakt der beiden Isoformen postuliert, entweder auf der Zelloberfläche oder in endosomalen Kompartimenten (Borchelt et al., 1992; Caughey and Raymond, 1991; Taraboulos et al., 1995).

	PrP <sup>C</sup>	PrP <sup>Sc</sup>
<b>Löslichkeit in Detergenzien</b>	Ja	Nein
<b>PK-Sensitivität</b>	Ja	Partiell
<b>Sekundärstruktur</b>	Hoher Anteil an $\alpha$ -Helices	Hoher Anteil an $\beta$ -Faltblättern
<b>Infektiosität</b>	Nein	Ja

**Tabelle 3: Eigenschaften von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>.** Dargestellt sind die Unterschiede bezüglich Löslichkeit, Proteinase K (PK)-Sensitivität, Struktur und Infektiosität der beiden Isoformen.

### 2.2.3 Prionen-Replikation

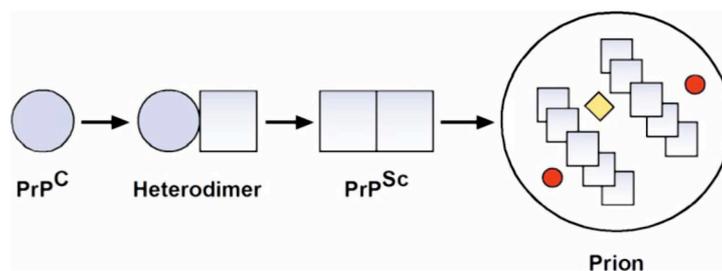
Der genaue Mechanismus der Konversionsreaktion PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> ist noch immer unbekannt. Zur Erklärung dieser Umwandlung wurden verschiedene Modelle erstellt. Die Modelle von Prusiner und Lansbury seien hier kurz vorgestellt:

Das Heterodimer-Modell von Prusiner (*template assistance model*) geht von einer direkten Interaktion der beiden Konformationsisomere PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> während der Umwandlung aus (Prusiner et al., 1990). Im Rahmen dieser autokatalytischen Konversion bindet je ein PrP<sup>Sc</sup> Molekül ein PrP<sup>C</sup> Molekül und formt dieses um (Abb. 5). Eine Aggregation von PrP<sup>Sc</sup> ist dafür nicht nötig (Prusiner, 1991).

Das *seeding* Modell von Lansbury hingegen postuliert einen Kristallisationskeim von PrP<sup>Sc</sup>, von dem ausgehend es zur Akkumulation des pathologischen Proteins kommt. Hierbei muss für die Propagierung von PrP<sup>Sc</sup> eine bestimmte Mindestgröße des Aggregats erreicht sein (Jarrett and Lansbury, 1993).

Die Konversion in ein unlösliches Prion-Protein konnte zwar erfolgreich *in vitro* induziert werden, es konnte jedoch lange Zeit *in vitro* keine Infektiosität generiert werden (Caughey et al., 1995). Dies führte zu der Annahme, dass noch ein zusätzlicher Faktor, genannt Protein X, oder andere zelluläre Faktoren für die Bildung von infektiösen Prionen notwendig sind (Telling et al., 1995). Kürzlich gelang es der Gruppe von Prusiner rekombinantes PrP in Bakterien herzustellen, welches nach seiner *in vitro* Konversion und anschließender intrazerebraler Inokulation transgener Mäuse zu histopathologischen Veränderungen und Propagierung von PK-resistentem und infektiösem PrP<sup>Sc</sup> im Gehirn führte (Legname et al., 2004). Nach Einsetzen der typischen neurologischen Symptome kam es zum Tod der Tiere. Dennoch konnte die Übertragung durch rekombinantes PrP nur in transgenen Mäusen, die eine trunkierte Form von PrP (AS 89-231) stark überexprimieren, erreicht werden. Mittels einer neuen Methode, der so genannten PMCA (*protein misfolding cyclic amplification*), gelang es infektiöses PrP<sup>Sc</sup> *in vitro* zu amplifizieren (Saborio et al., 2001). Saborio et al. konnten zeigen, dass geringe Mengen an Hamster PrP<sup>Sc</sup> in der Lage sind, PrP<sup>C</sup> aus Gehirnhomogenaten gesunder Tiere in Protease-resistentes PrP zu konvertieren. Der während der zyklischen Zugabe an gesundem Hirnhomogenat generierte Aggregationskeim wurde durch Sonifikation zwischen den Zyklen aufgelöst, um PrP<sup>Sc</sup> für eine erneute Umfaltung von PrP<sup>C</sup> freizusetzen. Durch diesen Ansatz generiertes PrP<sup>Sc</sup> konnte auf Wildtyp Mäuse übertragen werden und weiter propagiert werden. Bisher kann nicht ausgeschlossen werden, dass für die initiale *in vitro* Konversion zelluläre Faktoren, die in den Homogenaten der Gehirne vorhanden sind, essentiell für diese Umwandlung sind. Die PMCA-Methode bietet die Möglichkeit, die Proteine, die für die Konversionsreaktion von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> nötig sind, zu identifizieren und charakterisieren.

Infektiöse Prionen enthalten signifikante Mengen an spezifischen Lipiden und Kohlehydraten. Diese tragen möglicherweise zur Stabilisierung der PrP<sup>Sc</sup> Konformation oder zu Interaktionen an der Zelloberfläche bei (Appel et al., 1999; Klein et al., 1998). Eine infektiöse Einheit enthält mindestens 10<sup>5</sup> PrP<sup>Sc</sup>-Moleküle (Bolton et al., 1982). Dies weist darauf hin, dass entweder größere Aggregate zur Vermittlung von Infektiosität nötig sind, oder dass nur eine Subpopulation des PrP<sup>Sc</sup>-Materials infektiös ist.



**Abbildung 5: Replikation von PrP<sup>Sc</sup> nach dem Heterodimer-Modell von Prusiner.** Durch direkte Interaktion zwischen PrP<sup>C</sup> mit PrP<sup>Sc</sup> wird jeweils ein PrP<sup>C</sup>-Molekül in einer autokatalytischen Reaktion durch ein PrP<sup>Sc</sup>-Molekül unter Bildung eines Heterodimers umgefaltet. Mehrere PrP<sup>Sc</sup>-Aggregate bilden eine infektiöse Einheit (Prion), welche außerdem in geringem Anteil Lipide (gelb) und Polysaccharide (rot) enthält.

## 2.3 Das Prion-Protein

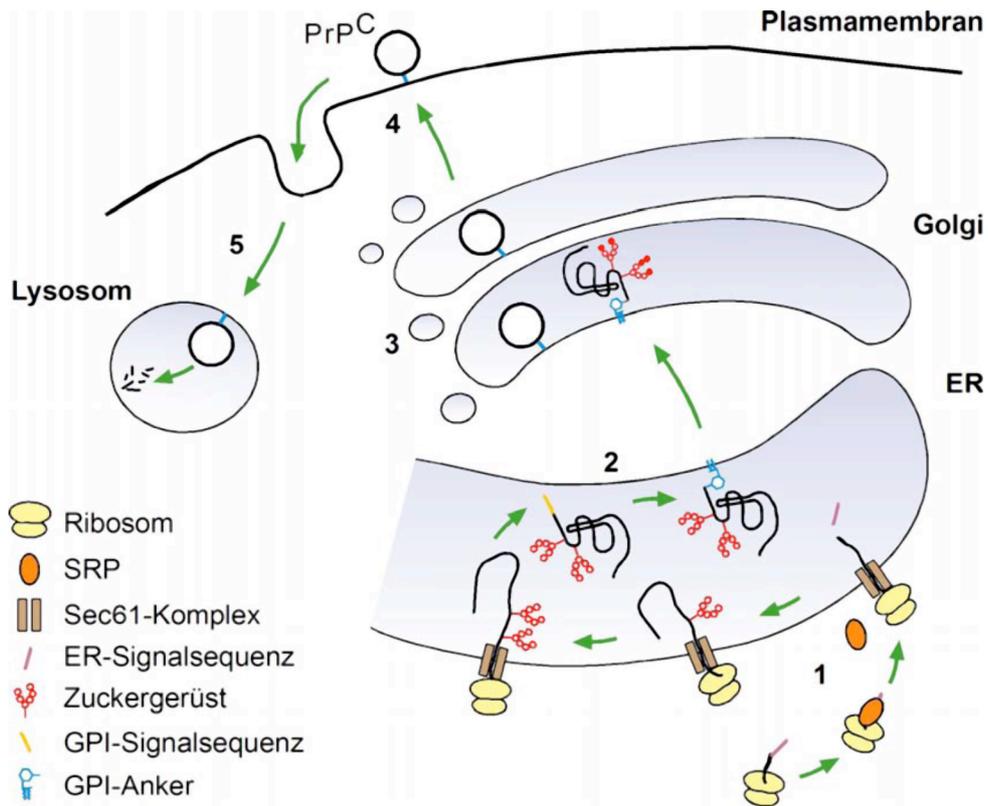
### 2.3.1 PRNP- kodierendes Prion-Protein Gen

Das für das Prion-Protein kodierende Gen PRNP konnte auf dem kurzen Arm des Chromosoms 20 lokalisiert werden (Sparkes et al., 1986). Es enthält drei Exone, wobei das letzte Exon den gesamten Leserahmen enthält und ein Protein von 255 Aminosäuren (AS) kodiert (Maus-PrP) (Oesch et al., 1985; Westaway et al., 1994). PrP<sup>C</sup> wird in fast allen Geweben bereits ab dem frühen Embryonalstadium exprimiert. Die höchste Expression mit ca. 50 Kopien pro Zelle findet sich in Neuronen (Kretzschmar et al., 1986). Weitere Gewebe mit hoher Expression sind lymphatische Zellen sowie der Muskel (Bendheim et al., 1992). Die im Folgenden verwendeten Aminosäure (AS)- Nummerierungen entsprechen dem murinen Prion-Protein.

### 2.3.2 Biogenese von PrP<sup>C</sup>

Das Prion-Protein wird als ein 255 AS langes Präprotein synthetisiert. Während des co-translationalen Imports in das Endoplasmatische Retikulum (ER) wird die 22 AS lange N-terminale ER-Signalsequenz abgespalten, und zwei Kernglykane werden an den Positionen Asparagin 180 und Asparagin 196 mit dem Protein verknüpft. Nach vollständiger Translokation des Proteins in das ER wird der C-Terminus von PrP mit einem Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI-) Anker modifiziert. Als Signal hierfür dient eine hydrophobe, 23 AS lange Sequenz am C-Terminus des Proteins. Der GPI-Anker wird im Ganzen auf die so genannte  $\omega$ -Site (AS 231) übertragen. Das auf diese Weise modifizierte Protein wird dann weiter in den Golgi-Apparat transportiert, wo die Kernglykane zu komplexen Glykanen modifiziert werden. Über Vesikel wird das Protein an die Zelloberfläche transportiert, wo es sich durch seine GPI-Verankerung in Detergenz-resistenten Membranen (DRM), Cholesterin-reichen Mikrodomänen, anreichert (Harmey et al., 1995). Von dort kann es über Clathrin-vermittelte Endozytose oder über Caveolen internalisiert und lysosomal degradiert bzw. recycelt werden (Peters et al., 2003; Shyng et al., 1994; Sunyach et al., 2003).

Während der Konversion von PrP<sup>C</sup> zu seiner pathogenen Form PrP<sup>Sc</sup> kommt es in Prion-infizierten Zellen vermutlich zu einem direkten Kontakt der beiden Isoformen. Es wird davon ausgegangen, dass diese Umformung an der Plasmamembran oder entlang des endozytotischen Weges stattfindet (Borchelt et al., 1992; Caughey et al., 1991a). Im Gegensatz zu PrP<sup>C</sup> kann PrP<sup>Sc</sup> nicht vollständig in Lysosomen degradiert werden. Es kommt zur Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> in den abbauenden Vesikeln (Abb. 6).



**Abbildung 6: Biogenese des Prion-Proteins.** (1) PrP wird an freien Ribosomen im Zytosol translatiert und co-translational in das raue Endoplasmatische Retikulum (ER) importiert. Während des Imports wird die ER-Signalsequenz abgespalten und Zuckerketten werden mit dem Protein verknüpft. (2) Die GPI-Ankersequenz wird durch einen vorgeformten GPI-Anker ersetzt. (3) Im Golgi-Apparat werden die Zuckerketten komplex modifiziert. (4) PrP reichert sich an der Zellmembran in Detergenz-resistenten Arealen, so genannten *lipid rafts* an. (5) Während PrP<sup>C</sup> lysosomal abgebaut werden kann, widersteht PrP<sup>Sc</sup> der Degradation und reichert sich an.

### 2.3.3 Struktur des Prion-Proteins

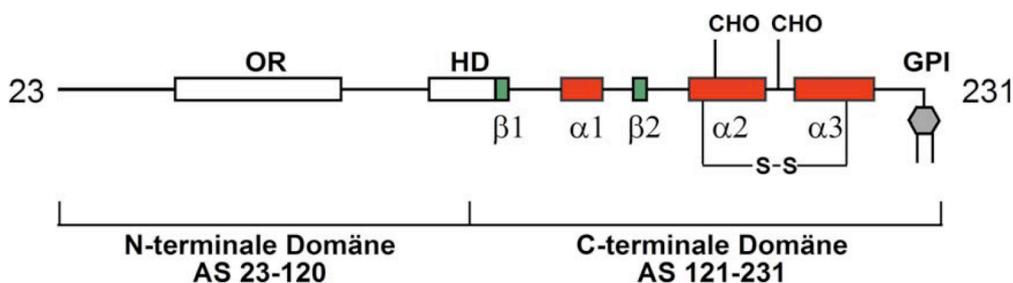
Die Auflösung der Kristallstruktur des Prion-Proteins stellte sich über einen langen Zeitraum als extrem schwierig dar. PrP konnte nur in geringen Konzentrationen isoliert werden und zeichnete sich durch eine geringe Langzeitstabilität aus. Erst nachdem PrP rekombinant aus dem Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) in ausreichend reiner und löslicher Form gewonnen werden konnte (Hornemann and Glockshuber, 1996; Hornemann et al., 1997), gelang es der Gruppe um Roland Riek, die NMR Struktur des rekombinanten Maus-PrP (AS 23-131) (Riek et al., 1996; Riek et al., 1997) zu ermitteln (Abb. 7). Mittlerweile konnten auch die Strukturen von humanem und bovinem PrP gelöst werden, die eine große Ähnlichkeit mit der murinen Konformation aufweisen. In allen Molekülen wurde eine identische, selbständig faltende, globuläre, C-terminale Domäne identifiziert (AS 121-231). Dieser strukturierte Teil enthält zwei  $\beta$ -Faltblätter und drei  $\alpha$ -Helices (Abb. 8). Helix 2 und 3 sind durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Zusammen bilden die Helices 2 und 3 sowie die  $\beta$ -Faltblätter den stabilen hydrophoben Kern des Prion-Proteins. Interessanterweise liegen in diesem Bereich

viele der krankheitsassoziierten Mutationen (Abb. 3). Im Gegensatz zu dem strukturierten C-Terminus ist die N-terminale Domäne (AS 23-120), zumindest unter den NMR Analyse-Bedingungen, unstrukturiert und extrem flexibel. Sie enthält fünf Oktarepeats (Wiederholungen der acht AS PGGGTWGQ), die als Kupferbindungsstellen fungieren können (Aronoff-Spencer et al., 2000; Brown et al., 1997a; Stöckel et al., 1998; Viles et al., 1999). Des Weiteren beinhaltet der N-Terminus eine hoch konservierte, putative Transmembrandomäne. Diese, ein Bereich von 23 hydrophoben AS, kann *in vitro* aggregieren und Transmembran-Topologien des Prion-Proteins induzieren (Tagliavini et al., 1993; Yost et al., 1990).

Bei der Interpretation der bisherigen Strukturdaten ist allerdings zu beachten, dass diese mit rekombinantem PrP in wässriger Lösung gewonnen wurden, während PrP unter physiologischen Bedingungen glykosyliert und über einen GPI-Anker in Membranen verankert ist.



**Abbildung 7: NMR-Struktur des murinen Prion-Proteins 121-231.** Bändermodell der Struktur der Prion-Protein Domäne PrP 121-231 (Maus), welches die Position der drei Helices (blau) und der zwei antiparallelen Faltblätter (grün) zeigt. Abbildung aus (Riek et al., 1996).



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des Prion-Proteins.** OR: Oktarepeat, HD: Hydrophobe Domäne, S-S: Disulfidbrücke,  $\beta$ :  $\beta$ -Faltblätter,  $\alpha$ :  $\alpha$ -Helices, CHO: Glykosylierungsstelle, GPI: Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker.

## 2.4 Die physiologische Funktion des Prion-Proteins

### 2.4.1 PrP<sup>C</sup> *knock-out* Mäuse

Obwohl das Prion-Protein bereits vor 20 Jahren entdeckt wurde, ist noch immer unbekannt, welche physiologische Funktion es innehat. Die hohe Konservierung in Säugern, sowie die Existenz des Gens in Organismen wie Vögeln, Fischen, Reptilien und Amphibien scheint auf eine wichtige physiologische Funktion von PrP<sup>C</sup> hinzudeuten. Eine Methode, die zur Funktionsanalyse gerne genutzt wird, ist die Generierung von *knock-out* Mäusen. Die Herstellung PrP-defizienter Mäuse wurde 1992 als erstes von der Gruppe um C. Weissmann durchgeführt (Büeler et al., 1992). Die Mäuse zeigten keine Abnormalitäten in der Entwicklung oder bei Verhaltenstests. Die einzigen Veränderungen, die beobachtet werden konnten, betrafen den Schlaf- Wachrhythmus, synaptische Physiologie, einige elektrophysiologische Parameter sowie leichte Störungen der Myelinisierung (Collinge et al., 1994; Tobler et al., 1996; Vassallo and Herms, 2003).

Dass PrP defiziente Mäuse keinen signifikanten Phänotyp aufweisen, lässt zwei Schlüsse zu: 1. Die Funktion von PrP ist nicht essentiell oder 2. die Aufgabe von PrP ist so wichtig, dass kompensatorische Mechanismen greifen um einen Verlust auszugleichen. Um mehr Einblick in diese Problematik zu gewinnen wurden konditionale PrP *knock-out* Tiere generiert. Mittels des CreloxP-Systems kann die Expression von PrP in späteren postnatalen Stadien eingestellt werden (Mallucci et al., 2003). Bis auf eine Verminderung der Nachhyperpolarisationsströme in hippocampalen Zellen, was auf eine Rolle von PrP<sup>C</sup> in der Modulation neuronaler Signalübertragung hinweist, konnten jedoch keine weiteren Erkenntnisse über die Funktion gewonnen werden. Dennoch zeigen diese Daten, dass die Funktion von PrP unter physiologischen Bedingungen im adulten Tier nicht essentiell zu sein scheint. Kürzlich durchgeführte Studien konnten lediglich eine PrP-mengenabhängige Veränderung in der Mobilität sowie im Angstverhalten in adulten Mäusen zeigen, wobei die Mobilität mit zunehmender PrP-Menge zunimmt, während das Angstverhalten abnimmt (Lobao-Soares et al., 2007).

Diese Ergebnisse sind überraschend, wenn man sich die fatalen Auswirkungen der PrP<sup>C</sup>-Umwandlung unter pathophysiologischen Bedingungen ins Gedächtnis ruft. Es scheint, dass die Konversion zu PrP<sup>Sc</sup> einer *gain of function* –Mutation ähnelt. Inwieweit der Verlust der physiologischen Funktion zusätzlich zur Pathogenese beiträgt, ist bisher noch unklar. Deutlich ist jedoch, dass die Aufdeckung der Funktion des Prion-Proteins für die Klärung der pathogenen Mechanismen der Erkrankung sowie für mögliche therapeutische Ansätze wichtig ist.

### 2.4.2 PrP<sup>C</sup> – mögliche neuroprotektive Kapazität

Weder konstitutive noch konditionale PrP *knock-out* Mäuse zeigen unter physiologischen Bedingungen einen signifikanten Phänotyp (siehe 1.4.1). In logischer Konsequenz stellt sich nun die Frage, wie sich das Fehlen des Prion-Proteins unter Stressbedingungen auswirkt. Dieser Fragestellung gingen verschiedene Forschungsgruppen, vor allem während der letzten 4 Jahre, nach. Interessanterweise konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* festgestellt werden, dass eine PrP-Defizienz zu erhöhter Vulnerabilität führt. Hierbei wurden Modelle wie Ischämie oder Apoplexie in Mäusen untersucht (McLennan et al., 2004; Mitteregger et al., 2007; Shyu et al., 2002; Spudich et al., 2005; Weise et al., 2004). Auch andere Stress-Stimuli wie exzitatorischer Stress zeigten bei PrP-defizienten Zellen erhöhte Sterberaten (Haigh and Brown, 2006; Milhavet and Lehmann, 2002; Rangel et al., 2007b). Konsistent mit diesen Daten konnte die Vulnerabilität durch Überexpression von PrP vermindert werden. Diese Studien weisen auf eine neuroprotektive Kapazität des Prion-Proteins hin.

Weitere Evidenzen für die zytoprotektive Aktivität von PrP<sup>C</sup> wurden durch zwei Maus-Modelle erbracht. In einem Modell von Shmerling et al., wurde eine Reihe N-terminal deletierter Formen von PrP in transgenen Mäusen untersucht. Während die Deletion der Reste 23 bis 106 zu keinerlei Abnormalitäten führte, zeigte die Expression der Konstrukte  $\Delta 32-121$  und  $\Delta 32-134$  (im Weiteren bezeichnet als Shmerling-Mutanten) eine progressive Neurodegeneration in Mäusen mit *knock-out* Hintergrund. Interessanterweise war die Expression bereits einer der beiden Kopien des PrP-Gens ausreichend, um den Phänotyp zu verhindern (Shmerling et al., 1998). In zwei erst kürzlich publizierten Studien konnte der toxische Bereich auf die AS 105-125 bzw. 94-134 eingeschränkt werden (Baumann et al., 2007; Li et al., 2007), hier im Weiteren als  $\Delta CD$  zusammengefasst). Ein ähnliches toxisches Phänomen wurde in bestimmten PrP *knock-out* Mäusen beschrieben, welche spät-einsetzende Ataxien ausbildeten (Moore et al., 1999). Zurückzuführen ist dieser Phänotyp auf die Überexpression des zu PrP paralogen Proteins Doppel (Dpl) bei der Generierung der PrP defizienten Mäuse (Moore et al., 1999). Dpl ist strukturell der Shmerling-Mutante ähnlich, da ihm der homologe Teil zum flexiblen N-Terminus von PrP fehlt. Die Expression von Wildtyp-PrP konnte auch die Dpl-induzierte Neurodegeneration verhindern.

Es wird angenommen, dass die erhöhte Toxizität der  $\Delta CD$ - und Shmerling- Mäuse durch eine Veränderung der Affinität der Mutanten gegenüber einem hypothetischen PrP-Rezeptor (PR) ausgelöst wird, was in der Folge zu der Transduktion eines toxischen Signals führt. Weitere Evidenzen für diese Annahme wurden durch *Crosslinking*-Experimente in transgenen Mäusen geliefert. Hierbei konnte beobachtet werden, dass durch spezifische Antikörperbindung neuronale Apoptose induziert wird (Solfrosi et al., 2004).

### 2.4.3 PrP<sup>C</sup> – mögliche Rolle in Signaltransduktionsprozessen

Der Großteil von PrP<sup>C</sup> ist an der Zelloberfläche lokalisiert. Daher liegt die Vermutung nahe, dass das Prion-Protein eine Rolle in Signaltransduktionswegen spielen könnte. Wie viele andere GPI-verankerte Proteine auch, ist PrP in Detergenz-resistenten Membranen (DRM) zu finden, welche als molekulare Plattformen in der Signaltransduktion dienen. Da PrP komplett extrazellulär vorliegt, würde es für die Vermittlung von Signalen ein Transmembranprotein als Interaktionspartner benötigen. Über die Jahre hinweg wurden viele putative Interaktionspartner wie Grb2, Synapsin oder Bcl-2 publiziert (Kurschner and Morgan, 1995; Spielhauer and Schatzl, 2001). Da viele dieser Moleküle nur im Zytosol vorkommen, scheint es unwahrscheinlich, dass sie mit dem Membran-gebundenen Zelloberflächenprotein PrP<sup>C</sup> in direktem Kontakt stehen. Andere Studien identifizierten Interaktionspartner wie Laminin, den 37 kDa/67 kDa Laminin Rezeptor oder N-CAM, ein neuronales Zelladhäsionsmolekül (*neuronal cell adhesion molecule*) (Graner et al., 2000; Rieger et al., 1997). Diese Entdeckungen sprechen für eine Funktion von PrP in Bereichen von Neuritrogenese und Zelladhäsion. Im Jahr 2000 konnte mittels Antikörper-Crosslinking gezeigt werden, dass PrP Signale in Transduktionswegen über die Fyn Kinase vermitteln sowie zur Aktivierung der NADPH-Oxidase und ERK beitragen kann (Monnet et al., 2004; Mouillet-Richard et al., 2000). Da diese Versuche unter sehr artifiziellen Bedingungen durchgeführt wurden, ist nicht klar, inwieweit diese Beobachtungen physiologischen Prozessen entsprechen. Die Autoren dieser Studien postulieren eine durch PrP-Crosslinking-vermittelte Aktivierung eines protektiven Signaltransduktionswegs.

Weitere Evidenzen für eine protektive Funktion PrPs beinhaltet eine Studie, die die Interaktion zwischen PrP<sup>C</sup> und dem Stress-induzierbaren Protein 1 (STI-1) nachwies (Zanata et al., 2002). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Bindung von PrP an STI-1 zur MAPK abhängigen Neuritrogenese führt (Lopes et al., 2005).

Im Einklang mit diesen Daten wurde mehrfach demonstriert, dass PrP<sup>C</sup> gegen BAX-vermittelten Zelltod schützen kann. Vermutlich wird die initialen BAX-Konformationsveränderung, welche zur Translokation des Proteins an die Membranen des ER und der Mitochondrien führt durch PrP<sup>C</sup> inhibiert (Bounhar et al., 1997; Li and Harris, 2005; Roucou et al., 2003).

### 2.4.4 PrP<sup>C</sup> und Kupfer

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass PrP<sup>C</sup> über seine N-terminale Oktarepeat-Region in der Lage ist, *in vitro* und *in vivo* Kupfer-Ionen zu binden (Brown et al., 1997a; Stöckel et al., 1998; Viles et al., 1999). Dies führte zu der Vermutung, dass PrP wichtig für die Kupferhomöostase ist. Über den Oktarepeat Bereich kann PrP kooperativ vier Kupfer-Ionen komplexieren. Weitere Bindungsstellen (allerdings mit geringerer Affinität) konnten an den

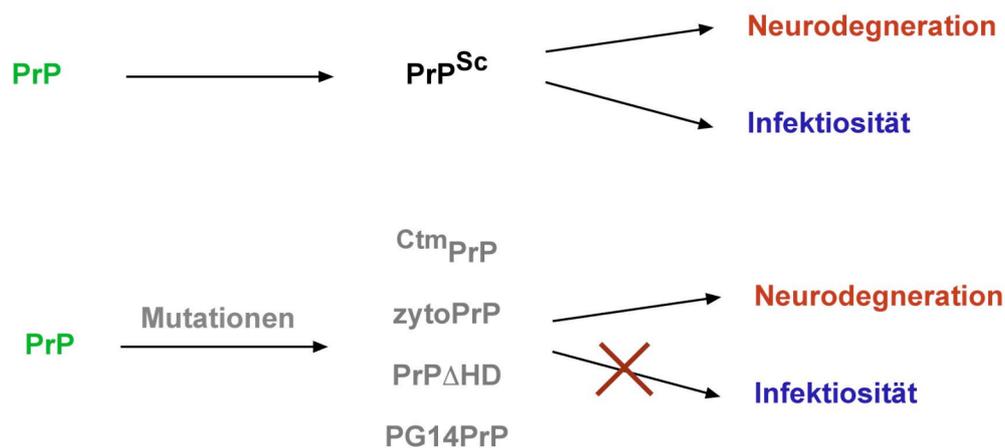
Histidin-Resten an Position 96 und 111 in humanem PrP<sup>C</sup> identifiziert werden (Hornshaw et al., 1995; Jackson et al., 2001). Es wurde postuliert, dass Kupfer als ein Kofaktor für eine bisher unentdeckte enzymatische Aktivität von PrP dient. Umstritten ist eine Superoxid-Dismutase (SOD)-Aktivität PrPs, welche in einigen Fällen beobachtet wurde, in anderen aber nicht verifiziert werden konnte (Brown et al., 1999; Hutter et al., 2003). Ebenfalls kontrovers diskutiert wird die Möglichkeit, dass PrP wichtig für die Kupferbeladung der SOD ist (Brown et al., 1997b; Hutter et al., 2003; Waggoner et al., 2000). Dagegen spricht, dass Kupfer-abhängige Enzyme hohe Affinität zu diesem Ion aufweisen (femtomolarer Bereich), während die von PrP nur im mikromolaren Bereich liegt. Der stärkste Hinweis auf eine Funktion in der Kupferhomöostase ist die Tatsache, dass die Bindung von Kupfer an PrP eine Konformationsveränderung in der Oktarepeat-Region vermittelt und die Endozytose von PrP<sup>C</sup> induziert (Pauly and Harris, 1998; Quaglio et al., 2001; Sumudhu et al., 2001). Dazu passend konnte gezeigt werden, dass in PrP-defizienten Mäusen eine signifikante Verringerung der synaptosomalen Kupferkonzentration vorliegt (Collinge et al., 1994; Manson et al., 1995).

## 2.5 PrP Missfaltung und Neurodegeneration

Prion-Erkrankungen sind durch drei Merkmale gekennzeichnet: die Akkumulation des missgefalteten Proteins PrP<sup>Sc</sup>, Infektiosität und Neurodegeneration. Über einen langen Zeitraum wurde angenommen, dass das missgefaltete Konformer PrP<sup>Sc</sup> sowohl für die Infektiosität als auch die Neurodegeneration verantwortlich ist.

Mittlerweile gilt es als gesichert, dass es sich bei PrP<sup>Sc</sup> zwar um das infektiöse Agens handelt, wahrscheinlich aber nicht um das toxische. Diese Annahme ist vor allem auf zwei Beobachtungen gestützt (Abb. 9):

1. PrP<sup>Sc</sup> führt nur in Anwesenheit von neuronal exprimierten PrP<sup>C</sup> zu Neurodegeneration
2. andere aberrante PrP-Formen führen in Mausmodellen zu Neurodegeneration ohne infektiöse Prionen zu bilden



**Abbildung 9: Neurodegeneration und Infektiosität sind voneinander trennbare Prozesse.** Die Konversion von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> führt zur Neurodegeneration und vermittelt Infektiosität. Verschiedene PrP-Mutanten sind ebenfalls in der Lage Neurodegeneration zu vermitteln, ohne dabei infektiöse Prionen zu bilden. Abbildung modifiziert aus (Winklhofer et al., 2008).

### 2.5.1 PrP<sup>Sc</sup> ist in Abwesenheit von neuronalem PrP<sup>C</sup> nicht toxisch

In Konsens mit der Prion-Theorie zeigen PrP-defiziente Mäuse vollständige Resistenz gegenüber Prion-Erkrankungen und können keine Prionen replizieren (Büeler et al., 1993; Sailer et al., 1994). Dies konnte von zwei eleganten Studien gestützt werden. Brandner und Kollegen transplantierten Gehirnbereiche aus Wildtyp (PrP-haltigen) Mäusen in Gehirne PrP-defizienter Mäuse. Nach Infektion dieser Mäuse mit Prionen konnte eine deutliche räumliche Restriktion der neuropathologischen Veränderungen auf die transplantierten, PrP<sup>C</sup>-exprimierenden Bereiche beobachtet werden (Brandner et al., 1996). Interessanterweise beeinträchtigte die voranschreitende PrP<sup>Sc</sup> Akkumulation keineswegs die Viabilität der PrP<sup>-/-</sup> Neuronen. Dies weist darauf hin, dass PrP<sup>Sc</sup> *per se* nicht toxisch ist. Die zweite Studie zeigt, dass Neurotoxizität nach Prion-Inokulation von der neuronalen Expression von PrP<sup>C</sup> abhängig ist. Die Expression von PrP<sup>C</sup> in Gliazellen führt zu fortlaufender Replikation von PrP<sup>Sc</sup> und Bildung von infektiösen Prionen. Trotzdem konnte die Replikation von PrP<sup>Sc</sup> in Gliazellen keine Degeneration von PrP-defizienten Neuronen induzieren (Mallucci et al., 2003).

### 2.5.2 PrP-Mutanten führen zu Neurodegeneration in Abwesenheit von PrP<sup>Sc</sup>

Transgene Mausmodelle indizierten, dass aberrante PrP-Konformere zu Neurodegeneration führen können, ohne dabei infektiös zu sein (Abb. 9). Eine Form von Mutanten zeigte, dass PrP<sup>C</sup>, unter Deletion der hydrophoben Core Domäne (CD), toxische Signale vermitteln kann (siehe 1.4.2). Ein weiteres aberrantes PrP-Konformer ist die pathogene Mutante PG14, welche durch eine neunfache Oktarepeat Insertion gekennzeichnet ist. Die Überexpression dieser Form führt in Mäusen zu Ataxie und Apoptose im Cerebellum (Chiesa et al., 1998).

Der Gewinn einer neurotoxischen Aktivität ist nicht nur auf PrP-Formen beschränkt, die sich GPI-verankert an der Zelloberfläche befinden. Formen, die ganz oder teilweise zytosolisch vorliegen, führen in Mäusen ebenfalls zu Neurodegeneration. Eine dieser Formen ist <sup>Ctm</sup>PrP, eine transmembranständige Form von PrP, deren N-Terminus zytosolisch vorliegt. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der <sup>Ctm</sup>PrP Synthese mit progressiver Neurodegeneration in humanen, hereditären Prion-Erkrankung assoziiert ist. Diese Erkrankung im Menschen ist an die Mutation A117V und in der Maus an eine Dreifach-Mutation AV3 (= A112, A114, A117V) gekoppelt (Hegde et al., 1998). Besonderes Interesse entfachte die Studie der Gruppe um Susan Lindquist. Sie zeigte, dass transgene Mäuse, die eine PrP-Mutante mit deletierter ER-Signalsequenz exprimieren, spontan Neurodegeneration entwickeln (Ma et al., 2002). Dies indizierte, dass aberrante PrP Formen im Zytosol toxisch sind. Das neurotoxische Potential von zytosolischen PrP Aggregaten konnte auch in Zellkultur nach proteasomaler Inhibierung verifiziert werden (Ma and Lindquist, 2002; Ma et al., 2002). Andere Studien konnten diese Daten allerdings nicht reproduzieren; eine Analyse zeigte sogar, dass zytosolisches PrP, wenn in humanen, primären Neuronen exprimiert, diese gegen BAX-vermittelten Zelltod schützen kann (Roucou et al., 2003). Interessanterweise konnte zytosolisches PrP mittels Kryoimmunogold-Elektronenmikroskopie (EM) in kleinen Subpopulationen neuronaler Zellen detektiert werden (Mironov et al., 2003). Diese Neuronen wiesen keinerlei Veränderungen auf, die auf neurodegenerative Prozesse hindeuten könnten. Welche Bedingungen zu einem toxischen Potential von zytosolischem PrP führen könnten, ist bisher noch weitgehend ungeklärt. Die Identifizierung interagierender Proteine, die die Toxizität zytosolischen PrPs vermitteln, ist für ein tiefgreifenderes und mechanistisches Verständnis der Toxizität von zytosolischem PrP essentiell.

Der molekulare Mechanismus der Neurotoxizität der oben aufgeführten PrP-Mutanten ist bisher unbekannt. Ein mechanistischer Einblick in den toxischen Prozess wäre aber für die Identifikation des toxischen Agens und somit für das Verständnis der Neurodegeneration bei Prion-Erkrankungen essentiell.

## 2.6 Neurodegeneration und Apoptose

Differenzierte Neuronen gehören zu den langlebigsten Zellen des Körpers. Dennoch stirbt während der Entwicklung des neuronalen Netzwerks eine große Zahl der Neuronen ab. Doch nicht nur während der Entwicklung sondern auch in akuten und chronischen Phasen der Neurodegeneration spielt der programmierte Zelltod eine wichtige Rolle. In verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten wie der Alzheimerschen Krankheit, der Parkinsonschen Krankheit, der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) und in Prion-Erkrankungen konnten apoptotische Merkmale identifiziert werden. Mittels der TUNEL-Methode konnten wiederholt in natürlich vorkommenden und experimentell induzierten TSE apoptotische Neuronen detektiert werden (Dorandeu et al., 1998; Fraser, 2002; Jesionek-Kupnicka et al., 1999; Jesionek-Kupnicka et al., 1997; Jesionek-Kupnicka et al., 2001). *In situ end labelling* führte zur Identifikation von Apoptose in humanen und experimentellen CJK-Fällen (Ferrer et al., 1994; Jesionek-Kupnicka et al., 1999). Interessanterweise konnte eine unabhängige Studie zeigen, dass die höchste Anzahl an apoptotischen Zellen in Bereichen des Gehirns ermittelt werden konnte, in welchen die spongiformen Veränderungen am geringsten waren (Kretzschmar et al., 1996). Ein weiterer Punkt, der für eine Beteiligung von Apoptose in der Neurodegeneration von Prion-Erkrankungen spricht, ist, dass kaum klassische Immunantworten in TSE-betroffenen Gehirnen zu detektieren sind (Brown, 1990). Während Apoptose ein programmiertes Selbstmord-Programm darstellt, führt Nekrose zur Zerstörung der gesamten Zelle, wodurch die so freigesetzten Zellbestandteile eine inflammatorische Antwort induzieren.

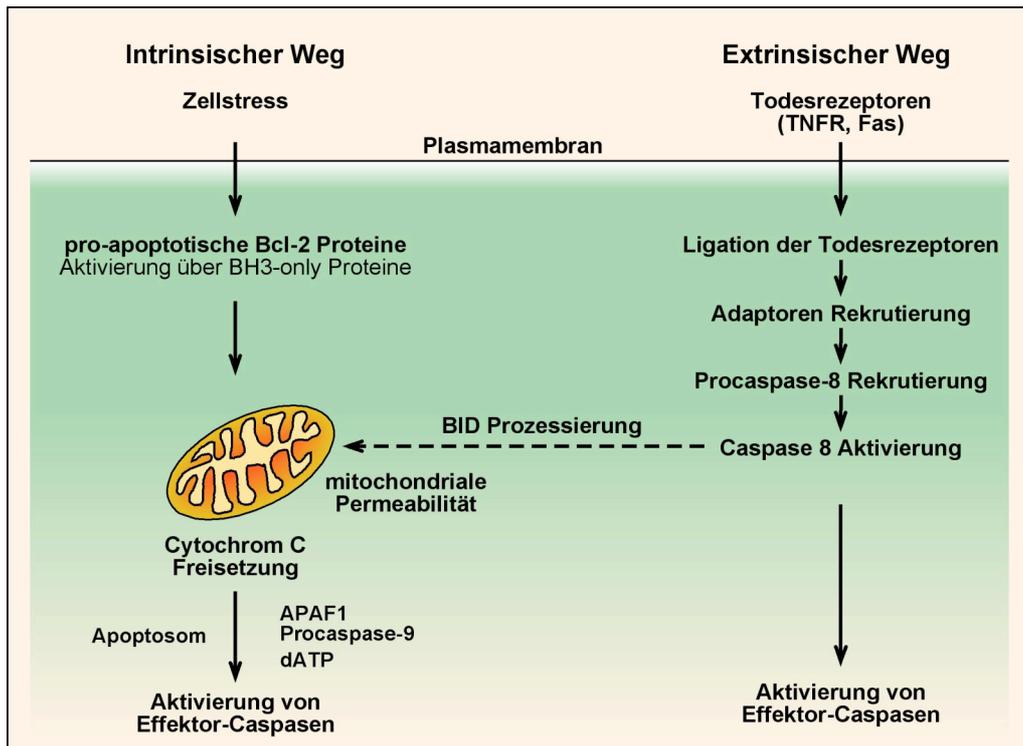
### 2.6.1 Molekulare Mechanismen der Apoptose

Apoptose ist klassischerweise über morphologische Merkmale wie Chromatin-Kondensation, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, Plasmamembran-Asymmetrie und Ablösen der Zelle von der extrazellulären Matrix gekennzeichnet. Das zelluläre Selbstmordprogramm kann grundsätzlich durch zwei verschiedene Wege, den extrinsischen und den intrinsischen Weg, induziert werden (Abb. 10). Der extrinsische Weg wird über die Multimerisierung von Todesrezeptoren an der Zelloberfläche vermittelt (Abb. 10). Ein Beispiel hierfür ist die Signalübermittlung über TNF (*Tumor Necrosis Factor*). Dieser rekrutiert nach Bindung an, und folgender Multimerisierung seines Rezeptors TNFR1, weitere Adaptermoleküle wie TRADD (*TNFR1-associated-death-domain*), FADD (*Fas-associated-death-domain*) und Caspase-8. Die Rekrutierung dieses Signalkomplexes führt letztlich durch die Akkumulation von Caspase-8 zu dessen Selbstaktivierung. Die aktivierte Form der Caspase-8 aktiviert proteolytisch Effektor-Caspasen wie Caspase-3 und 7. Einige Zellen sterben nicht durch die alleinige Aktivierung des extrinsischen Wegs und benötigen einen amplifizierenden Schritt.

Hierbei wird das BH3-only Protein BID durch die aktive Caspase-8 zu tBID geschnitten. Diese Form von BID ist in der Lage den intrinsischen Apoptoseweg zu induzieren.

Der intrinsische Weg wird hauptsächlich über zytosolische Proteine der Bcl-2-Familie reguliert (siehe 1.6.2).

Letztlich führen beide Wege zur Aktivierung von Caspasen, welche für die morphologischen Veränderungen, die Fragmentierung der Zelle und schließlich deren Phagozytose verantwortlich sind.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der in- und extrinsischen Induktion von Apoptose.** Der intrinsische Weg wird vor allem über Proteine der Bcl-2-Familie reguliert. Extrinsisch sind vor allem Oberflächenrezeptoren wichtig für die Induktion von Apoptose. Die Aktivierung von Caspasen führt in beiden Fällen zum apoptotischen Zelltod. Abbildung modifiziert aus (Chipuk and Green, 2005).

### 2.6.2 Die Bcl-2-Familie

Der intrinsische Weg wird vor allem über die Protein-Familie der Bcl-2 Proteine vermittelt. Zu dieser Familie gehören sowohl pro- als auch anti-apoptotische Mitglieder, welche alle durch die so genannten Bcl-2-Homologie Domänen 1-4 (BH 1-4) gekennzeichnet sind (Abb. 11).

Das best untersuchte anti-apoptotische Protein der Bcl-2-Familie ist Bcl-2 selbst. Trotz jahrelanger Forschung ist der anti-apoptotische Wirkungsmechanismus von Bcl-2 noch immer nicht vollkommen verstanden; es wird angenommen, dass Bcl-2 bei der Inhibierung der Cytochrom C Freisetzung, der Regulation der Bildung freier Radikale sowie der Modulation der Kalziumhomöostase eine Rolle spielt (Distelhorst and Shore, 2004; Hockenbery et al., 1993; Kane et al., 1993; Mikhailov et al., 2001; Murphy et al., 2000). Auf

molekularer Ebene ist vor allem die Ausbildung von Homo- und Heterodimeren grundlegend für die anti-apoptotische Funktion von Bcl-2. Verschiedene Modelle schlagen vor, dass vor allem das Verhältnis der Dimere zueinander über das Schicksal der Zelle entscheidet: hierbei sollen Bcl-2 Homodimere anti-apoptotisch sein, BAX-Homodimere den Zelltod vermitteln und Bcl-2/BAX-Heterodimere protektiv oder neutral wirken (Oltvai et al., 1993; Sato et al., 1994).

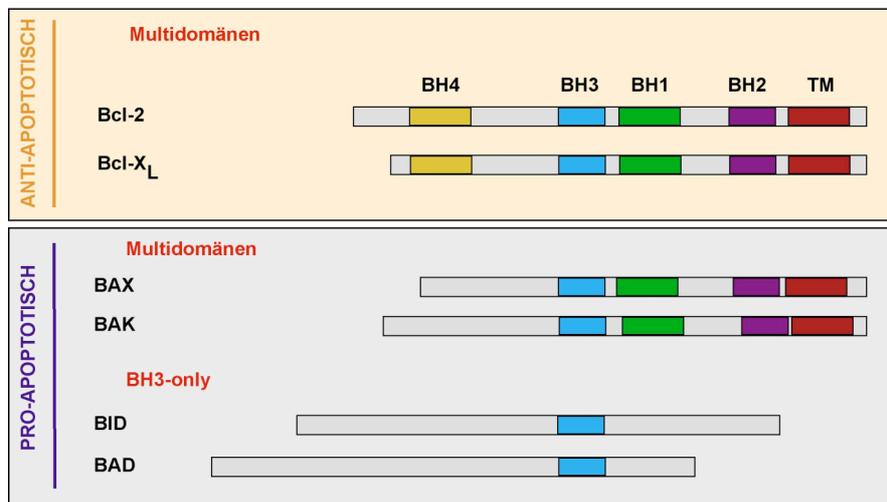
Die pro-apoptotischen Vertreter der Bcl-2 Familie können durch ihren unterschiedlichen strukturellen Aufbau in zwei verschiedene Untergruppen unterteilt werden: 1. die Multidomän-Proteine und 2. die BH3-*only* Proteine.

Zu ersterer werden die pro-apoptotischen Proteine BAX und BAK gezählt. Sie zeichnen sich, wie alle Mitglieder dieser Multidomän-Gruppe, durch die Anwesenheit mehrerer Bcl-2-Homologie (BH) Domänen aus (Abb. 11). Diese Gruppe der Proteine induziert mitochondriale Apoptose über die Freisetzung von Apaf-1 und Cytochrom C in das Zytosol. Dies führt schließlich zu Initiierung der apoptotischen Caspasen-Kaskade (Wei et al., 2001). BAX und BAK unterscheiden sich in ihrer zellulären Lokalisation, während BAK vornehmlich konstitutiv in Membranen integriert vorkommt, liegt BAX im Zytosol und lose assoziiert mit Membranen vor (Goping et al., 1998; Wolter et al., 1997). Unter dem Einfluss verschiedener Stress-Stimuli kommt es zu einer Konformationsveränderung von BAX, was einerseits zur Exposition der BH3-Domäne und andererseits zur Membranverankerung über den aktivierten C-Terminus führt (Desagher et al., 1999; Goping et al., 1998; Hsu and Youle, 1998; Nechushtan et al., 1999; Sundararajan and White, 2001; Suzuki et al., 2000). An den Membranen sind BAX und BAK in der Lage oligomere Strukturen aufzubauen, die vermutlich Kanäle bilden und zur Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol führen (Eskes et al., 2000).

Die zweite Untergruppe pro-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie sind die BH3-*only* Mitglieder, welche als Vermittler zwischen zellulären Stressbedingungen und der Aktivierung von pro-apoptotischen Proteinen wie BAX und BAK fungieren (Oda et al., 2000). Die Regulation der Aktivität dieser Untergruppe wird über verschiedene Mechanismen sichergestellt. PUMA und BIK werden über Transkriptionsprozesse reguliert, während andere (BAD, BIM, BID) konstitutiv exprimiert werden und unter der Einwirkung von zellulärem Stress einer aktivierenden Konformationsveränderung unterliegen. Diese führt zur Exposition der BH3-Helix (Gross et al., 1999; Harada et al., 1999; Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Mathai et al., 2002; Nakano and Vousden, 2001; Puthalakath et al., 1999; Yu et al., 2001). BID wird durch die aktivierte Caspase-8 zu tBID geschnitten, was zu dessen Translokation an Membranen und dort zur Aktivierung und Multimerisierung von BAX und BAK führt (Eskes et al., 2000; Perez and White, 2000). Obwohl zwischen den meisten BH3-

only Proteinen und BAX oder BAK keine direkten Interaktionen nachgewiesen wurden, können BH3-only Mitglieder wie BAK die Todeskompetenz von BAX/BAK über Interaktionen mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2 erhöhen (Cheng et al., 2001; Letai et al., 2002; Zong et al., 2001).

Die Aktivierung von Apoptose über die pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie führt zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP, *mitochondrial outer-membrane permeabilisation*). Durch das Einsetzen von MOMP kommt es zur Freisetzung weiterer apoptotischer Faktoren wie Cytochrom C oder APAF-1, was die Bildung des so genannten Apoptosomes induziert und zur Aktivierung der Caspase-9 führt. Diese Initiator-Caspase aktiviert die apoptotische Kaskade durch Aktivierung der Effektor-Caspasen wie Caspase-3.



**Abbildung 11: Exemplarische Darstellung von Mitgliedern der Bcl-2-Homologie-Familie.** Die Bcl-2-Familie kann in anti- und pro-apoptotische Mitglieder unterteilt werden. Bei den pro-apoptotischen Mitgliedern wird zwischen Multidomänen und BH3-only Proteine differenziert. Die einzelnen Bcl-2-Homologie (BH)- Domänen sind farblich wie folgt gekennzeichnet: gelb: BH4, blau: BH3, grün: BH1, violett: BH2 und in rot die Transmembrandomäne mit denen die entsprechenden Proteine an Membranen assoziiert oder integriert vorliegen können.

## 2.7 Therapeutische Ansätze für Prion-Erkrankungen

Prion-Erkrankungen sind durch lange Inkubationszeiten und einen extrem progressiven Krankheitsverlauf gekennzeichnet. Obwohl die Krankheit bereits im letzten Jahrhundert diagnostiziert wurde, existiert noch immer keine Therapiemöglichkeit. Zur Entwicklung bisheriger therapeutischer Ansätze dienten zahlreiche Studien in Tier- und Zellkulturmodellen. Zellkulturmodelle bieten hier den Vorteil, dass man sie aufgrund ihrer leichten und schnellen Auswertbarkeit zum „Screenen“ von Anti-Prion Substanzen einsetzen kann. Eine der Zelllinien, die weit verbreitet in der Prion-Forschung ist, sind immortalisierte neuronale Zellen der Maus, die mit Hirnhomogenat aus Scrapie (Sc)-infizierten Mäusen infiziert wurden und Proteinase K-resistentes und infektiöses PrP<sup>Sc</sup> replizieren können (ScN2a Zellen) (Butler et al., 1988; Caughey et al., 1989). Mit Hilfe dieses Modells wurden verschiedene Anti-Prion-Substanzen identifiziert: chemische Chaperone (Tatzelt et al., 1996), polyanionische Komponenten (Caughey and Raymond, 1993), Kongo-Rot (Caughey et al., 1993), Porphyrine (Caughey et al., 1998), kationische Lipopolyamine (Winklhofer and Tatzelt, 2000), Derivate von Phenothiazin (Korth et al., 2000) und Suramin (Gilch et al., 2001; Kiachopoulos et al., 2004). Leider zeigten all diese Substanzen *in vivo* keine langfristigen Effekte sondern nur eine Verlängerung der Inkubationszeit (Gilch et al., 2001; Ladogana et al., 1992; Priola et al., 2000; Tagliavini et al., 1997).

Viele der bekannten Wirkstoffe wurden mittlerweile an CJK-Patienten getestet. Leider besitzen diese starke Nebenwirkungen und keinen nachweisbaren therapeutischen Effekt. Dennoch konnte in einzelnen Fällen eine Linderung der Symptome erzielt werden. Erschwerend bei der Generierung therapeutischer Ansätze für Prion-Erkrankungen kommt noch hinzu, dass die Substanzen die Blut-Hirnschranke überwinden müssen. Auch die noch ungenügenden Diagnosemöglichkeiten stellen hier ein Problem dar, vor allem wenn man sich die Progressivität der Prion-Erkrankungen vor Augen führt. Ein Nachweis der Erreger im Blut ist mit heutigen Methoden durch die geringe Prionen-Konzentration dort nicht möglich.

## 2.8 Zielsetzung

Prion-Erkrankungen sind seltene und tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankungen die in sporadischer, dominant vererbbarer oder infektiöser Form vorkommen. Die Erkrankungen sind durch ungewöhnlich komplexe Ätiologien gekennzeichnet; der pathogene Mechanismus ist bis heute ungeklärt. Charakteristisches Merkmal der Krankheit ist die Ablagerung des missgefalteten Prion-Proteins PrP<sup>Sc</sup>, einem Protease-resistenten Konformationsisomer von PrP<sup>C</sup>. Obwohl bereits nachgewiesen werden konnte, dass PrP<sup>Sc</sup>/Prionen für die Übertragung der Krankheit essentiell ist, ist unklar, wie es neuronalen Zelltod induziert. So zeigten verschiedene Studien in transgenen Mäusen, dass die neuronale Expression von PrP<sup>C</sup> wichtig für die toxische Wirkung von PrP<sup>Sc</sup> ist. Darüber hinaus sind verschiedene PrP Mutanten beschrieben, die Neurodegeneration induzieren, ohne dass es dabei zur Bildung von infektiösen Prionen kommt. Daraus lässt sich schließen, dass andere Veränderungen oder Störungen des endogenen PrP-Metabolismus für die Neurotoxizität von Bedeutung sein könnten. Um diese Vermutung schlüssig zu bearbeiten, ist ein besseres Verständnis der toxischen Mechanismen aberranter PrP-Formen und der physiologischen Funktion von PrP<sup>C</sup> nötig, die trotz der Identifikation des Proteins vor über 20 Jahren noch nicht klar ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten drei zentrale Fragen bearbeitet werden:

1. Welche toxischen Mechanismen führen zur Neurodegeneration?  
(2.1 und 2.3)
2. Was ist die physiologische Funktion von PrP<sup>C</sup>?  
(2.2)
3. Wie kann man die Propagierung von PrP<sup>Sc</sup> verhindern?  
(2.4)

### 3 Ergebnisse

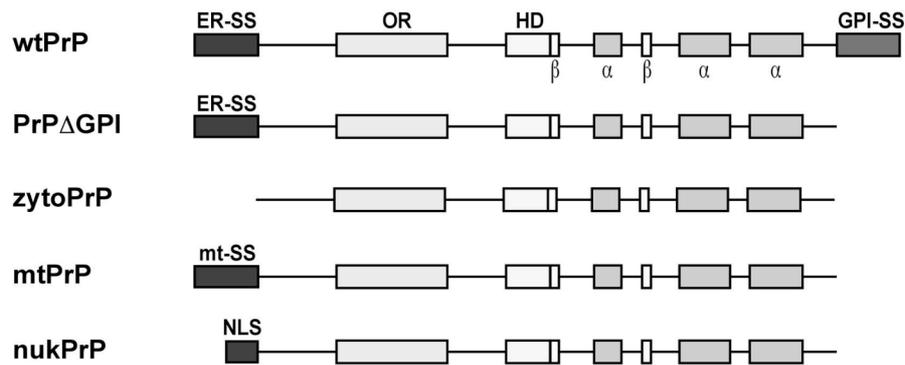
#### 3.1 Teil 1: Neurotoxische Mechanismen bei Prion-Erkrankungen: Aggregation von missgefaltetem PrP in verschiedenen Zellkompartimenten

Die Missfaltung und Fehllokalisierung von PrP scheint bei der Pathogenese von Prion-Erkrankungen eine zentrale Rolle zu spielen. Eine Studie mit transgenen Mäusen, die ein mutiertes PrP mit deletierter ER-Signalsequenz exprimierten, zeigte, dass die Missfaltung von PrP im Zytosol Neurodegeneration induzieren kann (Ma et al., 2002). Interessanterweise konnte in Gehirnen der spontan erkrankten Tiere keine Bildung von infektiösen Prionen festgestellt werden. Ein anderes transgenes Mausmodell zeigte jedoch, dass Missfaltung von PrP nicht *per se* toxisch ist. Die Expression von PrP $\Delta$ GPI einer Mutante mit deletierter GPI-Signalsequenz, führte zur extrazellulären Ablagerung von missgefaltetem PrP, die Mäuse zeigten jedoch keine erkennbaren Krankheitszeichen (Chesebro et al., 2005).

Basierend auf diesen Befunden in Tiermodellen, sollte im ersten Teil dieser Arbeit eine vergleichende Analyse der toxischen Kapazität von missgefaltetem PrP in verschiedenen Zellkompartimenten untersucht werden, um neue Einblicke in den toxischen Mechanismus von zytosolischem PrP zu generieren.

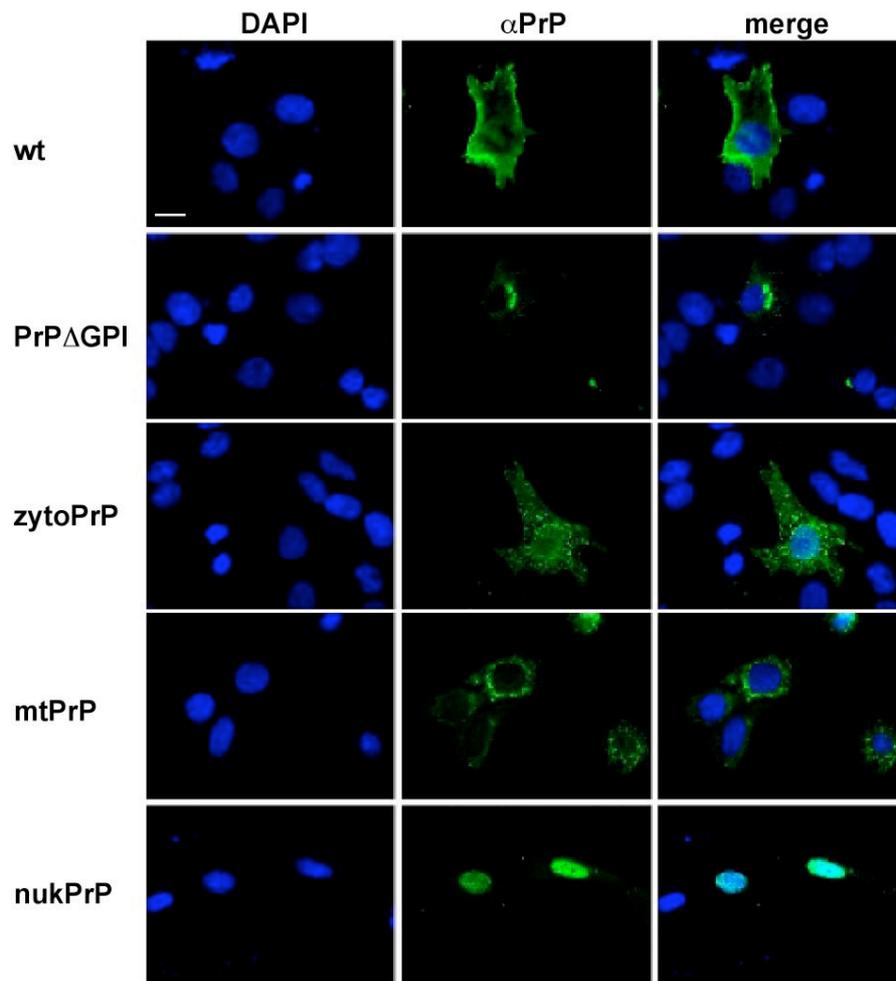
##### 3.1.1 Generierung von PrP-Lokalisationsmutanten

Um zu analysieren, ob verschiedene Kompartimente in der Zelle die gleiche Vulnerabilität gegenüber missgefaltetem PrP aufweisen, wurden die folgenden Lokalisationsmutanten generiert (Abb. 12): nukleäres PrP (nukPrP) mit der nukleären Signalsequenz des SV40 T Antigens, mitochondriales PrP (mtPrP) mit der Signalsequenz der Untereinheit 1 des UCR (Ubichinon-Cytochrom C Reduktase) Komplexes und zytoPrP, welchem die authentische ER-Signalsequenz fehlt. Die C-terminale GPI-Signalsequenz wurde bei allen Konstrukten deletiert, da für diesen Teil eine zweite ER-Import-Sequenz beschrieben ist (Holscher et al., 2001). Des Weiteren wurde die Mutante PrP $\Delta$ GPI in die Untersuchung miteinbezogen. Sie enthält die PrP-ER-Import Sequenz und wird daher effizient in das ER importiert. Aufgrund der fehlenden GPI-Signalsequenz kommt es im sekretorischen Weg zur Missfaltung und effizienten Sekretion (Blochberger et al., 1997; Rogers et al., 1993; Winklhofer et al., 2003).



**Abbildung 12: Schematische Präsentation der generierten PrP-Lokalisationsmutanten.** ER-SS: ER-Signalsequenz; OR: Oktarepeat; HD: hydrophobe Domäne;  $\alpha$ :  $\alpha$ -Helix;  $\beta$ :  $\beta$ -Faltblatt; GPI-SS: GPI-Signalsequenz; mt-SS: mitochondriale Signalsequenz; NLS: nukleäres Lokalisationssignal; bei allen Mutanten wurde die GPI-SS (AS 231-253) deletiert.

Zunächst wurde untersucht, ob die Konstrukte durch den Austausch der Signalsequenzen in die jeweiligen Kompartimente der Zelle importiert werden. Hierfür wurden indirekte Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt. Zellen der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, wurden transient mit Wildtyp-PrP (wtPrP) und den jeweiligen Lokalisationsmutanten transfiziert, fixiert und permeabilisiert. Die Lokalisation von wtPrP und der PrP-Mutanten wurde durch den Anti-PrP Antikörper 3F4 visualisiert. WtPrP zeigt eine klare Zelloberflächen-Lokalisierung (Abb. 13, wt). Die Färbung der Lokalisationsmutante nukPrP überlappt mit dem nukleären Marker DAPI, während PrP $\Delta$ GPI eine perinukleäre Lokalisation aufweist (Abb. 13, nukPrP). Diese für den Golgi-Apparat typische Färbung in Immunfluoreszenz-Analysen entsteht bei Überexpression sekretorischer Proteine und wurde bereits vorher mehrfach beobachtet (Heske et al., 2004; Winklhofer et al., 2003). Lediglich die mitochondriale Lokalisation von mtPrP konnte mittels dieser Methode nicht eindeutig geklärt werden (vgl. Abb. 13, mtPrP).

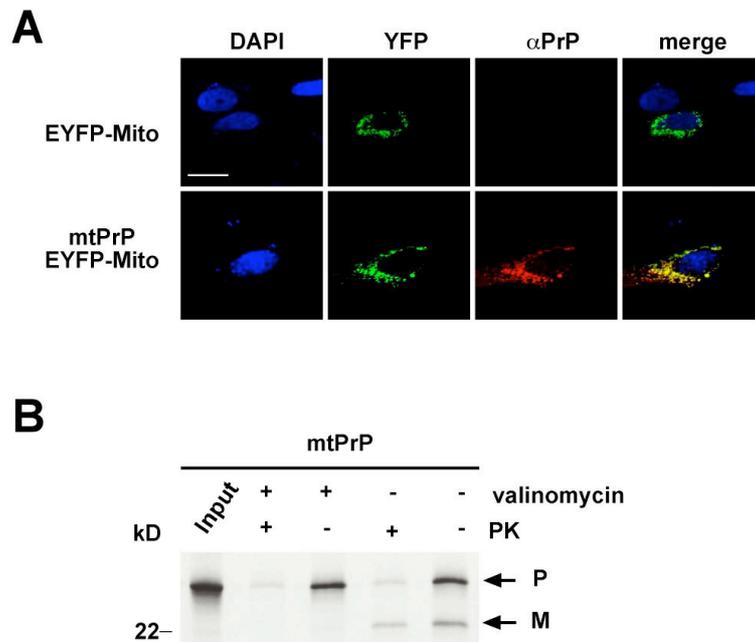


**Abbildung 13: Die Lokalisationsmutanten werden in die spezifischen Kompartimente importiert.** SH-SY5Y Zellen wurden transient mit wtPrP oder den Lokalisationsmutanten transfiziert und mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des monoklonalen Anti-PrP Antikörpers 3F4 analysiert. Nuklei wurden mit DAPI angefärbt. Größenstandard: 15 $\mu$ m.

Die zelluläre Lokalisation der Mutante mtPrP wurde deshalb mittels weiterer Experimente untersucht. Zunächst wurde eine indirekte Co-Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen neben mtPrP mit dem mitochondrialen Marker EYFP-Mito (EYFP fusioniert an eine mitochondriale Importsequenz) co-transfiziert. PrP zeigt eine deutliche Überlappung mit der zellulären Lokalisation des mitochondrialen Markers (Abb. 14A). Um den Befund der mitochondrialen Lokalisation von mtPrP weiter zu stützen, wurde ein mitochondrialer *in vitro* Import-Assay durchgeführt. Aufgereinigte Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae*, wurden mit *in vitro* translatiertem mtPrP inkubiert (die isolierten Mitochondrien wurden freundlicherweise von der AG von Dr. Doron Rapaport zur Verfügung gestellt). Als Kontrolle dienten mit Valinomycin behandelte Mitochondrien. Valinomycin inhibiert den mitochondrialen Import durch Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette. Nach 1-stündiger Importreaktion wurden die Proben einem Proteinase K-Verdau unterzogen um nicht-importierte Proteinfractionen zu verdauen. MtPrP wird effizient in Mitochondrien importiert, wie sich an dem Schnitt der Signalsequenz (M) bei Inkubation mit import-

kompetenten Mitochondrien (-valinomycin), sowie der Protektion vor Proteinase K-Verdau (-valinomycin, +PK) deutlich feststellen lässt (Abb. 14B).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich alle Lokalisationsmutanten in den jeweils erwarteten Kompartimenten befinden.



**Abbildung 14: MtPrP wird effizient in Mitochondrien importiert. (A)** Konfokale Aufnahmen von mtPrP und dem mitochondrialen Marker EYFP-Mito transfizierten SH-SY5Y Zellen. PrP wurde in der indirekten Immunfluoreszenz mittels des monoklonalen Anti-PrP Antikörpers 3F4 visualisiert, die Kerne wurden mit DAPI angefärbt. **(B)** Mitochondrialer *in vitro* Import Assay. MtPrP wurde *in vitro* translatiert und das radioaktiv markierte mtPrP (*input*) wurde mit isolierten Mitochondrien für 20 min bei 25°C inkubiert. Zu einem Sample wurde Valinomycin zugegeben (+ valinomycin) um den mitochondrialen Import zu inhibieren. Nach der Importreaktion wurde jede Probe in 2 Aliquots unterteilt. Bei einem der Aliquots wurden die Mitochondrien direkt pelletiert und in LSB aufgekocht (-PK). Das andere Aliquot wurde zunächst mit PK (500µg/ml; +PK) behandelt. Alle Proben wurden über SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. P (*precursor*): immature Form mit ungeschnittener mitochondrialen Signalsequenz; M: matures Protein; Größenmarker: 15µm.

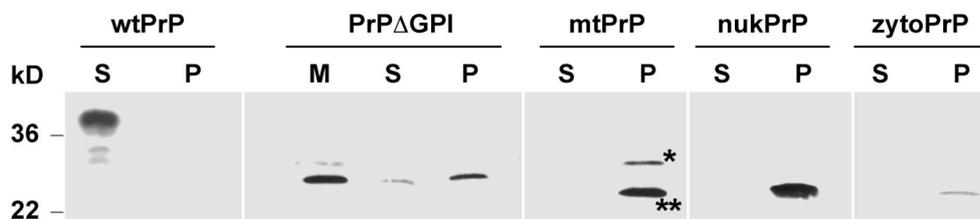
### 3.1.2 Biochemische Charakterisierung der Lokalisationsmutanten

Darauf folgend wurden die Lokalisationsmutanten biochemisch charakterisiert. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf das Löslichkeits- und Aggregationsverhalten der Mutanten gerichtet.

#### 3.1.2.1 Löslichkeitsprofil der Lokalisationsmutanten

Zum Erstellen eines Löslichkeitsprofils wurden SH-SY5Y Zellen transient mit wtPrP bzw. den Lokalisationsmutanten transfiziert. Nach der Lyse in 0,5% Triton-DOC wurden die Lysate mittels Zentrifugation in eine Detergenz-lösliche (S) und -unlösliche (P) Fraktion aufgeteilt. Zusätzlich wurde von PrP $\Delta$ GPI-transfizierten Zellen das Zellkulturmedium untersucht, um die

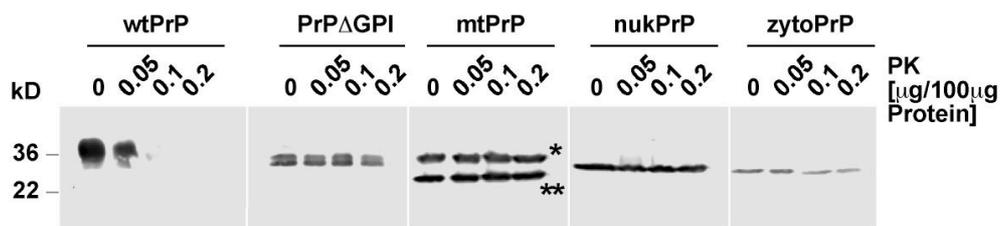
Sekretion des Proteins zu analysieren. Hierfür wurde das Medium einer TCA-Fällung unterzogen. PrP wurde mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen Anti-PrP Antikörpers 3F4 detektiert. WtPrP war in Triton-DOC löslich und daher nahezu ausschließlich in der löslichen (S) Fraktion zu finden (Abb. 15). Im Gegensatz dazu waren alle Lokalisationsmutanten hauptsächlich in der Detergenz-unlöslichen (P) Fraktion detektierbar (Abb. 15). Für PrP $\Delta$ GPI konnte verifiziert werden, dass es effizient in das Zellkulturmedium (M) sekretiert wird (Abb. 15, Spur M). Für die mitochondrial-lokalisierte Mutante, mtPrP, konnte ein Doppelbanden-Muster detektiert werden. Hierbei scheint es sich um die mature Fraktion (geschnittene Signalsequenz \*\*) von mtPrP sowie die immature Fraktion (ungeschnittene Signalsequenz \*) zu handeln (Abb. 15). Zudem konnte beobachtet werden, dass die relativen Mengen der verschiedenen Mutanten deutliche Unterschiede aufweisen; die Menge an zytosolischem PrP war am geringsten (Abb. 15, zytoPrP).



**Abbildung 15: Die Lokalisationsmutanten von PrP liegen hauptsächlich in einer Detergenz-unlöslichen Konformation vor.** SH-SY5Y Zellen wurden transient mit wtPrP und den verschiedenen PrP-Lokalisationsmutanten transfiziert. Die Zellen wurden in kaltem Puffer A lysiert und durch Zentrifugation in eine Detergenz-lösliche (S) und unlösliche (P) Fraktion aufgetrennt. Im Fall von PrP $\Delta$ GPI wurde zusätzlich auf Sekretion dieser Mutante getestet. Hierfür wurden die Zellen für 3 h in Serum-freien Medium inkubiert und PrP welches sich im Medium befand mittels TCA-Fällung präzipitiert (PrP $\Delta$ GPI, M). PrP wurde im Western Blot mittels des monoklonalen Antikörpers 3F4 visualisiert. Immature und mature Form des mitochondrialen PrPs sind als \* bzw. \*\* gekennzeichnet.

### 3.1.2.2 Proteinase K-Sensitivität der Lokalisationsmutanten

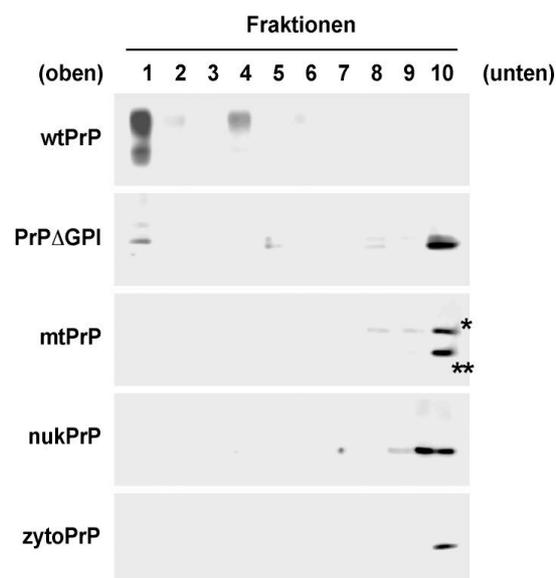
Aufgrund der hohen Detergenz-Unlöslichkeit der verschiedenen Mutanten liegt die Vermutung einer Fehlfaltung nahe. Um diese Vermutung weiter zu stützen, wurde ein limitierter proteolytischer Verdau mittels Proteinase K (PK) durchgeführt. Proteinextrakte aus mit wtPrP oder den Lokalisationsmutanten transfizierten SH-SY5Y Zellen, wurden mit aufsteigenden Konzentrationen an PK bei 4°C inkubiert. Verbleibendes PrP wurde mittels Western Blot detektiert. Wie in Abb. 16 deutlich zu erkennen, verringert sich mit ansteigender Menge an PK die Proteinmenge von wtPrP, während die Proteinmengen der Lokalisationsmutanten konstant bleiben. Bei einer PK-Konzentration von 0,2  $\mu$ g/100  $\mu$ g Protein sind noch alle Mutanten detektierbar, während wtPrP bereits komplett degradiert ist. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Mutanten im Gegensatz zu wtPrP in einer missgefalteten Konformation vorliegen.



**Abbildung 16: Die missgefalteten PrP-Mutanten sind PK insensitiv.** SH-SY5Y Zellen wurden mit wtPrP und den Lokalisationsmutanten transient transfiziert. Die Gesamtzelllysate wurden mit ansteigenden Konzentrationen an Proteinase K (PK) bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Unverdautes PrP wurde mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen Anti-PrP Antikörpers 3F4 detektiert. Immature und mature Form des mitochondrialen PrP sind als \* bzw. \*\* gekennzeichnet.

### 3.1.2.3 Aggregationsverhalten der Lokalisationsmutanten

Um weitere experimentelle Evidenz zu liefern, dass eine Detergenz-Unlöslichkeit sowie verminderte PK-Sensitivität eine Änderung der Protein-Konformation widerspiegelt, wurde das Sedimentationsverhalten der Lokalisationsmutanten mittels eines Sucrose-Stufengradienten analysiert. Hierfür wurden wtPrP sowie die Mutanten in SH-SY5Y Zellen exprimiert, die Zelllysate auf einen 30-40%igem Sucrose-Stufengradienten aufgeschichtet und mittels Ultrazentrifugation untersucht. Aus der Western Blot-Analyse der von oben nach unten abgenommenen Fraktionen des Gradienten geht deutlich hervor, dass wtPrP hauptsächlich in den oberen Fraktionen zu finden ist, während alle Mutanten vorherrschend in der untersten Fraktion zu detektieren sind (Abb. 17).

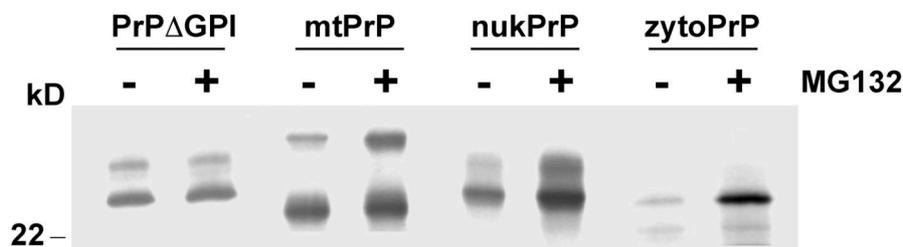


**Abbildung 17: Die Lokalisationsmutanten von PrP bilden Aggregate.** SH-SY5Y Zellen wurden transient mit wtPrP und den PrP-Mutanten transfiziert. Die Zellen wurden in 0,5% Triton X-100 und 0,5% DOC lysiert und die Zelllysate auf einen 30-40% Sucrose-Stufengradienten aufgeschichtet. Nach Ultrazentrifugation wurden von oben nach unten 10 Fraktionen von je 500  $\mu$ l abgenommen und diese mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen Anti-PrP Antikörpers 3F4 analysiert. Die immature und mature Form des mitochondrialen PrP sind je als \* bzw. \*\* gekennzeichnet.

Die biochemische Charakterisierung weist darauf hin, dass alle Lokalisationsmutanten in vergleichbarem Maße als Detergenz-unlösliche Protein-Aggregate vorliegen.

### 3.1.3 Zytosolisches PrP wird proteasomal degradiert

In den vorangegangenen Analysen konnte festgestellt werden, dass zytoPrP in geringeren Mengen vorliegt als die anderen Lokalisationsmutanten. Eine Ursache hierfür könnte die sukzessive proteasomale Degradierung von zytoPrP sein (Ma et al., 2002). Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden SH-SY5Y Zellen mit den verschiedenen Lokalisationsmutanten transfiziert und radioaktiv mit  $^{35}\text{S}$ -haltigem Methionin markiert. Die Zellen wurden für 3 Stunden in An- (+MG132) oder Abwesenheit (-MG132) des proteasomalen Inhibitors MG132 bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Immunpräzipitation analysiert. Zytosolisches sowie nukleäres PrP werden durch den Inhibitor MG132 stabilisiert, während auf die sekretorische Mutante kein Einfluss von MG132 erkennbar ist (Abb. 18). Die mitochondrial-lokalisierte Mutante wird nur in ihrer immaturren Form (\*) stabilisiert, während MG132 keinen Effekt auf die mature, importierte Fraktion (\*\*) zeigt (Abb. 18). Zu bemerken ist weiterhin, dass es nach proteasomaler Inhibition lediglich zu einer Angleichung der Proteinmengen kommt, zytoPrP aber niemals höhere Proteinmengen aufweist als die anderen Mutanten.



**Abbildung 18: Zytosolisches und nukleäres PrP werden proteasomal degradiert.** SH-SY5Y Zellen wurden transient mit den jeweiligen Mutanten transfiziert, mit  $^{35}\text{S}$ -haltigem Methionin metabolisch markiert und in An- (+MG132) oder Abwesenheit des proteasomalen Inhibitors MG132 für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und PrP mittels Immunpräzipitation unter Verwendung des monoklonalen Anti-PrP Antikörpers 3F4 präzipitiert sowie durch SDS-PAGE und Autoradiographie visualisiert.

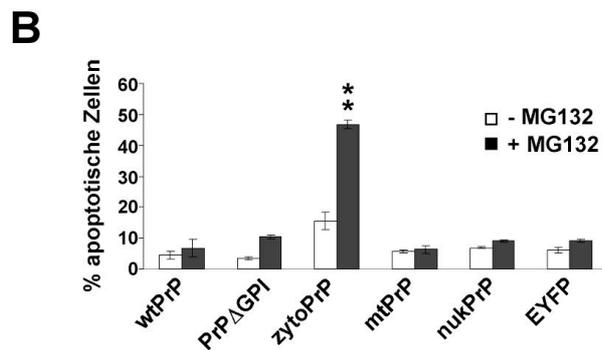
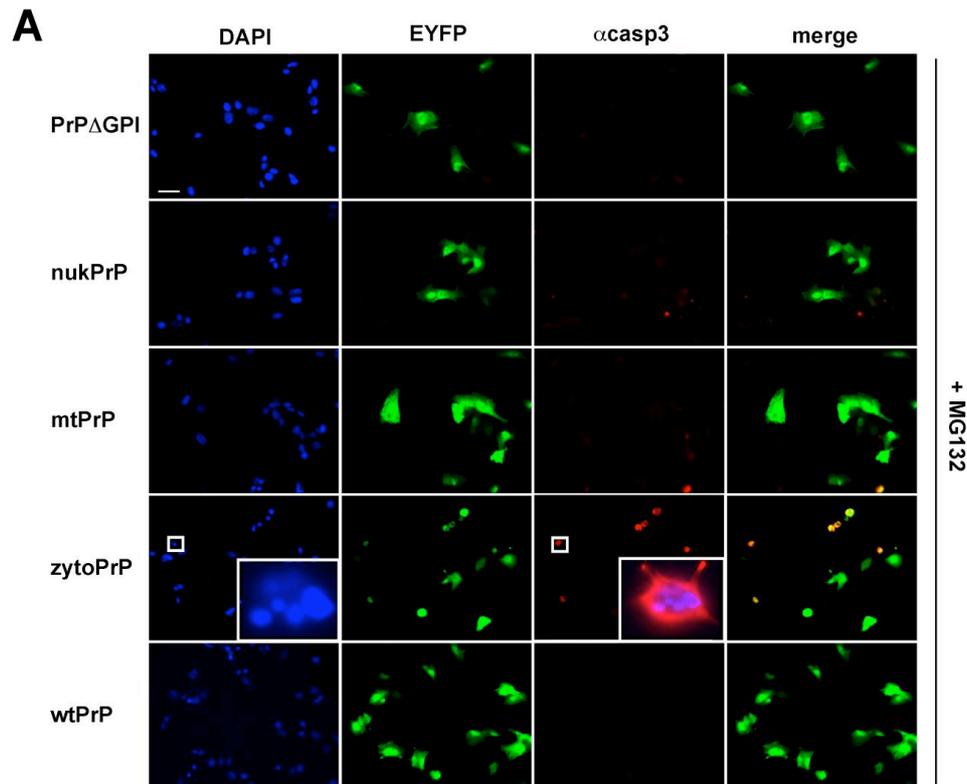
### 3.1.4 Aggregation von PrP im Zytosol ist toxisch

Nachdem festgestellt werden konnte, dass die biochemischen Eigenschaften der PrP-Mutanten im Nukleus, Zytosol, Mitochondrien und ER vergleichbar sind, sollte nun das toxische Potential der einzelnen Mutanten untersucht werden.

Da zytosolisches und nukleäres PrP proteasomal degradiert werden können, wurden die folgenden Toxizitätsanalysen in Ab- und Anwesenheit des proteasomalen Inhibitors MG132 durchgeführt, um die Proteinmengen der einzelnen Mutanten anzugleichen. Die Lokalisationsmutanten wurden mittels eines Apoptose-Assays auf ihr toxisches Potential untersucht. Hierfür wurden humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) transient mit wtPrP und den Lokalisationsmutanten transfiziert und für 3 Stunden in An- und Abwesenheit von MG132 (30  $\mu$ M) inkubiert. Apoptotische Zellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen aktivierte Caspase-3 visualisiert und quantifiziert. Die Spezifität dieses Antikörpers wurde durch Kontroll-Experimente, in denen Apoptose mittels Staurosporin induziert wurde nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Toxizitätsanalyse zeigte deutlich, dass MG132 weder auf Kontroll-transfizierte Zellen noch auf Zellen die PrP im Nukleus, im ER oder in den Mitochondrien exprimieren toxisch wirkt (Abb. 19A, B). Dahingegen zeigen Zellen mit zytosolischem PrP einen signifikanten Anstieg in der Apoptoserate (Abb. 19A, B). Die Expression von zytoPrP führte bereits unter physiologischen Bedingungen zu einem leichten Anstieg an apoptotischen Zellen, der aber nicht signifikant war ( $P=0,059$ ) (Abb. 19B, zytoPrP -MG132)

In diesem Kontext interessant ist, dass die, in geringen Mengen vorhandene, nicht-importierte Form von mtPrP nicht toxisch ist. Es ist möglich, dass diese immature Form, auch wenn sie im Zytosol vorliegt, bereits mit der mitochondrialen Import Maschinerie assoziiert, oder an zytosolische Proteine wie Hsp70, welchem eine wichtige Rolle beim mitochondrialen Import zukommt, gebunden ist und daher nicht in der Lage ist Apoptose zu induzieren.

Das toxische Potential von missgefaltetem und aggregiertem PrP scheint somit direkt mit seiner zytosolischen Lokalisation verknüpft zu sein. Die Missfaltung von PrP in anderen Kompartimenten, wie dem ER, den Mitochondrien oder dem Nukleus hatte keinen vergleichbaren Einfluss auf die Viabilität der Zellen.



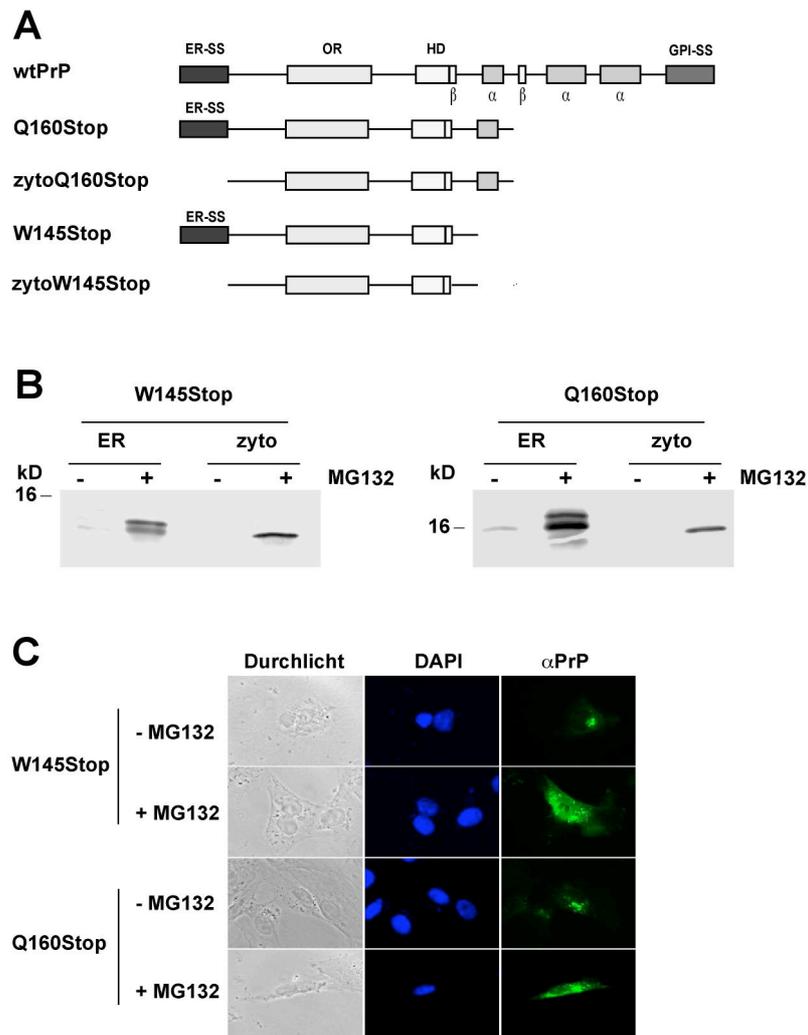
**Abbildung 19: Missfaltung von PrP im Zytosol führt zur Induktion von Apoptose.** SH-SY5Y Zellen wurden mit EYFP und wtPrP bzw. den Lokalisationsmutanten transient co-transfiziert. 20 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit des proteasomalen Inhibitors MG132 (30 $\mu$ M) für 3 Stunden bei 37°C inkubiert, fixiert, permeabilisiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Apoptotische Zellen wurden durch Verwendung eines spezifisch gegen die aktivierte Form der Caspase-3 gerichteten Antikörpers visualisiert (**A**) und quantifiziert (**B**). Für die Quantifizierung wurden 1000 transfizierte Zellen aus mindestens drei unabhängig-durchgeführten Experimenten gezählt. Gezeigt ist der Prozentsatz an apoptotischen unter den transfizierten Zellen. \*\* $p < 0,001$  im Vergleich zu allen anderen PrP-Mutanten und der EYFP-Kontrolle. Gößenmarker, 40 $\mu$ m.

### **3.1.5 Zytosolische Formen pathogener Deletionsmutanten induzieren Apoptose**

Die oben aufgeführten Experimente demonstrieren, dass die zytosolische Lokalisation von PrP Apoptose induzieren kann. Es stellt sich die Frage, ob eine solche Fehllokalisierung von pathophysiologischer Bedeutung bei humanen Prion-Erkrankungen sein kann.

#### **3.1.5.1 Pathogenen Mutanten werden nicht effizient ins ER importiert und im Zytosol proteasomal degradiert**

Vorangegangene Studien zeigten, dass Wildtyp-PrP sowie die Mutante D177N nach proteasomaler Inhibition im Zytosol akkumulieren (Ma and Lindquist, 2001; Yedidia et al., 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass die beiden humanpathogenen C-terminalen Deletionsmutanten W145Stop und Q160Stop teilweise im Zytosol vorliegen und hier proteasomal degradiert werden (Heske et al., 2004; Zanusso et al., 1999). Die Untersuchungen der mit dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom assoziierten Mutanten weisen darauf hin, dass eine zytosolische Lokalisation in Prion-Erkrankungen von Bedeutung sein könnte. Daher wurden die Mutanten W145Stop und Q160Stop in der vorliegenden Arbeit auf ihre apoptotische Aktivität untersucht. Als Kontrolle wurden zusätzlich Doppelmутanten von W145Stop und Q160Stop generiert, bei denen die ER-Signalsequenz deletiert wurde. Alle vier Mutanten sind in Abb. 20 A schematisch dargestellt. Zunächst wurde mittels Immunpräzipitations-Analyse untersucht, ob die pathogenen Mutanten auch in der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y partiell zytosolisch vorliegen. Die transfizierten Zellen wurden mittels <sup>35</sup>S-Methionin radioaktiv markiert, für 3 Stunden in An- oder Abwesenheit von MG132 (30 µM) bei 37°C inkubiert und PrP mittels Immunopräzipitation analysiert. Die pathogenen PrP-Mutanten liegen in einer murenen (mit geschnittener Signalsequenz) Form sowie einer immaturren (mit ungeschnittener Signalsequenz) Form vor (Abb. 20 B, ER). Es konnte beobachtet werden, dass beide Fraktionen durch den proteasomalen Inhibitor stabilisiert werden (Abb. 20 B, +MG132). Die zytosolische Akkumulation der pathogenen Mutanten, nach transienter proteasomaler Inhibition, konnte ebenfalls durch indirekte Immunfluoreszenz-Analysen beobachtet werden. Hierfür wurden SH-SY5Y Zellen transient mit den Mutanten W145Stop und Q160Stop transfiziert und mit und ohne 3-stündige Inkubation mit MG132 mittels des monoklonalen Anti-PrP Antikörper 3F4 visualisiert. Bei beiden Mutanten lässt sich nach Zugabe von MG132 eine deutliche zytosolische Färbung erkennen, nicht aber ohne proteasomale Inhibition (Abb. 20C).

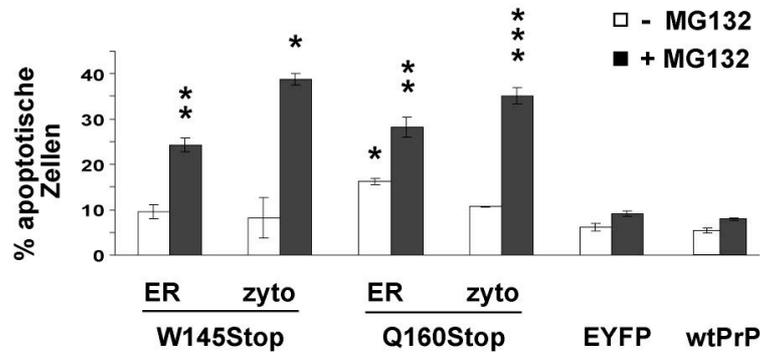


**Abbildung 20: Pathogene Mutanten verbleiben partiell im Zytosol.** (A) schematische Darstellung der pathogenen Mutanten. Es wurden je 2 Versionen jeder Mutante hergestellt, eine mit authentischer ER-Signalsequenz (ER-SS) und eine mit deletierter ER-SS (zyto). (B-C) SH-SY5Y Zellen wurden transient mit den Mutanten mit (ER) und ohne (zyto) ER-SS transfiziert und für 45 Minuten (B) oder 3 Stunden (C) in An- und Abwesenheit des proteasomalen Inhibitors MG132 bei 37°C kultiviert. PrP wurde mittels Immunpräzipitation (B) oder indirekter Immunfluoreszenz (C) unter Verwendung des Anti-PrP Antikörpers 3F4 analysiert.

### 3.1.5.2 Zytosolische Formen der pathogenen Mutanten induzieren Apoptose

Um das toxische Potential der Mutanten W145Stop und Q160Stop zu untersuchen, wurden SH-SY5Y Zellen transient mit wtPrP, EYFP und den C-terminalen Deletionsmutanten sowie ihren zyto-Formen transfiziert und in An- oder Abwesenheit des proteasomalen Inhibitors MG132 inkubiert. Apoptose wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung eines gegen aktivierte Caspase-3 gerichteten Antikörpers visualisiert und quantifiziert. In den MG132-behandelten Zellen zeigten die Deletionsmutanten und ihre zytosolischen Formen eine toxische Aktivität, während die Expression von wtPrP oder EYFP keine Apoptose induzierte (Abb. 21). Die zytosolischen Formen (zyto) zeigten konsistent höhere Apoptoseraten als die Mutanten mit Signalsequenz (ER) was indiziert, dass die apoptotische

Aktivität von den zytosolischen Formen ausgeht (Abb. 21). Ob die Fraktionen mit geschnittener Signalsequenz additiv zu dem toxischen Effekt beitragen kann anhand dieser Experimente nicht ausgeschlossen werden. Interessanterweise zeigt die Mutante Q160Stop bereits in Abwesenheit von MG132 eine signifikante Induktion von Apoptose (Abb. 21, Q160Stop ER).



**Abbildung 21: Die pathogenen Mutanten induzieren Apoptose.** SH-SY5Y Zellen wurden transient mit den pathogenen Mutanten mit ER-SS (ER) oder ihren zytosolischen Formen (zyto) und EYFP co-transfiziert und für 3 Stunden mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 (30  $\mu$ M) inkubiert. Apoptotische Zellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des Anti-ACTIVE Caspase-3 Antikörpers detektiert und quantifiziert. \* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,001$  und \*\*\* $p < 0,0001$  im Vergleich zu nur mit EYFP transfizierten Zellen. Größenmarker: 15  $\mu$ m

Diese Ergebnisse zeigen, dass zwei pathogene PrP Mutanten, die mit humanen, vererbaren Prion-Erkrankungen in Zusammenhang stehen, im Zytosol vorliegen und Apoptose induzieren können. Zusätzlich indizieren diese Daten, dass die C-terminalen Bereiche (AS 146-255) für die toxische Aktivität von zytosolischem PrP nicht notwendig sind.

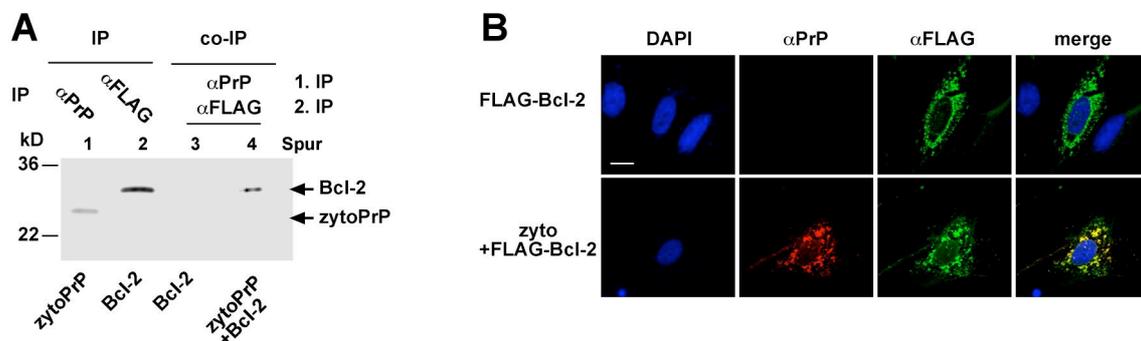
### 3.1.6 ZytoPrP assoziiert und co-aggregiert mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2

Es stellte sich nun die Frage, wie die Toxizität von zytoPrP vermittelt wird. Eine Möglichkeit ist, dass zytoPrP mit zytosolischen Proteinen interagiert. Die so entstehenden Komplexe könnten entweder direkt Apoptose induzieren, oder indirekt, indem sie anti-apoptotische Signale inhibieren. Interessanterweise zeigten vorangegangene Studien in *yeast two hybrid screens* eine Interaktion zwischen PrP und dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2 (Kurschner and Morgan, 1995; Kurschner and Morgan, 1996). Die Studie von Kurschner und Morgan fand über einen langen Zeitraum hinweg keine größere Bedeutung, da die unterschiedliche Lokalisation von wtPrP (Zelloberflächenprotein) und Bcl-2 (zytosolisches Protein) eine physiologische Bedeutung der Interaktion ausschloss. Nachdem mehrmals gezeigt werden konnte, dass PrP im Zytosol aggregieren kann, könnte eine Interaktion zwischen Bcl-2 zur zytoPrP-vermittelten Toxizität beitragen.

Zunächst wurde eine mögliche Interaktion von zytoPrP und Bcl-2 im Zellkulturmodell untersucht. SH-SY5Y Zellen wurden transient mit zytoPrP und FLAG-Bcl-2 co-transfiziert und metabolisch mit  $^{35}$ S-haltigem Methionin markiert. PrP wurde unter Verwendung des Anti-

Serums 3B5 aus Zelllysaten unter leicht denaturierenden Bedingungen immunpräzipitiert. Das Immunpellet wurde durch Aufkochen in Puffer A (0,5 % Triton X-100, 0,5 % DOC in PBS) aufgelöst und FLAG-Bcl-2 in einer zweiten Immunpräzipitation durch den monoklonalen Antikörper Anti-FLAG M2 isoliert (Abb. 22A, Spur 4). Bcl-2 konnte unter diesen Bedingungen co-isoliert werden (Abb. 22A, Spur 1), was darauf hindeutet, dass zytoPrP in neuronalen Zellen mit Bcl-2 interagieren kann. Bcl-2 konnte in Zellen die kein zytoPrP oder nur wtPrP exprimieren nicht co-isoliert werden (Abb. 22, Spur 3 und Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde die Mutante FLAG-Bcl-2- $\Delta$ 202-219, welche eine Deletion in der von Kurschner und Morgan identifizierten Interaktionsdomäne enthält, als Negativkontrolle generiert. Wie vermutet interagiert diese Mutante nicht mit zytoPrP (Abb. 23 unten und Abb. 26A rechts).

Eine Interaktion bzw. Co-Lokalisation zwischen zytoPrP und Bcl-2 wurde zusätzlich durch indirekte Immunfluoreszenz-Analysen nachgewiesen. Hierbei fällt auf, dass sich die Lokalisation von Bcl-2 unter Co-Expression von zytoPrP verändert (Abb. 22B). Es zeigen sich unter Co-Expression von zytoPrP größere punktuelle Färbungen als ohne. Dies könnte auf eine Änderung in der Faltung oder eine zytoPrP induzierte Aggregation von Bcl-2 hinweisen.

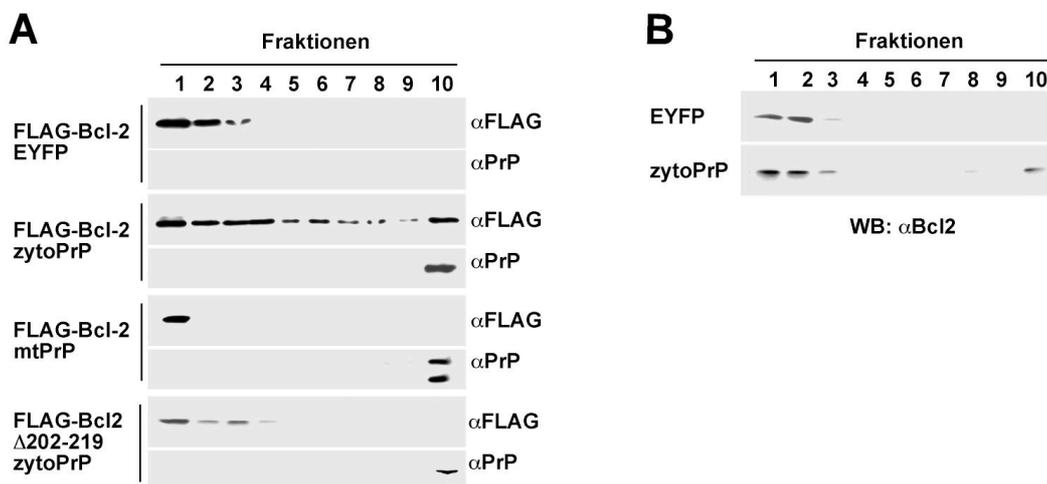


**Abbildung 22: ZytoPrP interagiert mit Bcl-2.** (A) SH-SY5Y Zellen wurden transient mit zytoPrP und FLAG-Bcl-2 (Spur 4) oder nur mit Bcl-2 (Spur 3) transfiziert, in Anwesenheit des proteasomalen Inhibitors MG132 radioaktiv markiert und in 0,1% Triton X-100 Puffer lysiert. PrP wurde unter Verwendung des 3B5 Antikörpers immunpräzipitiert (1. IP,  $\alpha$ PrP). Durch Aufkochen freigesetzte Proteine wurden einer 2. Immunpräzipitation unter Verwendung des Anti-FLAG M2 Antikörpers unterzogen (2. IP,  $\alpha$ FLAG). Als Kontrolle wurden zytoPrP und Bcl-2 unter denaturierenden Bedingungen präzipitiert (Spur 1 und 2). (B) Transfizierte Zellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des Anti-PrP Antikörpers 3F4 und des Anti-FLAG M2 Antikörpers analysiert und Aufnahmen an einem Konfokalmikroskop generiert.

Um weitere Evidenzen für eine veränderte Faltung oder Aggregation von Bcl-2 durch zytoPrP zu generieren, wurde das Sedimentationsverhalten von Bcl-2 in einem Sucrose-Stufengradienten analysiert. SH-SY5Y Zellen wurden transient mit FLAG-Bcl-2 und EYFP (Kontrolle), zytoPrP oder mtPrP co-transfiziert. Die Zelllysate wurden auf einen 30-40% Sucrose-Stufengradienten aufgebracht und zentrifugiert. Die Lokalisation von Bcl-2, zytoPrP und mtPrP wurde in den 10 von oben nach unten abgenommenen Fraktionen des Gradienten

mittels Western Blot detektiert. Beide PrP-Mutanten befinden sich in der untersten Fraktion des Gradienten (Abb. 23A, Mitte) während Bcl-2 in den obersten Fraktionen des Gradienten zu detektieren ist (Abb. 23A oben). Unter Co-Expression von zytoPrP kommt es zu einer Veränderung der Bcl-2-Lokalisation; Bcl-2 co-sedimentiert mit zytoPrP in die unteren Fraktionen des Stufengradienten (Abb. 23A, FLAG-Bcl-2/zytoPrP).

Bemerkenswerterweise führt die Co-Expression des nicht-toxischen mtPrPs zu keiner veränderten Sedimentation von Bcl-2 (Abb. 23A, FLAG-Bcl-2/mtPrP). Ähnlich verhält sich auch die Kontrolle FLAG-Bcl-2- $\Delta$ 202-219, welche aufgrund der fehlenden Interaktionsdomäne nicht in die zytoPrP-Aggregate rekrutiert wird (Abb. 23A unten). Des Weiteren beschränkte sich die beobachtete Co-Aggregation nicht nur auf überexprimiertes Bcl-2; die Expression von zytoPrP führte auch zur Co-Aggregation von endogenem Bcl-2 (Abb. 23B).



**Abbildung 23: ZytoPrP induziert die Aggregation von Bcl-2.** (A) SH-SY5Y Zellen wurden transient mit FLAG-Bcl-2 oder FLAG-Bcl-2 $\Delta$ 202-219 und EYFP, zytoPrP oder mtPrP co-transfiziert. Gesamtzelllysate wurden auf einen 30-40% Sucrosegradienten geladen und bei 200.000 g für 90 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Von oben nach unten wurden 10 Fraktionen abgenommen und die enthaltenen Proteinen mittels TCA-Fällung präzipitiert und Bcl-2 sowie PrP im Immunoblot unter Verwendung des Anti-FLAG M2 Antikörpers bzw. des Anti-PrP Antikörpers 3F4 detektiert. (B) ZytoPrP interagiert mit endogenem Bcl-2. Zellen wurden transient mit EYFP oder zytoPrP transfiziert und wie in (A) beschrieben mittels Dichtezentrifugation untersucht. Bcl-2 wurde unter Verwendung des Anti-FLAG M2 Antikörpers detektiert.

In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass das veränderte Sedimentationsverhalten von Bcl-2 (verursacht durch zytoPrP) nicht auf apoptotische Zellveränderungen zurückzuführen ist. Denn erstens führt die Überexpression von Bcl-2 zu einer Inhibition des durch zytoPrP-vermittelten Zelltods (Abb. 24) und zweitens konnte keine veränderte Lokalisation von Bcl-2 nach Apoptose-Induktion durch Staurosporin-Behandlung detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Zudem scheint die Co-Aggregation von Bcl-2 PrP-spezifisch zu sein. Die zytosolische Parkin-Mutante (W453Stop), die sich ebenfalls aufgrund

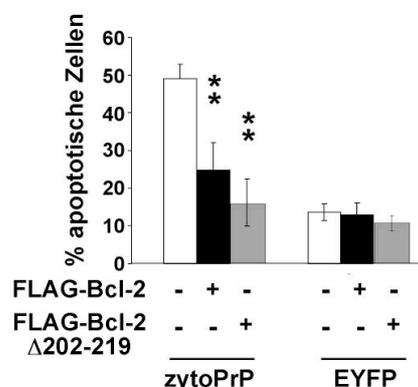
ihrer aggregierten Konformation in der untersten Fraktion des Gradienten befindet (Henn et al., 2005), führt nicht zu einer Aggregation von Bcl-2 (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.7 Kausaler Zusammenhang zwischen zytoPrP-Toxizität und Bindung an Bcl-2

Bcl-2 ist ein essentieller Bestandteil in der Regulation von Apoptose. Die Bindung verschiedener Faktoren an Bcl-2 kann darüber entscheiden, ob Zellen durch Apoptose sterben oder überleben. Daher stellte sich die Frage, ob die Interaktion zwischen zytoPrP und Bcl-2 kausal mit der zytoPrP-vermittelten Toxizität zusammenhängen könnte.

#### 3.1.7.1 ZytoPrP vermittelte Apoptose kann durch die Expression von Bcl-2 verhindert werden

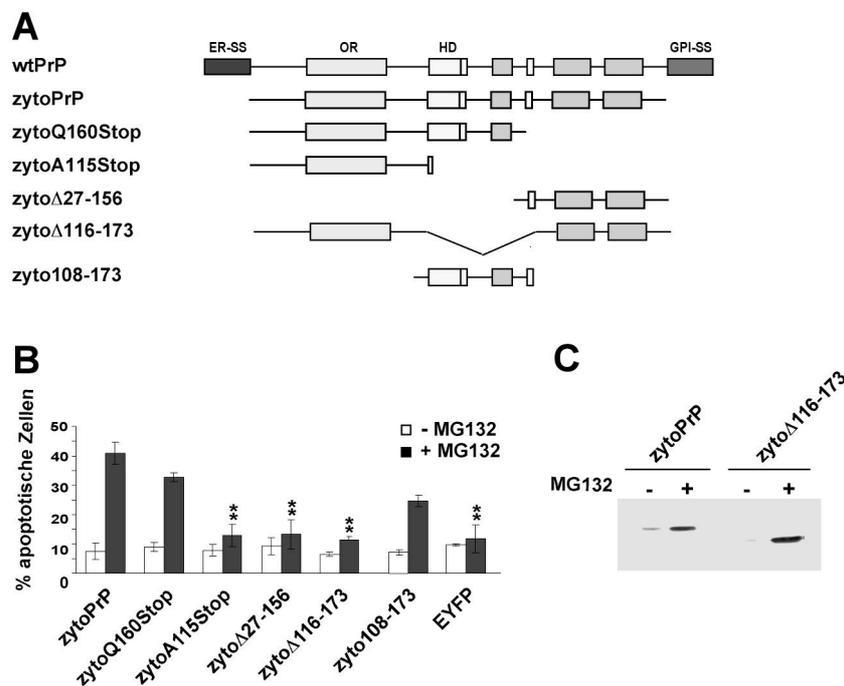
Zunächst sollte untersucht werden, ob die Überexpression von Bcl-2 den zytoPrP-vermittelten Zelltod verringern kann. Um dies zu testen wurden SH-SY5Y Zellen transient mit zytoPrP und EYFP oder Bcl-2 co-transfiziert. Apoptotische Zellen wurde mittels des Apoptose Assays detektiert und quantifiziert. Tatsächlich konnte die Co-Expression von Bcl-2 den durch zytoPrP-induzierten Zelltod verringern (Abb. 24 +FLAG-Bcl-2). Auch die Bcl-2-Mutante mit deletierter Interaktionsdomäne zeigte diesen protektiven Effekt, sogar in erhöhtem Maße (Abb. 24 +FLAG-Bcl-2 $\Delta$ 202-219). Dies lässt sich wie folgt erklären: Trotz der Deletion der AS 202-219 von Bcl-2 behält diese Mutante ihr anti-apoptotisches Potential bei kann aber im Gegensatz zum Vollängen-Bcl-2 nicht mit zytoPrP interagieren und daher seine Funktion voll erfüllen. Dahingegen wird die anti-apoptotische Kapazität von wt-Bcl-2 vermutlich durch die Co-Aggregation mit zytoPrP teilweise inhibiert. Zu beachten ist, dass unter den Co-Expressionsbedingungen die Proteinmenge von zytoPrP nicht abnahm. Unter den reduzierten Apoptosebedingungen konnte sogar eine Erhöhung der zytoPrP-Mengen festgestellt werden (Abb. 28B).



**Abbildung 24: Überexpression von Bcl-2 vermindert den von zytoPrP induzierten Zelltod.** SH-SY5Y Zellen wurden transient mit zytoPrP bzw. EYFP und FLAG-Bcl-2 oder FLAG-Bcl2 $\Delta$ 202-219 co-transfiziert. Die Induktion von Apoptose wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des Anti-ACTIVE Capsase-3 Antiköpers detektiert und die Anzahl der apoptotischen Zellen in % quantifiziert. \*\*p < 0,001.

### 3.1.7.2 Identifizierung der toxischen Domäne von PrP

Um weitere Evidenzen für einen kausalen Zusammenhang zwischen zytoPrP-Toxizität und Bindung an Bcl-2 zu generieren, wurde die toxische Domäne von zytoPrP identifiziert. Hierfür wurden verschiedene Regionen deletiert und die generierten Mutanten auf ihr toxisches Potential hin getestet (Abb. 25A). Interessanterweise waren alle Mutanten denen der proximale Teil der C-terminalen globulären Domäne fehlt, nicht in der Lage Apoptose zu induzieren (Abb. 25B). Dieser Bereich umfasst die hydrophobe Domäne und Helix 1 von PrP. Die nicht-toxische Mutante (zyto $\Delta$ 116-173) zeigte in Western Blot Analysen gleiche Expressionsmengen wie zytoPrP (Abb. 25C). Das veränderte apoptotische Potential ist somit nicht auf Expressionsunterschiede der Mutanten zurückzuführen. Zudem konnte gezeigt werden, dass der oben identifizierte Bereich ausreichend ist um Apoptose zu induzieren. Die Expression des PrP-Peptids zyto108-173 (die AS 108-116 wurden mit aufgenommen um eine Detektion durch den 3F4-Antikörper zu ermöglichen) führte zur Induktion von Apoptose, wenn auch in geringerem Maße als das Vollängen zytoPrP-Konstrukt (Abb. 25A und B). Das geringere apoptotische Potential des zytoPrP-Peptids im Vergleich zu zytoPrP lässt sich über ein geringeres Expressionslevel des Peptids erklären (Abb. 26B unten). Aber auch eine verstärkende Wirkung anderer Bereiche von PrP bzgl. der Toxizität wäre vorstellbar.



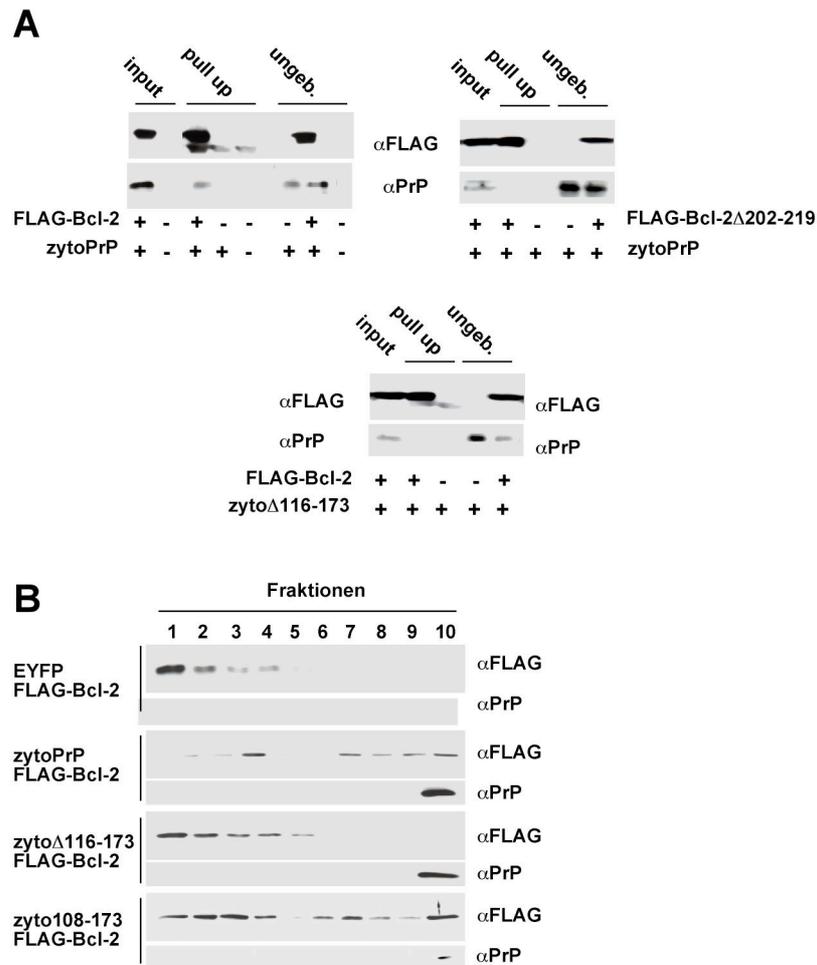
**Abbildung 25: Das toxische Potential von zytoPrP kann auf den proximalen Bereich der C-terminalen Domäne von PrP reduziert werden. (A)** Schematische Darstellung der Deletionsmutanten von zytosolischem PrP. **(B)** SH-SY5Y Zellen wurden transient mit den in (A) abgebildeten Deletionsmutanten und EYFP co-transfiziert und über einen Zeitraum von 3 Stunden in Ab- und Anwesenheit des proteasomalen Inhibitors MG132 (30  $\mu$ M) inkubiert. Apoptotische Zellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des Anti-ACTIVE Caspase-3 Antikörpers detektiert und quantifiziert. \*\* $p < 0,001$  in Bezug auf zytoPrP-exprimierende Zellen. **(C)** Vergleich des Expressionslevel von zytoPrP und zyto $\Delta$ 116-173. Die transfizierten Zellen wurden für 3 Stunden mit und ohne MG132 inkubiert, in kaltem Puffer A lysiert und PrP mittels Western Blot unter Verwendung des Anti-PrP Antikörpers 3F4 detektiert.

### 3.1.7.3 Nicht-toxische zytoPrP-Mutanten interagieren nicht mit Bcl-2

Nachdem die toxische Domäne von zytoPrP identifiziert werden konnte, stellte sich nun die Frage, ob dieser Bereich auch die Interaktion mit Bcl-2 vermittelt. Um dem nachzugehen, wurde die Interaktion zwischen zytoPrP bzw. zyto $\Delta$ 116-173 und Bcl-2 mittels *Pull-up-Co-IP* untersucht. SH-SY5Y Zellen wurden transient mit Bcl-2 und zytoPrP transfiziert. PrP wurde durch den monoklonalen Anti-PrP Antikörpers 3F4 in Zelllysaten gebunden, durch anschließende Zugabe magnetischer Anti-Maus IgG DYNA-Beads in einem erzeugten magnetischen Feld nach oben gezogen und mittels Western Blot analysiert. ZytoPrP konnte mittels dieses Ansatzes effizient isoliert und Bcl-2 co-isoliert werden (Abb. 26A, oben links). Die nicht-toxische Mutante zyto $\Delta$ 116-173 ist hingegen nicht in der Lage an Bcl-2 zu binden (Abb. 26 A unten). Diese Daten unterstützen die Vermutung, dass das toxische Potential direkt mit der Interaktion zwischen PrP und Bcl-2 zusammenhängt. Des Weiteren konnte auch Bcl-2- $\Delta$ 202-219, der die Interaktionsdomäne für PrP fehlt, mittels des Pull-up Assays nicht co-isoliert werden (Abb. 26, oben rechts).

Um weitere Hinweise zu generieren, die einen kausalen Zusammenhang zwischen der Co-Aggregation von zytoPrP und Bcl-2 und der von zytoPrP induzierten Apoptose stützen, wurde das Sedimentationsverhalten von Bcl-2 in Anwesenheit der nicht-toxischen Mutante zyto $\Delta$ 116-173 getestet. Im Gegensatz zu den toxischen Mutanten zytoPrP und dem zyto108-173-Peptid, vermittelt die Deletionsmutante zyto $\Delta$ 116-173 keine Sedimentationsveränderung von Bcl-2 (Abb. 26B,  $\alpha$ FLAG). Wichtig zu bemerken ist hier ebenfalls, dass die interne Deletion nicht zu einer Wiederherstellung der Faltung der Mutante zyto $\Delta$ 116-173 führte. Die Mutante aggregiert und liegt, wie auch zytoPrP und das Peptid zyto108-173, in der untersten Fraktion des Sucrosegradienten vor (Abb. 26B,  $\alpha$ PrP).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nicht die Aggregation von PrP *per se* zur Toxizität führt, sondern dass sowohl das Zellkompartiment in dem PrP vorliegt, sowie die interne hydrophobe Domäne von PrP, für die Induktion von Apoptose von Bedeutung sind. Zudem verstärken sich die Hinweise darauf, dass die zytoPrP-vermittelte Toxizität direkt mit der Bindung von Bcl-2 gekoppelt ist.



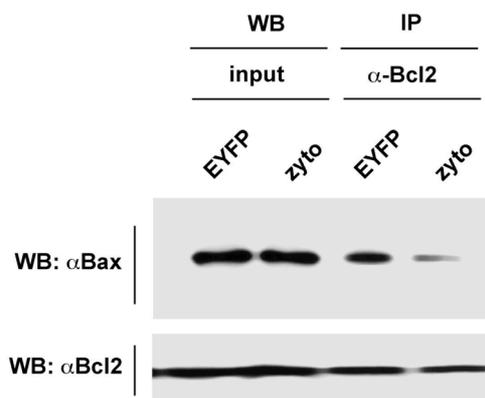
**Abbildung 26: Toxizität von zytosolischen PrP ist mit der Interaktion mit und Aggregation von Bcl-2 gekoppelt. (A)** SH-SY5Y Zellen wurden transient wie oben indiziert mit den jeweiligen Konstrukten co-transfiziert, in 0,1% Triton X-100 haltigem Puffer lysiert und mit dem Anti-FLAG M2 Antikörper inkubiert. Die Zellysate wurden einer *Pull-up* Co-IP unter Verwendung von IgG gekoppelten magnetischen beads unterzogen. Die isolierten Immunkomplexe (pull-up) sowie das ungebundene Material (ungebunden) wurden auf die Anwesenheit von zytoPrP mittels Western Blot unter Verwendung des Anti-PrP Antikörpers 3F4 untersucht. **(B)** Zellen wurden mit FLAG-Bcl-2 und den jeweiligen PrP-Konstrukten co-transfiziert. Gesamtzellysate wurden auf einen 30-40% Sucrosegradienten geladen und bei 200.000 g bei 4°C für 90 Minuten zentrifugiert. Es wurden 10 Fraktionen von oben nach unten abgenommen und die Proteine mittels TCA gefällt. PrP und FLAG-Bcl-2 wurden mittels Western Blot unter Verwendung des Anti-PrP Antikörpers 3F4 und Anti-FLAG M2 Antikörpers detektiert.

### 3.1.8 Die Interaktion von zytoPrP mit Bcl-2 interferiert mit der Bindung des pro-apoptotischen Proteins BAX an Bcl-2

Die nächste Fragestellung war, wodurch die Bindung von zytoPrP and Bcl-2 zum Zelltod führt. Einen Mechanismus über den Bcl-2 seine anti-apoptotische Funktion ausübt, stellt die Sequestrierung von pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie wie z.B. BAX dar. Eine Inhibition der Bindung solcher Proteine könnte somit indirekt zum Zelltod führen. Um einen genaueren Einblick in den toxischen Mechanismus der zytoPrP/Bcl-2-Komplexe zu gewinnen, wurde untersucht, ob die Bindung von zytoPrP an Bcl-2 dessen Interaktion mit pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie stören könnte. Dies wurde mittels Co-Immunpräzipitationsanalysen durchgeführt. SH-SY5Y-Zellen wurden mit Bcl-2 und

Leervektor oder zytoPrP co-transfiziert und Bcl-2 unter Verwendung des Anti-FLAG Antikörpers gebunden (Abb. 29, WB anti-Bcl-2). Das gewonnene Immunpellet wurde mittels Western Blot auf die Co-Isolation von endogenem BAX untersucht (Abb. 29, WB: anti-BAX). In diesen Analysen zeigte sich, dass die Menge von an Bcl-2 gebundenem BAX bei Co-Expression von zytosolischem PrP deutlich abnimmt (Abb. 29, oben IP). Um sicherzugehen, dass die Expression von zytoPrP zu keiner Verminderung der BAX-Expression führt wurde dies mittels Western Blot untersucht. Die BAX-Mengen waren in An- und Abwesenheit von zytoPrP gleich (Abb. 29, oben WB). Mittels Western Blot wurde zudem festgestellt, dass die Bcl-2-Menge, sowie die Mengen an immunpräzipitierten Bcl-2- in An- und Abwesenheit von zytoPrP gleich waren (Abb. 29, unten).

Diese ersten Untersuchungen stützen das Modell, dass zytosolisches PrP mit BAX um die Bindung an Bcl-2 konkurrieren könnte. Ob dies die Ursache für die zytoPrP/Bcl-2-Komplex vermittelte Toxizität ist, muss durch weitere Experimente verifiziert werden.



**Abbildung 29: Zytosolisches PrP interferiert mit der Bindung von Bcl-2 und BAX.** SH-SY5Y Zellen wurden transient mit EYFP oder zytoPrP und Bcl-2 co-transfiziert und für 3 Stunden mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 inkubiert (30  $\mu$ m). Bcl-2 wurde aus Gesamtzelllysaten mittels des Anti-FLAG M2 Antikörpers immunpräzipitiert (WB:  $\alpha$ Bcl-2). Das Immunpellet wurde mittels Western Blot auf die Anwesenheit von endogenem BAX untersucht (WB:  $\alpha$ BAX). Die anfänglich eingesetzten Level wurden ebenfalls im Western Blot analysiert (input, WB:  $\alpha$ BAX und WB:  $\alpha$ Bcl-2).

### 3.1.9 Zytosolische Chaperone binden zytoPrP und interferieren mit der zytoPrP/Bcl-2 induzierten Apoptose

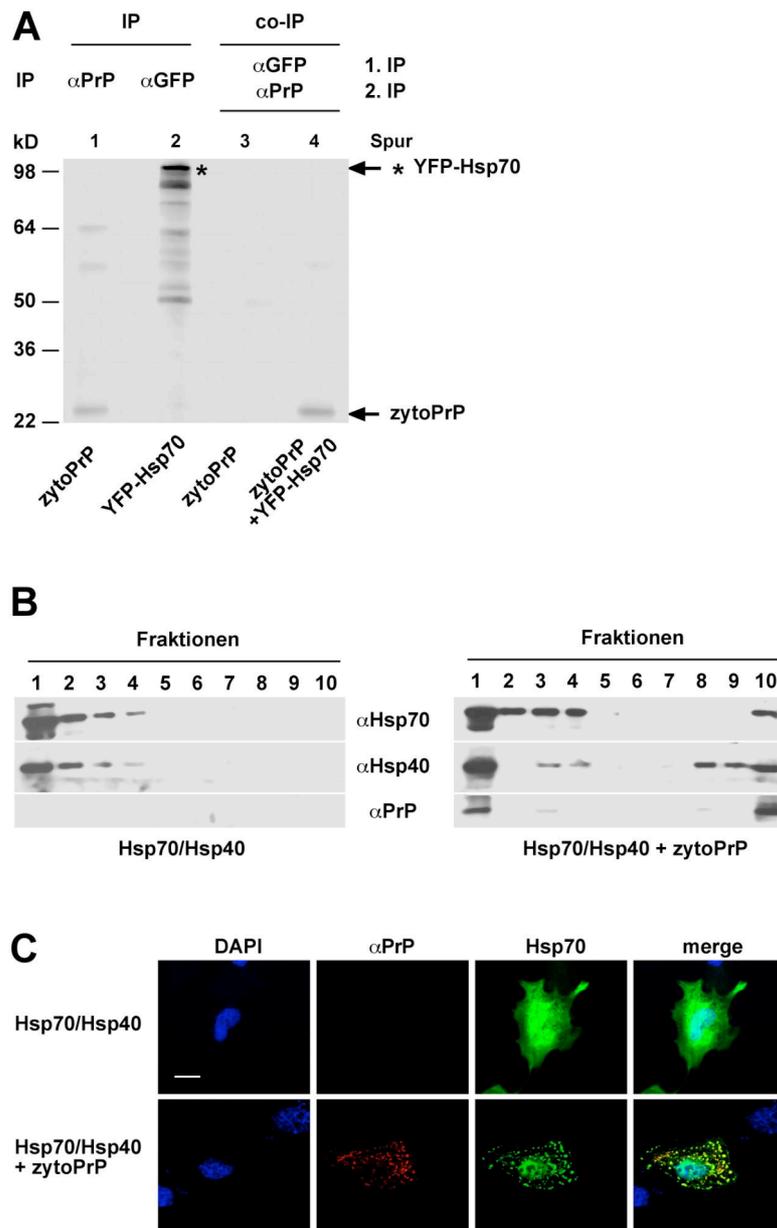
Es wird vermutet, dass die abnehmende Aktivität und / oder Kapazität von Abbaumechanismen zur Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen beiträgt. Eine Überbelastung des zellulären Chaperon-Systems könnte somit für den pathophysiologischen Prozess in Prion-Erkrankungen von Bedeutung sein. Daher sollte im Weiteren untersucht werden, ob und wie zytosolische Chaperone die Toxizität von zytoPrP modulieren könnten.

### 3.1.9.1 Zytosolische Chaperone binden zytoPrP

Die biochemische Analyse von zytoPrP ergab, dass diese Mutante nicht in der Lage ist, im zytosolischen Kompartiment eine native Konformation einzunehmen. Dies sollte zytoPrP zu einem idealen Substrat für zytosolische Chaperone machen. Tatsächlich konnte bereits die Gruppe um Susan Lindquist zeigen, dass das zytosolische Chaperon Hsp70 in der Lage ist an zytoPrP zu binden (Ma and Lindquist, 2002). Um diese Interaktion detaillierter zu untersuchen, wurde zunächst eine Co-Immunpräzipitation metabolisch-markierter Zellen durchgeführt. SH-SY5Y Zellen wurden transient mit zytoPrP und Leervektor oder zytoPrP und YFP-Hsp70 co-transfiziert. Vorangegangene Studien zeigten bereits, dass die Aktivität von Hsp70 nicht durch dessen YFP-tag beeinträchtigt wird (Kim et al., 2002). Unter leicht denaturierenden Bedingungen wurde die erste Immunpräzipitation mittels des Anti-GFP Antikörpers durchgeführt, das isolierte Immunpellet wurde anschließend in Puffer A (0,5 % Triton X-100, 0,5 % DOC in PBS) aufgekocht und in einer zweiten Immunpräzipitation zytoPrP isoliert. PrP konnte unter diesen Bedingungen nur in Anwesenheit von YFP-Hsp70 co-isoliert werden (Abb. 27A Spalte 4), was für eine Interaktion der beiden Proteine spricht.

Um weitere Evidenzen für eine Interaktion von zytoPrP mit zytosolischen Chaperonen zu generieren, wurde eine Sedimentations-Analyse durchgeführt. Die Zellen wurden transient mit Hsp70, Hsp40 und EYFP bzw. mit Hsp70, Hsp40 und zytoPrP transfiziert und für 3 Stunden mit MG132 inkubiert. Eine Interaktion der Chaperone Hsp70 und Hsp40 mit zytoPrP wurde mittels Sucrose-Stufengradienten analysiert. In Abwesenheit von PrP sind die Chaperone in den obersten Fraktionen des Gradienten zu detektieren (Abb. 27B, links). Durch die Co-Expression von zytoPrP verändert sich ihr Sedimentationscharakter und sie waren, wie zytoPrP, in der untersten Fraktion zu finden (Abb. 27B, rechts). Interessanterweise scheint es unter diesen Co-Expressionsbedingungen nicht nur zu einer Lokalisierungsveränderung der Chaperone, sondern auch von zytoPrP zu kommen. Ein signifikanter Teil von zytosolischem PrP liegt in der obersten Fraktion des Gradienten vor (Abb. 27B, rechts,  $\alpha$ PrP). Die Expression zytosolischer Chaperone scheint teilweise die Bildung von zytoPrP Aggregate verhindern zu können.

Das Co-Aggregationspotential zwischen zytoPrP und Hsp70/40 wurde weiterhin mittels indirekter Immunfluoreszenz verifiziert. Die Färbung von YFP-Hsp70 verteilt sich homogen auf das zytosolische sowie nukleäre Kompartiment der transfizierten SH-SY5Y Zellen (Abb. 27C, oben Hsp70). Unter Co-Expression von zytoPrP, welches in Aggregaten in der Zelle vorliegt (Abb. 27C, unten  $\alpha$ PrP), verändert sich auch die Verteilung von YFP-Hsp70 deutlich. Im Zytosol kommt es zur Bildung von Hsp70-Aggregaten, die mit zytoPrP co-lokalisieren (Abb. 27C, unten merge). Interessanterweise ist diese Veränderung nur im Zytosol zu beobachten, während im Kern (wo kein zytoPrP vorliegt) weiterhin eine homogene Verteilung von Hsp70 zu beobachten ist (Abb. 27C, unten merge).



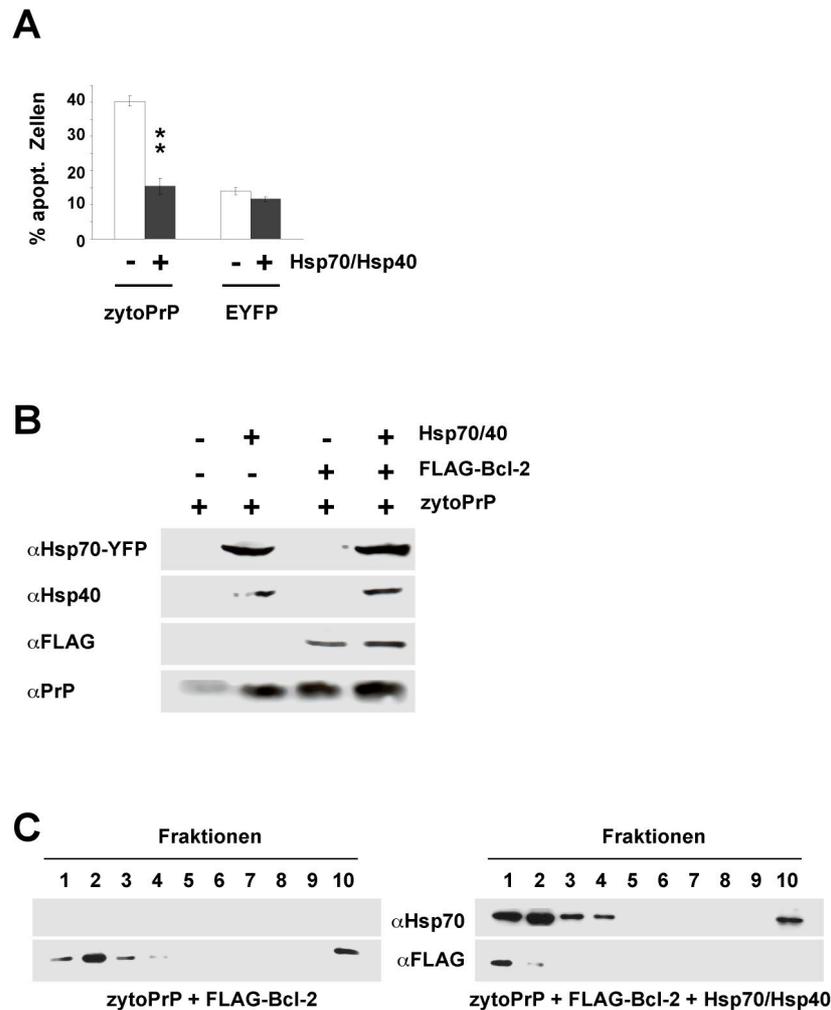
**Abbildung 27: Zytosolische Chaperone interagieren mit zytoPrP.** (A) Für die Co-Immunpräzipitationsanalysen wurden SH-SY5Y Zellen mit zytoPrP und YFP-Hsp70 (Spur 4) oder nur mit zytoPrP (Spur 3) transfiziert. Die Zellen wurden metabolisch in Anwesenheit des proteasomalen Inhibitors MG132 (30  $\mu$ M) für 45 Minuten markiert und anschließend in 0,1% Triton X-100-haltigem Puffer lysiert. Hsp70 wurde mittels des Anti-GFP Antikörpers präzipitiert (1. IP,  $\alpha$ GFP). Die so isolierten Proteine wurden einer zweiten Immunpräzipitation unter Verwendung des Anti-PrP Antikörpers 3F4 unterzogen (2. IP,  $\alpha$ PrP). Als Expressionskontrolle wurde Hsp70 sowie zytoPrP unter denaturierenden Bedingungen immunpräzipitiert (Spur 1 und 2). (B und C) Die zytosolischen Chaperone Hsp70 und Hsp40 co-aggregieren mit zytoPrP. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. (B) Gesamtzelllysate wurden auf einen 30-40% diskontinuierlichen Sucrose-Stufengradienten geladen und bei 200.000 g für 90 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die 10 Fraktionen (von oben nach unten) wurden mittels TCA präzipitiert. PrP wurde unter Verwendung des Anti-PrP Antikörpers 3F4, Hsp70 mittels Anti-GFP Antikörpers und Hsp40 mittels Anti-Hsp40 Antikörpers im Immunoblot detektiert. (C) Konfokale Immunfluoreszenzanalysen von SH-SY5Y Zellen die mit Hsp70/40 oder Hsp70/40 und zytoPrP transfiziert wurden. PrP wurde mittels Anti-PrP Antikörper 3F4 visualisiert. Kerne wurden mit DAPI angefärbt, YFP-Hsp70 ist in Grün zu sehen. Größenmarker: 15  $\mu$ m.

### **3.1.9.2 Überexpression zytosolischer Chaperone verringert die zytoPrP-induzierte Apoptose und interferiert mit der Interaktion von zytoPrP und Bcl-2**

Nachdem die Interaktion von Chaperonen mit zytoPrP gezeigt worden war, stellte sich die Frage, ob Chaperone mit dem toxischen Potential von zytoPrP interferieren können. Tatsächlich konnte im Apoptose-Assay gezeigt werden, dass die Überexpression von Hsp70 und Hsp40 zu einer Verringerung der von zytoPrP-induzierten Apoptose führte (Abb. 28A). Die hierbei gleich bleibende Menge an zytoPrP wurde mittels Western Blot verifiziert (Abb. 28B).

Abschließend wurde untersucht, ob die Expression der Chaperone einen Einfluss auf die Interaktion zwischen zytoPrP und Bcl-2 haben könnte. Hierfür wurde die Co-Sedimentation von Bcl-2 mit zytoPrP in An- und Abwesenheit von Hsp70 und 40 im Sucrose-Stufengradienten getestet. Wie schon vorher beobachtet co-sedimentiert Bcl-2 mit zytoPrP und findet sich in der untersten Fraktion des Gradienten (Abb. 23A und Abb. 28C links). Interessanterweise scheint die zytoPrP/Bcl-2 Interaktion unter Überexpression von Hsp70 und 40 aufgelöst zu werden. Bcl-2 konnte dementsprechend wieder in den oberen Fraktionen detektiert werden (Abb. 28C rechts).

Die bisher gewonnenen Daten zeigen, dass fehlgefaltetes zytosolisches PrP von Hsp70 und Hsp40 gebunden werden kann. Diese Bindung scheint die Freisetzung von Bcl-2 aus den zytoPrP/Bcl-2 Komplexen zu ermöglichen und die dadurch vermittelte zytoPrP-Toxizität zu verringern.



**Abbildung 28: Zytosolische Chaperone interferieren mit der zytoPrP-induzierten Apoptose und dessen Co-Aggregation mit Bcl-2. (A)** Die Überexpression von Hsp70/40 inhibiert die zytoPrP-induzierte Apoptose. SH-SY5Y Zellen wurden wie angegeben transfiziert und für 3 Stunden mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 (30  $\mu$ M) inkubiert. Apoptotische Zellen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des Anti-ACTIVE Caspase-3 Antikörpers visualisiert und quantifiziert. \*\* $p < 0,001$  in Vergleich zu zytoPrP exprimierenden Zellen. **(B)** Die Co-Expression von Hsp70/40 oder Bcl-2 vermindert nicht das Expressionslevel von zytoPrP. Die Zellen wurden mit den jeweiligen Konstrukten wie angegeben transfiziert und mittels Western Blot unter Verwendung der angegebenen Antikörper analysiert. **(C)** Die Überexpression von zytosolischen Chaperone verhindert die Co-Aggregation von Bcl-2 mit zytoPrP. SH-SY5Y Zellen wurden wie angegeben transfiziert und die Gesamtzelllysate mittels 30-40% Sucrose-Stufengradienten analysiert. Es wurden 10 Fraktionen abgenommen und die enthaltenen Proteine mittels TCA gefällt. Hsp70 wurde unter Verwendung des Anti-GFP Antikörpers, Bcl-2 mittels Anti-FLAG M2 Antikörpers detektiert.

## 3.2 Teil 2: Die physiologische Funktion von PrP<sup>C</sup>

Die physiologische Funktion von PrP<sup>C</sup> ist noch immer weitgehend ungeklärt. PrP *knock-out* Maus-Modelle zeigten keinen signifikanten Phänotyp. Erst Analysen in primären Neuronen-Zellkulturen deuteten darauf hin, dass PrP eine neuroprotektive Funktion vermitteln könnte. Im Laufe dieser Arbeit akkumulierten die Hinweise auf eine solche Funktion *in vivo* wie *in vitro*. So zeigten Apoplexie-Modelle in transgenen Mäusen und Ratten eine kleinere Infarktgröße nach Ischämie (McLennan et al., 2004; Mitteregger et al., 2007; Shyu et al., 2005; Spudich et al., 2005; Walz et al., 1999; Weise et al., 2004). Auch verschiedene Zellkulturstudien zeigten den Einfluss von PrP auf Signalkaskaden, vor allem in Stress-induziertem Zelltod (Flehsig and Weissmann, 2004; Roucou and LeBlanc, 2005; Weise et al., 2006; Westergard et al., 2007).

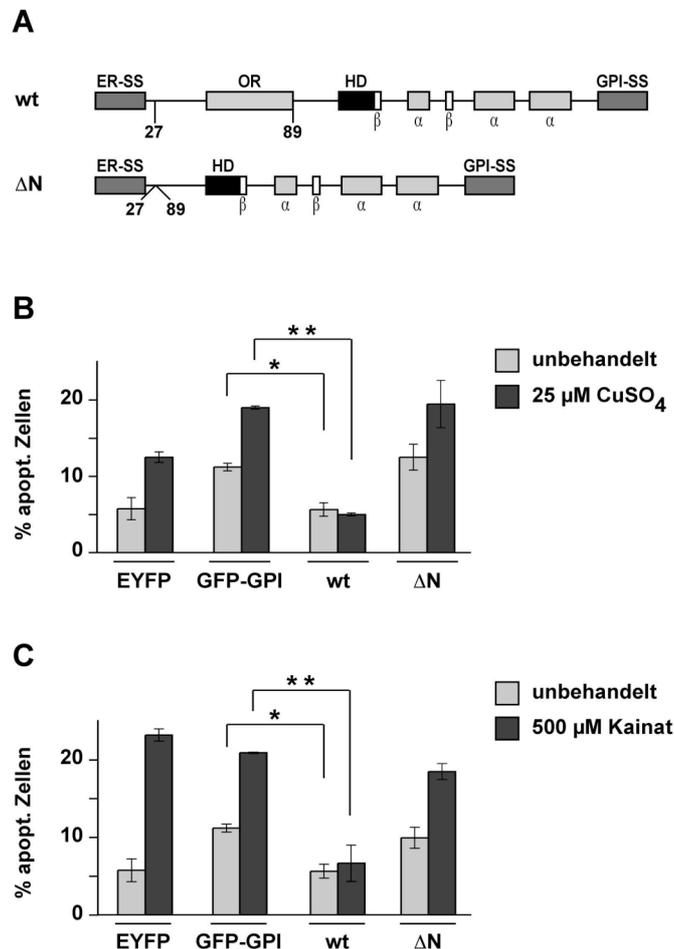
Um Einblicke in den Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung des Prion-Proteins zu gewinnen, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit eine mögliche Rolle von PrP in protektiven Signaltransduktionswegen näher analysiert.

### 3.2.1 Neuroprotektives Potential von PrP

Zunehmender oxidativer Stress gehört zu den Faktoren die besonders postmitotische Zellen während des Alterns schädigen. Es wird vermutet, dass oxidativer Stress auch in vielen neurodegenerativen Erkrankungen zum Einsetzen der Krankheit beitragen könnte. Interessanterweise konnte für das Prion-Protein mehrfach eine protektive Funktion gegenüber oxidativem Stress nachgewiesen werden (Milhavet and Lehmann, 2002). Um im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche Schutzfunktion von PrP in Stress-induziertem Zelltod in Zellkultur zu analysieren wurden Kainat und Kupfersulfat als Induktoren von oxidativem Stress gewählt. Für beide Stressoren konnte in PrP-defizienten Maus- oder Zellkulturmodellen eine erhöhte Vulnerabilität der Tiere oder Zellen beobachtet werden (Haigh and Brown, 2006; Nishimura et al., 2004; Rangel et al., 2007a).

Als Modell-System in dieser Untersuchung diente die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, welche durch extrem geringe endogene Expressionslevel von PrP<sup>C</sup> gekennzeichnet ist. Die Zellen wurden transient mit wtPrP oder als Kontrolle mit EYFP oder einem GPI-verankertem GFP (GFP-GPI) transfiziert und 24 Stunden später für 3 Stunden mit Kainat (500 µM) oder CuSO<sub>4</sub> (25 µM) inkubiert. Als weitere Kontrolle wurde die PrP-Mutante ΔN (Deletion der AS 27-89) in die Untersuchung miteinbezogen (Abb. 30A). Kürzlich konnte für diese Mutante im Mausmodell eine verminderte Stress-protektive Aktivität gezeigt werden (Mitteregger et al., 2007). Apoptotische Zellen wurden mittels des Apoptose-Assays visualisiert und quantifiziert. Die ektopische Expression von wtPrP, nicht jedoch von ΔN, erhöhte signifikant die Überlebensrate der Stress-behandelten Zellen (Abb. 30B und C).

Diese Daten zeigen, dass unser Zellkulturmodell geeignet ist, eine Stress-protective Aktivität von PrP zu analysieren. Das Modell stellt gleichzeitig die Grundlage für eine genauere mechanistische Analyse der protektiven Kapazität des Prion-Proteins, insbesondere für die Identifizierung von Domänen von PrP, die für die Stress-protective Aktivität essentiell sein könnten.



**Abbildung 30: PrP<sup>C</sup> besitzt eine protektive Kapazität.** (A) Schematische Darstellung der analysierten PrP-Mutanten. ER-SS: ER Signalsequenz, OR: Oktarepeat, HD: hydrophobe Domäne,  $\alpha$ :  $\alpha$ -helikale Region,  $\beta$ :  $\beta$ -Faltblattstruktur, GPI-SS: GPI-Signalsequenz; (B, C) PrP<sup>C</sup> vermindert Stress-induzierten Zelltod. SH-SY5Y Zellen wurden mit EYFP und GFP-GPI oder PrP $\Delta$ N co-transfiziert. Die Zellen wurden mit (B) CuSO<sub>4</sub> (25  $\mu$ M) oder (C) Kainat (500  $\mu$ M) für 3 Stunden inkubiert, fixiert, permeabilisiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Apoptotische Zellen (apopt. Zellen) wurden unter Verwendung des Anti-ACTIVE Caspase-3 Antikörpers detektiert und quantifiziert. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ .

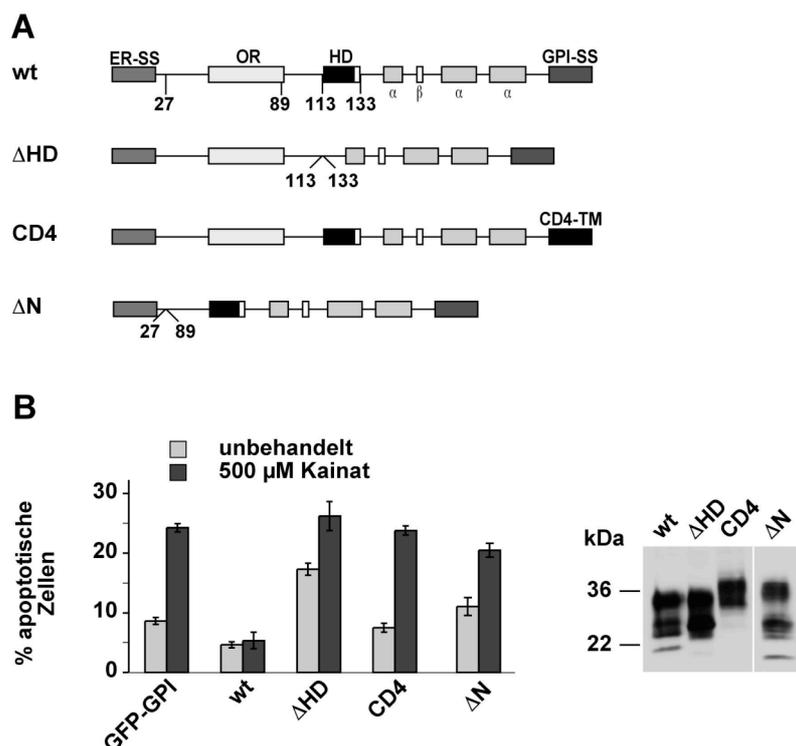
### 3.2.2 Die protektive Funktion von PrP ist abhängig von der internen hydrophoben Domäne und dem GPI-Anker

Um Domänen zu identifizieren, die für die neuroprotektive Funktion von Bedeutung sind, wurden verschiedene PrP-Mutanten generiert und deren protektive Aktivität untersucht. Von besonderem Interesse war hierbei die hydrophobe Domäne von PrP. Dieser Bereich ist die am stärksten konservierte Domäne von PrP. Um den Einfluss dieser Domäne auf die Funktion von PrP zu untersuchen, wurde die Mutante PrP $\Delta$ HD (Deletion der AS 112-135)

hergestellt. Die Mutante PrPCD4 diente der Analyse der Bedeutung der GPI-Verankerung von PrP. PrPCD4 zeichnet sich durch einen Austausch der GPI-Signalsequenz gegen die Transmembrandomäne des CD4 Rezeptors aus (Abb. 31A).

Für die folgende Domänenanalyse wurden SH-SY5Y Zellen mit wtPrP, PrP $\Delta$ HD und PrPCD4 transient transfiziert und für 3 Stunden dem Stressor Kainat (500  $\mu$ M) ausgesetzt (Abb. 31A und C). Die Apoptoseinduktion wurde mittels des Apoptose-Assays analysiert und quantifiziert. Im Gegensatz zu wtPrP konnte keine der PrP-Mutanten eine Stress-Resistenz gegenüber Kainat vermitteln (Abb. 31B). Die Mutante  $\Delta$ HD zeigte zudem nicht nur einen Verlust der protektiven Aktivität, sondern induzierte bereits in Abwesenheit von Kainat Apoptose (Abb. 31B). Diese pro-apoptotische Aktivität von PrP $\Delta$ HD wurde parallel zu dieser Studie in transgenen Mäusen beschrieben (Baumann et al., 2007; Li et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass neben der N-terminalen Domäne die interne HD sowie die GPI-Verankerung des Prion-Proteins essentiell für die protektive Funktion von PrP<sup>C</sup> sind.

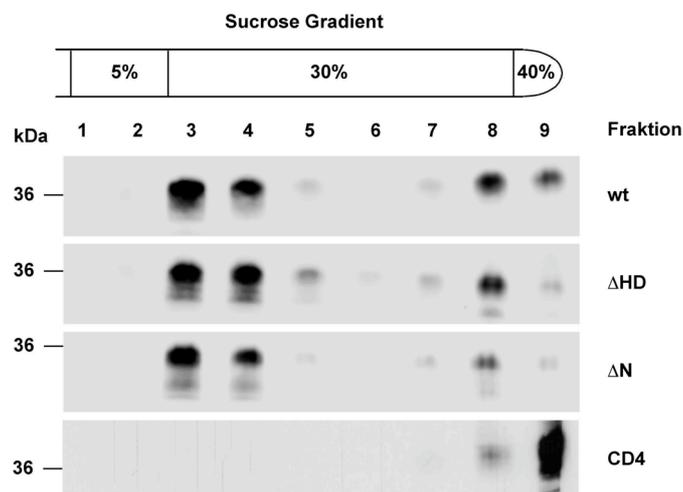


**Abbildung 31: Die interne hydrophobe Domäne und die GPI-Verankerung sind für die protektive Aktivität von PrP<sup>C</sup> notwendig.** (A) Schematische Darstellung der untersuchten PrP-Mutanten. CD4-TM: Transmembrandomäne von CD4. (B) Transfizierte SH-SY5Y Zellen wurden mit Kainat (500  $\mu$ M) für 3 Stunden inkubiert und Zelltod mittels des Apoptose-Assays unter Verwendung des Anti-ACTIVE Caspase-3 Antikörpers detektiert und quantifiziert. (C) Western Blot Analyse der wtPrP, PrP $\Delta$ HD, PrP $\Delta$ N oder PrP-CD4 exprimierenden SH-SY5Y Zellen. PrP wurde mittels des Anti-PrP Antikörper 3F4 detektiert.

### 3.2.3 Der Verlust der GPI-Signalsequenz führt zu einer veränderten Membranlokalisation

Das Prion-Protein ist ein GPI-verankertes Protein, welches in Detergenz-resistenten Membranen (DRM) zu finden ist (Tegethoff et al., 2003; Walmsley et al., 2003). Um festzustellen, ob der Verlust der protektiven Funktion mit einer veränderten Membranlokalisation korreliert, wurde die Anwesenheit der verschiedenen PrP-Mutanten in DRM mittels Sucrose-Stufengradienten-Analysen untersucht. SH-SY5Y Zellen wurden transient mit wtPrP,  $\Delta N$ ,  $\Delta HD$  und CD4 transfiziert und die Zelllysate auf 40% Sucrose eingestellt und unter einen 5-30% Stufengradienten geschichtet. Nach Ultrazentrifugation wurden von oben 9 Fraktionen abgenommen und PrP mittels Western Blot detektiert. WtPrP sowie die Mutanten  $\Delta N$  und  $\Delta HD$  sind in den oben aufgeschwommenen DRM-Fractionen zu finden (Abb. 32). Anders die Mutante CD4, sie ist durch den Austausch der GPI-Ankers gegen die CD4-Transmembrandomäne, nicht in den Detergenz-resistenten Membranen zu finden (Abb. 32, unten). Andere Ansätze zeigten jedoch, dass PrPCD4 ebenfalls auf der Zelloberfläche lokalisiert ist (Winklhofer et al., 2003). Zudem sind alle Konstrukte komplex glykosyliert (Abb. 31C und 32).

Obwohl die Lokalisation in Detergenz-resistenten Membranen durchaus eine Rolle für die protektive Funktion von PrP zu spielen scheint, zeigt die Analyse der Mutanten  $\Delta N$  und  $\Delta HD$ , dass auch interne Domänen essentiell für die protektive Funktion von PrP sind.



**Abbildung 32: Die PrP-Mutanten befinden sich in DRM an der Oberfläche von Zellen, die Verankerungsmutante CD4 ist aus diesen Mikrodomänen ausgeschlossen.** (A) N2a Zellen wurden transient mit den angegebenen Konstrukten transfiziert, in kaltem Puffer C lysiert, unter einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten geschichtet und bei 140.000 g für 18 Stunden und 4°C zentrifugiert. Die Fraktionen wurden von der Spitze des Gradienten abgenommen und die Proteine mittels TCA gefällt. PrP wurde mittels Western Blot unter Verwendung des Anti-PrP Antikörpers 3F4 detektiert.

### 3.2.4 Die hydrophobe Domäne vermittelt die Dimerisierung von PrP<sup>C</sup>

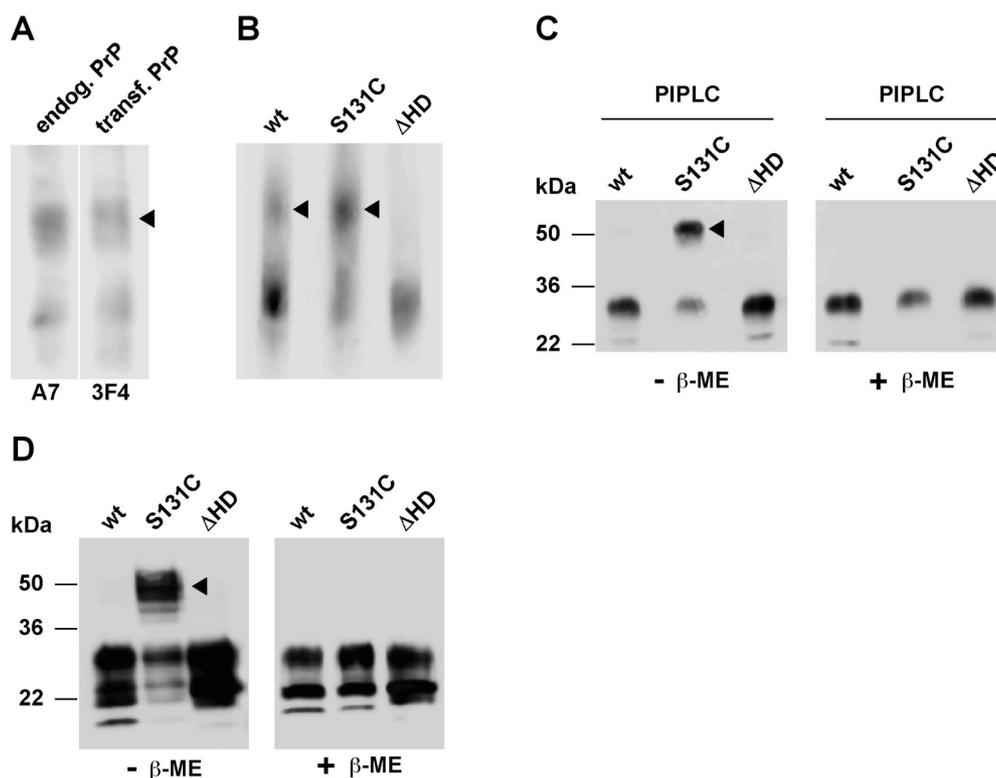
Nachdem gezeigt werden konnte, dass die hydrophobe Domäne für das Stress-protective Potential von PrP eine wichtige Rolle zu spielen scheint, sollte die Bedeutung dieser Domäne genauer analysiert werden. Da die Aktivierung von Signaltransduktionswegen durch Zelloberflächenproteine oft mit deren Dimerisierung verbunden ist, stellte sich die Frage ob PrP Homodimere bilden kann und, ob diese eine Rolle für die protective Aktivität von PrP spielen könnten. Interessanterweise schlug ein Computer-erzeugtes Dimermodell einen Bereich, der die HD umschließt, als Homodimer-Interaktionsdomäne vor (Warwicker, 2000). Um der Möglichkeit nachzugehen, dass PrP Dimere bilden kann, wurde die Mutante S131C generiert. Hierbei wurde an Position 131 ein Serin zu Cystein Austausch vorgenommen. Die Cystein-Mutation ermöglicht die Stabilisierung von sich bildenden Dimeren durch Ausbildung einer Disulfidbrücke. Diese Methode wurde bereits in zwei weiteren Studien genutzt um die Bildung von Homodimeren zu visualisieren (Cao et al., 1992; Munter et al., 2007). Die Expression von PrPS131C in SH-SY5Y Zellen zeigte, dass die Mutante in zwei Fraktionen vorliegt. Eine auf Höhe von wtPrP und eine auf der doppelten Höhe (Abb. 33D, links). Diese höher-laufende Form ist durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol auflösbar (Abb. 33D, rechts). Diese Daten deuten daraufhin, dass PrP in Form der Mutante S131C in einem Monomer/Dimer Equilibrium vorliegt.

Anschließend wurde das Dimerisierungspotential von PrP mittels nativer Gele untersucht. Hierfür wurden N2a Zellen entweder mit Leervektor oder wtPrP transfiziert. 20 Stunden später wurden endogenes oder transfiziertes PrP durch einen Phosphatidylinositol Phospholipase C (PIPLC) –Verdau von der Zelloberfläche freigesetzt, aufkonzentriert und auf nativen Gele aufgetrennt. Leider konnte PrP in Gesamtzelllysaten, wahrscheinlich aufgrund der hohen Unlöslichkeit des Prion-Proteins, nicht auf nativen Gelen aufgetrennt werden (Daten nicht gezeigt). PrP wurde mittels Western Blot unter Verwendung des Anti-PrP Antiserums A7 (endogenes PrP) bzw. des monoklonalen Anti-PrP Antikörpers 3F4 (transfiziertes PrP) visualisiert. Es zeigte sich, dass sowohl für transfiziertes als auch für endogenes PrP zwei unterschiedliche Fraktionen detektiert werden können (Abb. 33A).

Um zu untersuchen, ob es sich bei der langsam-laufenden Fraktion von PrP um ein Dimer handeln könnte, wurde die Mutante S131C als Kontrolle ebenfalls auf nativen Gelen aufgetrennt. Zeitgleich wurde der Einfluss der hydrophoben Domäne (HD) auf das Dimerisierungspotential von PrP untersucht. SH-SY5Y Zellen wurden transient mit wtPrP, S131C und  $\Delta$ HD transfiziert und einem PIPLC-Verdau unterzogen (Abb. 33C). Die von der Oberfläche freigesetzten Mutanten wurden mittels nativer Gele untersucht. Diese Analyse bestätigte, dass PrP unter den gegebenen Bedingungen als Dimer vorliegen kann (Abb. 33B, wt und S131C). Des Weiteren bot dieser Versuch die ersten Hinweise darauf, dass die HD für eine Dimerisierung von PrP notwendig sein könnte. In nativen Gelen war für die Mutante

PrP $\Delta$ HD nur eine schnell wandernde Bande detektierbar, während für wtPrP und S131C zusätzlich eine langsam-wandernde Fraktion festzustellen war (Abb. 33B). Um weitere Evidenzen zu generieren, dass es sich bei dieser langsam-laufenden Fraktion um ein Dimer handelt, wurden die PIPLC-Überstände von wtPrP und dessen Mutanten zusätzlich mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen untersucht. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen (-  $\beta$ -ME) konnte hier ebenfalls eine langsam-laufende Fraktion detektiert werden, welche unter reduzierenden Bedingungen verschwindet (Abb. 33C). Momentan durchgeführte *Crosslinking*-Experimente stützen die These, dass PrP<sup>C</sup> als Dimer vorliegen kann und dass die HD für diese Interaktion von Bedeutung ist.

Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass: 1. Endogenes PrP<sup>C</sup> dimerisieren kann, 2. das Dimer an der Zelloberfläche vorliegt und 3. die HD Domäne für die Dimerbildung wichtig ist.



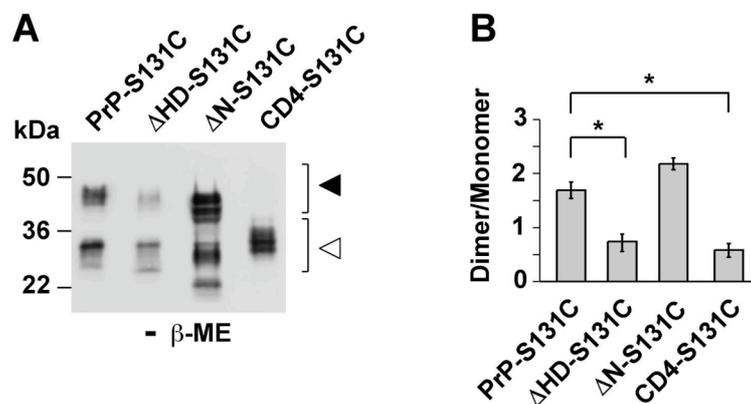
**Abbildung 33: PrP kann Homodimere bilden (A)** Mit wtPrP transfizierte und untransfizierte N2a Zellen wurden für 2 Stunden mit dem Enzym PIPLC bei 37°C inkubiert. Proteine die sich anschließend im Überstand des Zellkulturmediums befanden, wurden aufkonzentriert und mittels nativer Gele unter Verwendung des Anti-PrP Antikörpers A7 (für endogenes PrP) bzw. 3F4 (transfiziertes PrP) detektiert. **(B,C,D)** Die Dimerisierung der Mutante S131C ist abhängig von der HD und der GPI-Verankerung. **(B,C)** SH-SY5Y Zellen wurden transient transfiziert und an der Oberfläche lokalisierendes PrP mittels PIPLC abgeschnitten. Proteine im Zellkulturüberstand wurden entweder in nativen Gelen untersucht (B), oder mittels TCA gefällt und auf SDS-Gele untersucht (C). **(D)** SH-SY5Y Zellen wurden transient mit wtPrP, S131C und  $\Delta$ HD transfiziert, Gesamtzellsate erstellt und diese mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. In den SDS-PAGE Untersuchungen wurden die Proben je mit und ohne Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol analysiert. PrP wurde mittels Western Blot unter Verwendung des Anti-PrP Antikörpers 3F4 detektiert.

### 3.2.5 Dimerisierung ist für die protektive Funktion von PrP<sup>C</sup> nötig

Durch vorangegangene Experimente konnte gezeigt werden, dass PrP als Dimer vorliegen kann. Es stellte sich die Frage, ob eine Dimerisierung für die protektive Aktivität von PrP notwendig ist.

Um dieser Vermutung nachzugehen wurden verschiedene Dimerisierungsmutanten erstellt. Die Substitution S131C wurde in die Mutanten mit verringertem protektivem Potential ( $\Delta$ HD,  $\Delta$ N und CD4) eingeführt. Für die Generierung der Mutante  $\Delta$ HD-S131C musste die Deletion der HD auf die AS 112-128 limitiert werden. Die Dimerisierung der Mutanten wurde mittels Western Blot untersucht (Abb. 34A) und das Verhältnis von Dimer zu Monomer aus je 3 unabhängigen Experimenten quantitativ ermittelt. Interessanterweise zeigten die Mutanten  $\Delta$ HD-S131C und CD4-S131C, welche keine Stress-Toleranz vermitteln konnten, ein signifikant-vermindertes Dimerisierungspotential (Abb. 34B). Dahingegen zeigt die Deletion der N-terminalen Domäne keine Auswirkungen auf die Dimerbildung, auch wenn diese Deletion die Stress-protektive Aktivität von PrP beeinträchtigt (Abb. 34B).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass PrP<sup>C</sup> an der Oberfläche neuronaler Zellen in der Lage ist Dimere zu bilden. Die Dimerisierung ist abhängig von der internen hydrophoben Domäne, der C-terminalen Membranverankerung über einen GPI-Anker und möglicherweise notwendig für das protektive Potential von PrP.



**Abb. 34: Die interne HD und die GPI-Verankerung sind wichtig für die Dimerisierung von PrP.** (A) SH-SY5Y Zellen wurden transient mit den Deletionsmutanten des S131C-Konstrukts transfiziert. Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen und Western Blot unter Verwendung des Anti-PrP Antikörpers 3F4 analysiert. (B) Quantifizierung der PrP-Dimer Bildung aus 5 unterschiedlichen Versuchen. Angegeben ist das Verhältnis von Dimer zu Monomer. Pfeile indizieren die dimerisierte Formen von PrP. \*P<0,05.

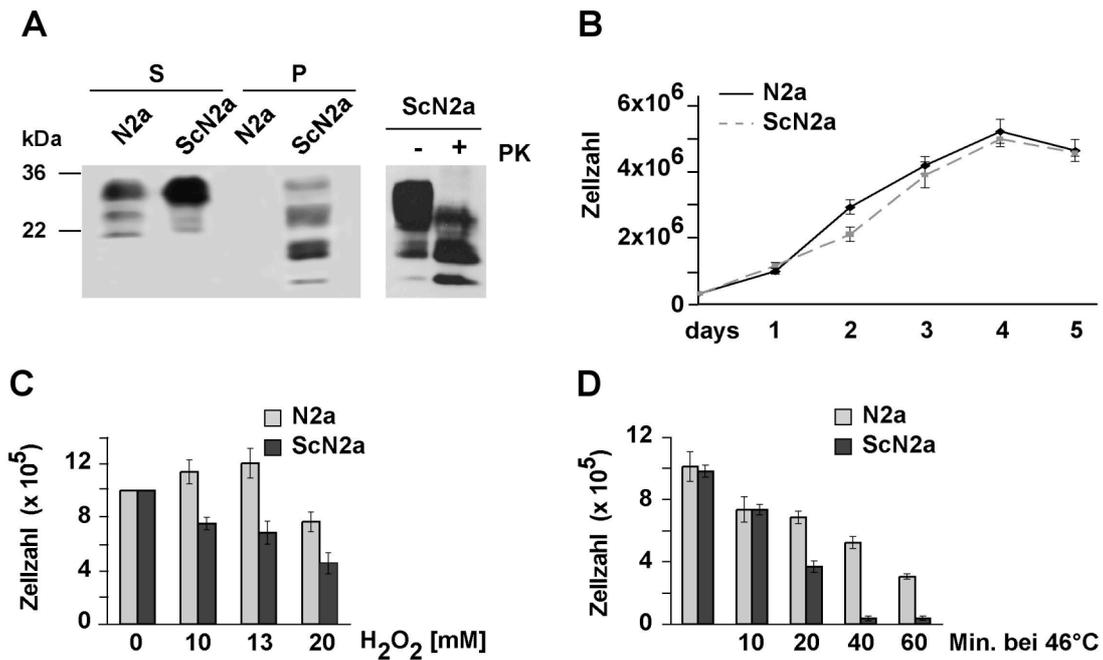
### 3.3 Teil 3: Die Funktion von PrP<sup>C</sup> für die toxische Aktivität von PrP<sup>Sc</sup>

Transgene Mausmodelle zeigten, dass die Propagierung von PrP<sup>Sc</sup> nur dann zum neuronalen Zelltod führt, wenn GPI-verankertes PrP<sup>C</sup> auf Neuronen exprimiert wird. Im Folgenden sollte versucht werden, einen genaueren Einblick in die PrP<sup>C</sup>-abhängige Toxizität von PrP<sup>Sc</sup> zu generieren.

#### 3.3.1 Scrapie-infizierte Zellen sind gegenüber Stress sensitiver

Scrapie-infizierte (Sc)N2a Zellen sind ein allgemein genutztes Zellkulturmodell zur Untersuchung der PrP<sup>Sc</sup>-Propagierung (Borchelt et al., 1992; Butler et al., 1988; Caughey and Raymond, 1991). Bemerkenswerterweise sind N2a Zellen eine der wenigen Zelllinien, die mit Gehirnhomogenat erkrankter Mäuse infiziert werden können und dabei unter optimalen Wachstumsbedingungen keinen erhöhten Zelltod zeigen (Schätzl et al., 1997). Dieses Phänomen legt nahe, dass verschiedene Adaptationsprozesse in diesen Zellen eingetreten sind. Signalwege, die für den PrP<sup>Sc</sup> vermittelten Zelltod von Bedeutung sind, könnten in diesen Zellen verändert sein (Tatzelt et al., 1995; Winklhofer et al., 2001).

Da die Propagierung von PrP<sup>Sc</sup> in ScN2a Zellen unter basalen Bedingungen keinen toxischen Effekt vermittelt, stellte sich die Frage, wie sich die PrP<sup>Sc</sup>-Propagierung auf die Überlebensrate der Zellen unter Stress auswirken könnte. Hierfür wurde zunächst mittels Western Blot verifiziert, dass die ScN2a Zellen im Vergleich zu N2a Zellen mindestens gleichviel Detergenz-lösliches PrP<sup>C</sup> (S) enthalten, zusätzlich aber Detergenz-unlösliches und Proteinase K-resistentes PrP<sup>Sc</sup> (P) propagieren (Abb. 35A). Des Weiteren wurden die Proliferationsraten der beiden Zelllinien über einen Zeitraum von 5 Tagen evaluiert (dieser Versuch wurde freundlicherweise von Frau Dr. Konstanze Winklhofer durchgeführt). Die Propagierung von PrP<sup>Sc</sup> interferiert nicht signifikant mit dem Zellwachstum der infizierten Zellen (Abb. 35B). Dieses Bild änderte sich allerdings dramatisch, wenn die infizierten Zellen verschiedenen Stressbedingungen ausgesetzt waren. Vergleich man die überlebenden Zellzahlen 24 Stunden nach oxidativen Stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oder Hitzeschock (46°C) zeigte sich, dass ScN2a Zellen deutlich sensitiver gegenüber diesen Stress-Bedingungen sind und vermehrt sterben (Abb. 35C und D, diese Versuche wurden freundlicherweise von Frau Dr. Konstanze Winklhofer durchgeführt). Aufgrund der hohen Menge an PrP<sup>C</sup> in ScN2a Zellen, kann ausgeschlossen werden, dass eine verminderte PrP<sup>C</sup>-Expression für die erhöhte Vulnerabilität verantwortlich ist (Abb. 35A).

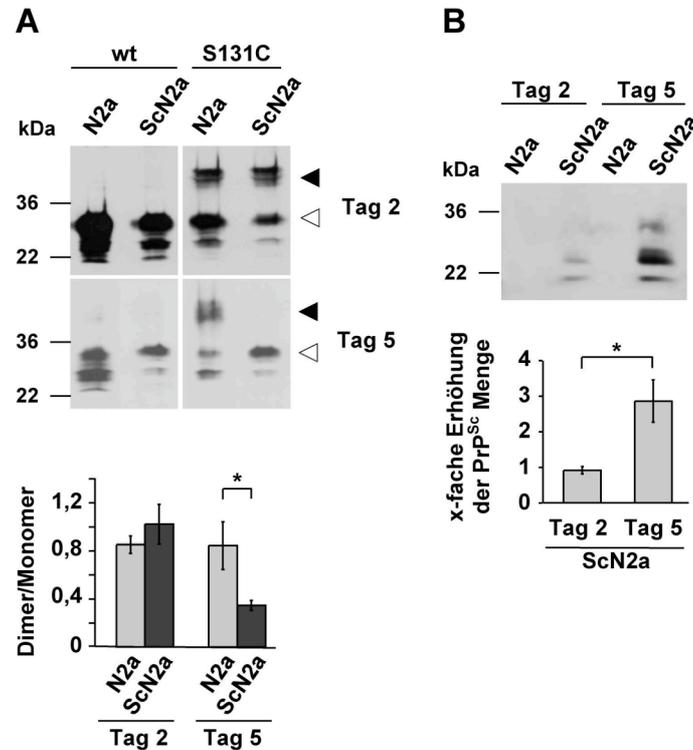


**Abbildung 35: Scrapie-propagierende N2a Zellen sind sensitiver gegenüber Stress.** (A) ScN2a und N2a Zellen wurden in gleicher Dichte ausplattiert und für 5 Tage bis zur totalen Konfluenz wachsen gelassen. Die Zellen wurden in kaltem Puffer A lysiert, zentrifugiert und PrP in der Detergenz-löslichen (S) und -unlöslichen (P) Fraktion mittels Western Blot unter Verwendung des Anti-PrP Antikörpers A7 detektiert. Es wurden je gleiche Proteinmengen geladen. Zusätzlich wurden ScN2a-Lysate einem PK-Verdau (10µg/ml 40 Minuten bei 22°C) unterzogen (A rechts). (B,C,D) Erhöhte Vulnerabilität von ScN2a Zellen gegenüber Stress. (B) Gleiche Zellzahlen von ScN2a und N2a Zellen wurden in Zellkulturschalen ausplattiert und die Zellzahlen über einen Zeitraum von 5 aufeinander folgenden Tage gezählt. (C,D) N2a und ScN2a Zellen wurden für 4 Tage kultiviert und mit aufsteigenden Mengen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 Minuten) behandelt oder mittels Hitze Schock (46°C) gestresst. 24 Stunden später wurde die Zahl an Lebendzellen bestimmt (tote Zellen wurden mittels Trypan Blau visualisiert).

### 3.3.2 Propagierung von PrP<sup>Sc</sup> interferiert mit der Dimerisierung von PrP<sup>C</sup>

Durch die Propagierung von PrP<sup>Sc</sup> kommt es zu einer erhöhten Vulnerabilität der Zellen gegenüber Stressbedingungen. Da in ScN2a Zellen die Menge an PrP<sup>C</sup> mindestens genauso hoch war wie in nicht-infizierten N2a Zellen, ist auszuschließen, dass die erhöhte Sensitivität auf eine Verringerung des PrP<sup>C</sup>-Gehaltes zurückzuführen ist. Daher stellt sich die Frage wie die Propagierung von PrP<sup>Sc</sup> zu einer erhöhten Anfälligkeit der ScN2a Zellen führt. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass PrP<sup>Sc</sup> die Funktion und oder Eigenschaften von PrP<sup>C</sup> moduliert. Wie im vorangegangenen Teil dieser Arbeit beschrieben, scheint die Bildung von PrP<sup>C</sup>-Dimeren für die Stress-protective Kapazität von PrP<sup>C</sup> von Bedeutung zu sein (siehe 2.2.5). Um den möglichen Einfluss von PrP<sup>Sc</sup> auf die Dimerisierung von PrP zu untersuchen, wurden ScN2a Zellen 1 bzw. 4 Tage nach dem Ausplattieren mit wtPrP oder S131C transfiziert und 24 Stunden später geerntet (Tag 2, bzw. Tag 5). Wie in Abb. 36B deutlich zu erkennen nimmt die relative Menge an PK-resistentem PrP<sup>Sc</sup> über den Zeitraum von Tag 2 zu Tag 5 signifikant zu. In N2a Zellen ist das Verhältnis von Dimer zu Monomer im Vergleich von jungen (Tag 2) zu alten (Tag 5) N2a Zellen gleich (Abb. 36A, S131C, N2a). Dahingegen ist in alten ScN2a Zellen eine signifikante Abnahme der Dimer-Form von S131C zu

beobachten (Abb. 36A, S131C, ScN2a). Diese Experimente zeigen, dass eine Zunahme an PrP<sup>Sc</sup>/Prionen zu einer signifikanten Abnahme von PrP-Dimeren in ScN2a Zellen führt. Ob hierfür die Inhibition der Dimerisierung an sich, oder eine erhöhte Interaktionsaffinität der PrP<sup>Sc</sup>-Form mit PrP<sup>C</sup> verantwortlich ist, muss noch untersucht werden.



**Abbildung 36: Die Propagierung von Scrapie-Prionen vermindert die Dimerisierung von PrP.** (A,B) N2a und ScN2a Zellen wurden mit Leervektor, wtPrP oder S131C einen und vier Tage nach dem ausplattieren transfiziert. Jeweils einen Tag später (entspricht Tag 2 und Tag 5) wurden die Zellen geerntet und in kaltem Puffer A lysiert. (A) Gesamtzelllysate der transfizierten N2a und ScN2a Zellen wurden mittels Western Blot analysiert und transfiziertes PrP durch den Anti-PrP Antikörpers 3F4 detektiert und quantifiziert. (B) Zelllysate wurden zentrifugiert und endogenes PrP nach Proteinase K-Verdau (10µg/ml) mittels des Anti-PrP Antikörpers A7 detektiert und quantifiziert. Die Quantifizierungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten erstellt mit \*P<0,05.

### 3.3.3 Scrapie-Prionen-induzierte Apoptose ist abhängig von der PrP<sup>C</sup>-Expression

Die vorangegangenen Experimente weisen auf eine Modulation von PrP<sup>C</sup>-Eigenschaften während der Replikation von PrP<sup>Sc</sup>/Prionen hin. Auch Mausstudien stützen die Vermutung, dass die Modifikation von PrP<sup>C</sup> gekoppelten Signalwegen zur Toxizität führen könnte. Das irreversible *Crosslinking* von PrP<sup>C</sup> *in vivo* führt zur Induktion von Apoptose (Solfrosi et al., 2004). Um weitere Evidenzen für die Kopplung von PrP<sup>C</sup>-Signalwegen und PrP<sup>Sc</sup>-vermittelter Toxizität zu generieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuer Zellkulturassay entwickelt. Dieser sollte die Untersuchung der spezifischen toxischen Aktivität von PrP<sup>Sc</sup> ermöglichen. Für diese Fragestellung stand bisher kein experimenteller Ansatz zur Verfügung. Der entwickelte Assay basiert auf der Co-Kultivierung von uninfizierten Zellen mit chronisch infizierten ScN2a Zellen (Abb. 37A) und baut auf der Beobachtung auf, dass PrP<sup>Sc</sup>/Prionen

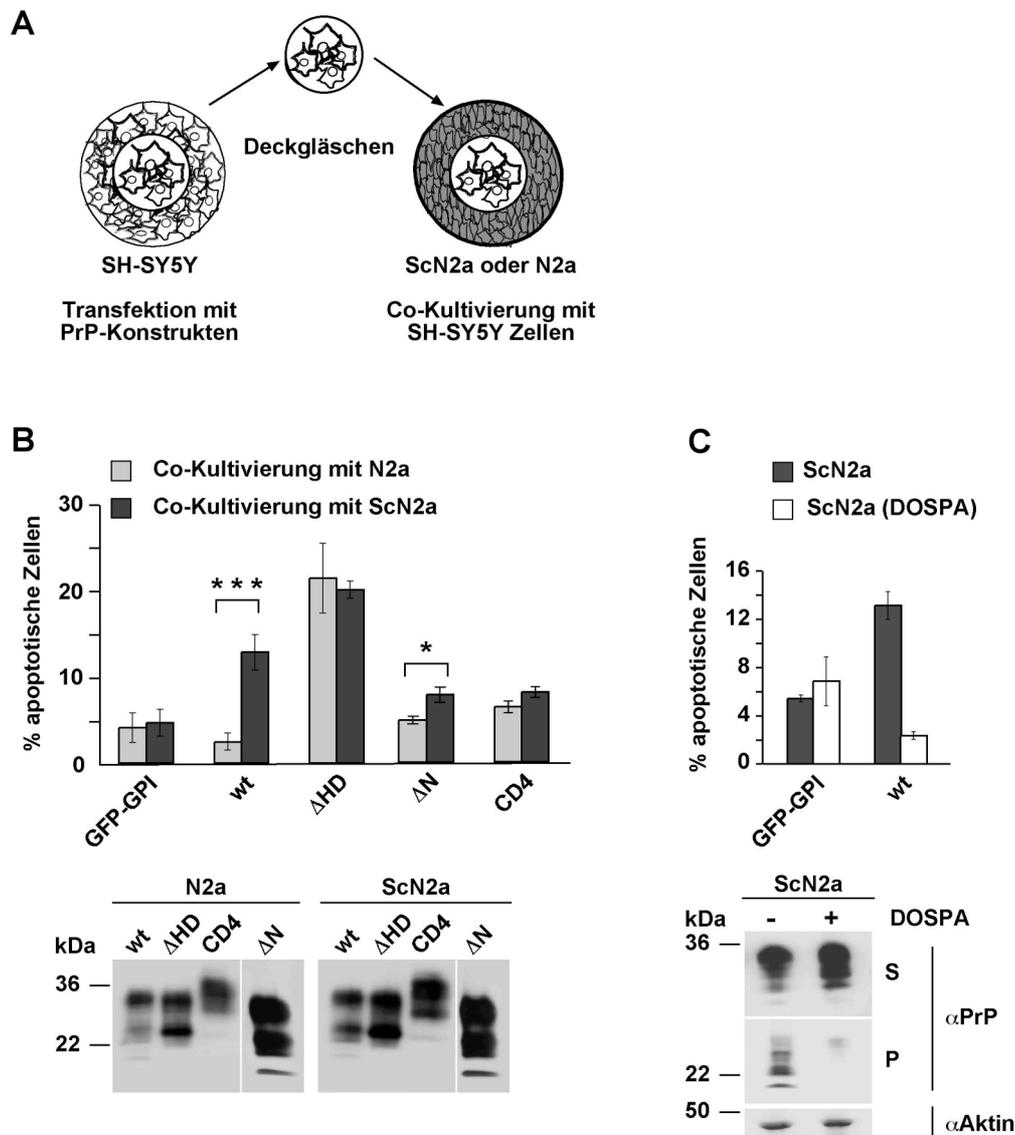
mittels Exosomen aktiv in das extrazelluläre Medium PrP-exprimierender Zellen freigesetzt wird (Alais et al., 2008; Fevrier et al., 2004; Vella et al., 2007).

Für den Co-Kultivierungs-Assay wurden SH-SY5Y Zellen auf Deckgläschen ausplattiert und transient mit GFP-GPI (Kontrolle), wtPrP oder den Protektions-defizienten Mutanten ( $\Delta$ HD,  $\Delta$ N, CD4) transfiziert. 3 Stunden nach der Transfektion wurden die Deckgläschen in Zellkulturschalen mit konfluent wachsenden N2a oder ScN2a Zellen überführt. Die Zellen wurden für 16 Stunden co-kultiviert und anschließend mittels des Apoptose-Assays und Western Blot untersucht. Obwohl wtPrP und alle Mutanten in N2a wie ScN2a Zellen annähernd gleiche Expression zeigen (Abb. 37B, unten), unterschieden sich die Konstrukte bei Untersuchung der Viabilität unter Co-Kultivierungsbedingungen dramatisch. Während GFP-GPI transfizierte Zellen ohne signifikanten Effekt in N2a und ScN2a Zellen co-kultiviert werden konnten, ist bei der Expression von wtPrP ein deutlicher Anstieg an apoptotischen Zellen bei Co-Kultivierung mit ScN2a Zellen zu beobachten (Abb. 37B, oben). Dahingegen zeigt die Expression von wtPrP keinerlei Induktion von Apoptose bei der Co-Kultivierung mit N2a Zellen (Abb. 37B, oben). Wie bereits beschrieben (siehe 2.2.2) ist die Expression der Mutante  $\Delta$ HD per se toxisch. Die Co-Kultivierung mit ScN2a Zellen führte zu keiner weiteren Erhöhung der Apoptoserate (Abb. 37B, oben). Des Weiteren zeigten auch CD4-exprimierende Zellen keine Sensitivität gegenüber PrP<sup>Sc</sup>-induzierter Apoptose (Abb. 37B, oben). Die PrP $\Delta$ N-Mutante zeigte im Co-Kultivierungs-Assay eine signifikante Erhöhung der PrP<sup>Sc</sup>-vermittelten Toxizität, wenngleich in wesentlich geringerem Maße als wtPrP (Abb. 37B, oben). Diese Ergebnisse stimmen mit in Mausstudien gewonnenen Daten überein. Transgene PrP $\Delta$ N Mäuse können mit Scrapie-Prionen infiziert werden und zeigen Neurodegeneration; das Auftreten der klinischen Symptome ist aber signifikant verzögert (Fischer et al., 1996; Flechsig et al., 2000).

Um zumindest indirekt zu zeigen, dass die Induktion von Apoptose durch PrP<sup>Sc</sup> vermittelt wird, wurden ScN2a Zellen von PrP<sup>Sc</sup> „geheilt“. Wie in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, führt die Inkubation von ScN2a Zellen mit DOSPA zu einer deutlichen Verringerung des PrP<sup>Sc</sup>-Levels in ScN2a Zellen (Winklhofer and Tatzelt, 2000). Diese Beobachtung wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Western Blot Analyse verifiziert (Abb. 37C, unten). Zusätzlich wurde die Wirkung dieser „geheilten“ Zellen im Co-Kultivierungsassay untersucht und apoptotische Zellen mittels des Apoptose-Assays detektiert und quantifiziert. Hierbei zeigte sich, dass „geheilte“ ScN2a Zellen mit geringerem PrP<sup>Sc</sup>-Gehalt keine Apoptose in wtPrP exprimierenden SH-SY5Y Zellen induzieren (Abb. 37C, oben).

Zusammenfassend lässt sich mittels dieses Assays die Aussage machen, dass Scrapie-infizierte Zellen in *trans* Apoptose induzieren können. Dieses toxische Potential ist abhängig von der Anwesenheit von PrP<sup>Sc</sup> in ScN2a Zellen sowie von der Expression von GPI-

verankertem wtPrP in den co-kultivierten Zellen. Die Toxizität scheint zudem über Integration der N-terminalen und hydrophoben Domäne vermittelt zu werden.



**Abbildung 37: Scrapie-Prionen induzieren Apoptose in PrP<sup>C</sup> exprimierenden Zellen.** (A) Schematische Darstellung des Co-Kultivierungs-Assays. SH-SY5Y Zellen wurden in Deckgläschen-haltigen Zellkulturschalen kultiviert und transfiziert. 3 Stunden nach der Transfektion wurden die Deckgläschen in ScN2a und N2a-haltige Zellkulturschalen umgesetzt und für 16 Stunden co-kultiviert. (B,C) Scrapie-Prionen induzieren Apoptose. SH-SY5Y Zellen wurden transient mit EYFP und GFP-GPI, wtPrP, PrP $\Delta$ HD, PrP-CD4 oder PrP $\Delta$ N co-transfiziert und mit N2a, ScN2a oder „geheilten“ ScN2a (DOPSA behandelten) Zellen co-kultiviert. Die Zellen wurden fixiert und apoptotische Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des Anti-ACTIVE Caspase-3 Antikörpers visualisiert und quantifiziert. \*\*\*p < 0,0005; \*p < 0,05. (B unten) Expressionslevel der PrP-Mutanten im Co-Kultivierungs-Assay. PrP aus Gesamtzelllysaten der SH-SY5Y Zellen wurde mittels des 3F4 Antikörpers detektiert. (C unten) Western Blot von DOSPA-behandelten und unbehandelten ScN2a Zellen. Endogenes PrP wurde mittels des Anti-PrP Antikörpers A7, Aktin mittels des Anti-Aktin Antikörpers detektiert.

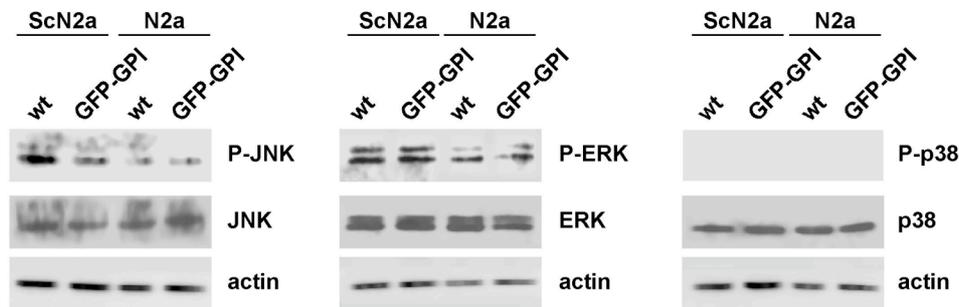
### 3.3.4 PrP<sup>Sc</sup> induzierte Apoptose in PrP<sup>C</sup> exprimierenden Zellen ist mit der Aktivierung der Jun N-terminalen Kinase gekoppelt

Die vorangegangenen Daten weisen auf einen apoptotischen Prozess hin, der durch PrP<sup>Sc</sup>, in wtPrP-exprimierenden SH-SY5Y Zellen induziert wird. Um einen genaueren Einblick in diesen Prozess zu generieren, wurden verschiedene intrazelluläre Signalwege analysiert. Hierfür wurden SH-SY5Y Zellen mit wtPrP und GFP-GPI transfiziert und mit ScN2a oder N2a Zellen für 16 Stunden co-kultiviert. Mittels Western Blot wurde auf die Aktivierung der MAPK-Signalwege JNK, p42/44 und p38 getestet. Nach der Co-Kultivierung von wtPrP-exprimierenden SH-SY5Y mit ScN2a Zellen zeigt sich eine spezifische Phosphorylierung von JNK, nicht jedoch bei Co-Kultivierung mit N2a Zellen (Abb. 38A, links). In Anwesenheit von GFP-GPI, co-kultiviert mit ScN2a Zellen, konnte ebenfalls keine Aktivierung des JNK-Wegs beobachtet werden. Unter gleichen Bedingungen konnte keine konsistente Aktivierung der Kinasen ERK oder p38 beobachtet werden, auch wenn ERK unter wtPrP-Expression und Co-Kultivierung mit ScN2a Zellen manchmal eine leichte Aktivierung zeigte (Abb. 38A). Um zu analysieren, ob die Aktivierung des JNK-Signalwegs mit dem Zelltod wtPrP-exprimierender Zellen zusammenhängt, wurde dieser Signalweg mittels des JNK Inhibitors II geblockt. WtPrP und GFP-GPI-exprimierende SH-SY5Y Zellen wurden mit ScN2a Zellen für 16 Stunden in An- oder Abwesenheit des JNK-Inhibitors II (1 µM) co-kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mittels des Apoptose-Assays analysiert und der Prozentsatz an toten Zellen ermittelt. Hierbei zeigt sich, dass es durch Inhibition des JNK Signalwegs zu einer signifikanten Verringerung der Apoptoserate führt (Abb. 38B, JNK Inhibitor II). Vergleichbare Ergebnisse brachte interessanterweise die Co-Transfektion des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 (Abb. 38B, Bcl-2). Die Wirkung des JNK-Inhibitors wurde mittels Western Blot verifiziert. WtPrP-exprimierende Zellen wurden in An- oder Abwesenheit des JNK-Inhibitors für 16 Stunden mit ScN2a Zellen co-kultiviert. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit dem JNK-Aktivator Anisomycin (5 µg/ml) für 20 Minuten behandelt wurden. Die Aktivierung des Signalwegs wurde mittels Western Blot analysiert. Der JNK-Inhibitor zeigte sowohl in der Positivkontrolle (Anisomycin) als auch für bei wtPrP-Expression einen deutlichen Rückgang der Phospho-Form von JNK (Abb. 38C).

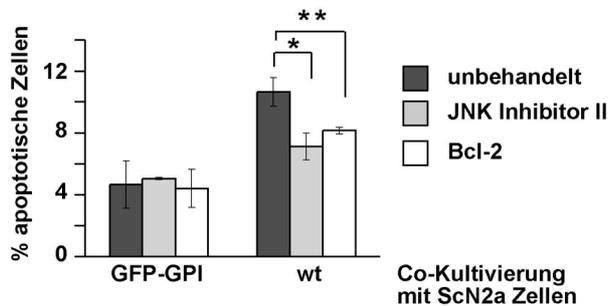
Mittels des dritten Teils dieser Arbeit konnten erste Hinweise darauf gewonnen werden, dass eine funktionell aktive Form von PrP<sup>C</sup> für die PrP<sup>Sc</sup>-vermittelte Toxizität notwendig ist. Die toxischen Effekte von PrP<sup>Sc</sup> konnten dank der Etablierung eines neuen Assays erstmals in Zellkultur analysiert werden. Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die N-terminale Domäne, die HD und die GPI-Verankerung neben der protektiven Funktion von PrP auch für die durch PrP<sup>Sc</sup>-vermittelten toxischen Effekt in PrP<sup>C</sup> essentiell sind. Zudem ergab diese Arbeit, dass mit zunehmendem PrP<sup>Sc</sup>-Gehalt die Menge an PrP<sup>C</sup>-Dimeren abnimmt.

Zusammenfassend deuten diese Daten auf eine durch PrP<sup>Sc</sup>-vermittelte Modulation eines durch PrP<sup>C</sup>-regulierten Signaltransduktionsweg hin.

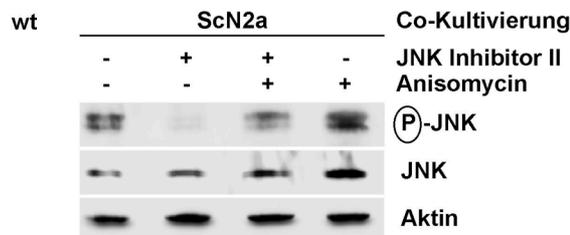
## A



## B



## C



**Abbildung 38: Scrapie-Prionen induzieren unter Aktivierung des JNK Signalwegs Apoptose. (A)** SH-SY5Y Zellen wurden mit EYFP und GFP-GPI oder wtPrP co-transfiziert und mit N2a und ScN2a Zellen für 16 Stunden co-kultiviert. SH-SY5Y Zellen wurden in kaltem P-Puffer lysiert und die un- und phosphorylierten Formen von JNK, ERK (p42/44) und p38 mittels Western Blot detektiert. Gleiche Ladungsmengen wurde mittels Anti-Aktin Färbung verifiziert. **(B)** JNK-Inhibitoren interferieren mit der durch Scrapie-Prionen-induzierten Apoptose. Transfizierte Zellen wurden mit EYFP und wtPrP oder GFP-GPI co-transfiziert und mit dem JNK Inhibitor II (16 Stunden, 1  $\mu$ M) oder nach Co-Transfektion mit Bcl-2 mittels des Apoptose-Assays analysiert. Apoptotische Zellen wurden quantifiziert. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ . **(C)** Die Funktionalität des JNK Inhibitors II wurde mittels Western Blot verifiziert. Anisomycin behandelte Zellen (5  $\mu$ g/ml, 20 Minuten) dienten hierbei als positiv Kontrolle für die JNK Aktivierung.

### 3.4 Teil 4: Strategien zur Inhibierung der PrP<sup>Sc</sup>-Propagierung

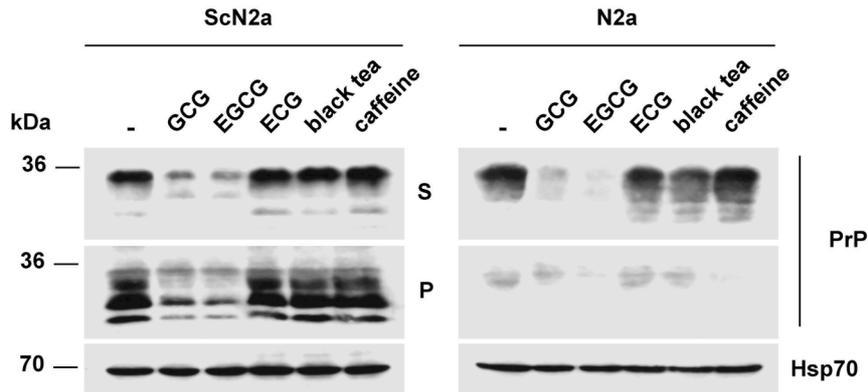
Wie bereits beschrieben handelt es sich bei Prion-Erkrankungen um Krankheiten, die unweigerlich zum Tode führen. Bisher existiert für diese Krankheit keine Behandlungsmöglichkeit.

Einer der Vorteile im Bereich der Prion-Forschung liegt in dem Vorhandensein von etablierten Zellkultur- und Tiermodellen, in denen sich die Propagierung von PrP<sup>Sc</sup> untersuchen lässt. Scrapie-infizierte (Sc)N2a Zellen sind ein ideales Modell, um Substanzen zu identifizieren, die ein mögliches therapeutisches Potential haben. Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von Polyphenolen des grünen Tees auf die PrP<sup>Sc</sup>-Propagierung im Zellkultursystem.

#### 3.4.1 Epigallocatechin-Gallat führt zur Verminderung von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>

Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Bestandteile des grünen Tees sowie von Koffein und Schwarztee-Extrakt auf die PrP<sup>Sc</sup>-Propagierung analysiert. Die Auswahl der Substanzen basierte auf *in vitro* Anti-Aggregations-Experimenten einer kollaborierenden Arbeitsgruppe (Porat et al., 2006).

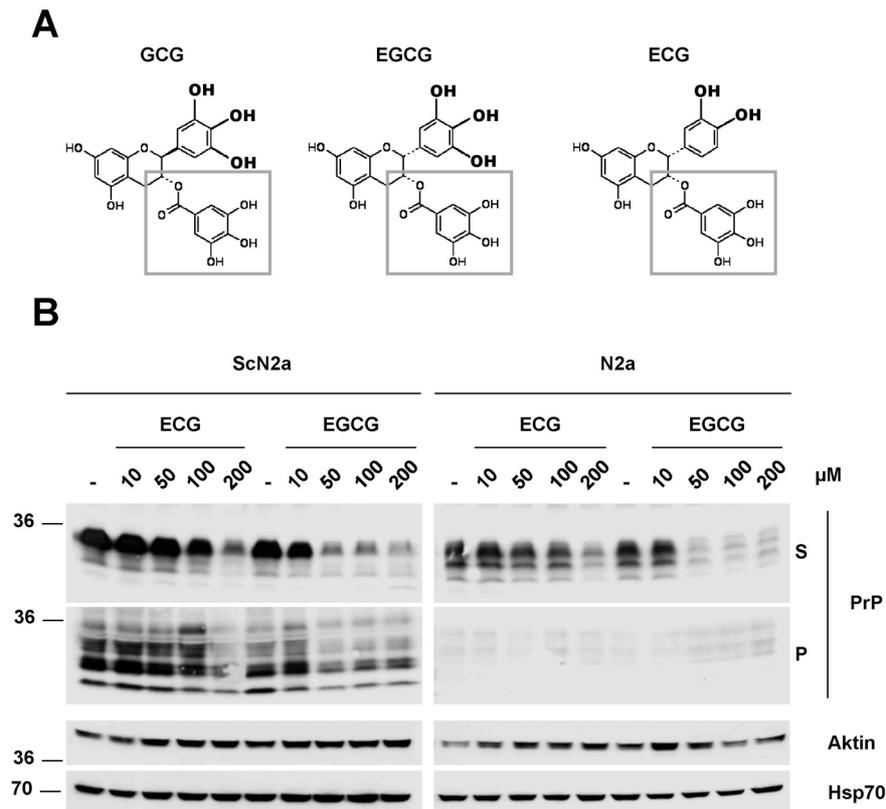
Um die Menge an vorhandenem PrP<sup>Sc</sup> zu bestimmen wurde der Detergenz-Unlöslichkeits-Assay angewendet. Er basiert auf der Tatsache, dass nach der Lyse von ScN2a Zellen in Detergenz-haltigem Puffer und anschließender Zentrifugation, die pathogene Form PrP<sup>Sc</sup> in die unlösliche (P), während die zelluläre Form PrP<sup>C</sup> in die Detergenz-lösliche (S) Fraktion segregiert. Mit diesem Assay kann sowohl die vorhandene Menge an PrP<sup>C</sup> als auch an PrP<sup>Sc</sup> detektiert werden. ScN2a und N2a Zellen wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen bis zur totalen Konfluenz wachsen gelassen. An Tag 3 und 4 wurden die Zellen für 48 Stunden mit Epigallocatechin-Gallat (EGCG), Gallocatechin-Gallat (GCG), Epicatechin-Gallat (ECG), Koffein und schwarzer Tee-Extrakt (je 100 µM) inkubiert, lysiert und abzentrifugiert. PrP wurde mittels Western Blot unter Verwendung des Anti-PrP Antiserums A7 visualisiert. Nur unter Inkubation mit EGCG, einem der Hauptbestandteile des grünen Tees, sowie dessen Stereoisomer GCG, konnte eine deutlich Abnahme des PrP<sup>Sc</sup>-Gehalts festgestellt werden (Abb. 39, links). Interessanterweise führte die Zugabe von EGCG und GCG nicht nur zu einer Reduktion des PrP<sup>Sc</sup> sondern auch des PrP<sup>C</sup>-Gehalts (Abb. 39, rechts). Die Inkubation mit ECG, Koffein oder Schwarztee-Extrakt zeigte keinerlei Mengenveränderung von PrP<sup>C</sup> oder PrP<sup>Sc</sup> (Abb. 39). Andere Proteine, wie Hsp70, wurden durch die Inkubation mit diesen Komponenten nicht beeinflusst (Abb. 39, Hsp70).



**Abbildung 39: Die Bestandteile des grünen Tees Epigallocatechin-Gallat (EGCG) und Galocatechin-Gallat (GCG) interferieren mit der Bildung von PrP<sup>Sc</sup>.** N2a und ScN2a Zellen wurden für 3 Tage kultiviert. Die Zellen wurden für weitere 48 Stunden mit Galocatechin-Gallat (GCG), Epigallocatechin-Gallat (EGCG), Epicatechin-Gallat (ECG), Extrakt aus schwarzem Tee oder Koffein (je 100  $\mu$ M) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in kaltem Puffer A lysiert und zentrifugiert. PrP in der Detergenz-löslichen (S) und unlöslichen (P) Fraktion wurden mittels Western Blot unter Verwendung des Anti-PrP Antikörpers A7 visualisiert.

### 3.4.2 Die Aktivität von EGCG ist abhängig von dessen drei Hydroxyl-Gruppen der Trihydroxyphenyl-Seitenkette

Aufgrund dieser ersten Experimente schien es, dass die Anti-PrP<sup>Sc</sup>-Aktivität von ECG geringer als von EGCG oder GCG (Abb. 39). Strukturell unterscheiden sich die Substanzen EGCG und ECG nur durch die Abwesenheit einer Hydroxyl-Gruppe an der Trihydroxyphenyl-Seitenkette (Abb. 40A). Um die Aktivität der Substanzen weiter zu untersuchen, wurden ScN2a und N2a Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen an EGCG und ECG behandelt und mittels des Detergenz-Unlöslichkeits-Assays analysiert. Wie in Abb. 40B deutlich zu beobachten ist, hat EGCG bereits bei 50  $\mu$ M eine deutliche Anti-PrP<sup>Sc</sup>-Aktivität, während für ECG erst bei einer Konzentration von 200  $\mu$ M eine Abnahme an PrP<sup>Sc</sup> zu detektieren ist. Diese Daten weisen darauf hin, dass die zusätzliche Hydroxyl-Gruppe der Trihydroxyphenyl-Seitenkette zu einer Erhöhung der Anti-PrP<sup>Sc</sup> Aktivität in EGCG führen könnte.



**Abbildung 40: EGCG und GCG zeigen unterschiedliche Aktivität.** (A) Chemische Strukturen der getesteten grünen Tee-Extrakt-Substanzen. GCG: (-)-Gallocatechin-Gallat, EGCG: (-)-Epigallocatechin-Gallat und ECG: (-)-Epicatechin-Gallat. Die Hydroxylgruppen (fett) und die Gallat-Seitenketten (Box) sind für die Anti-PrP<sup>Sc</sup>-Aktivität notwendig und graphisch hervorgehoben. (B) N2a und ScN2a Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen an ECG und EGCG inkubiert. PrP wurde wie mittels Zentrifugation in eine Detergenz-lösliche und -unlösliche Fraktion geteilt und im Immunoblot unter Verwendung des Anti-PrP Antikörpers A7 detektiert. Als Kontrolle wurden Aktin und Hsp70 ebenfalls im Western Blot visualisiert.

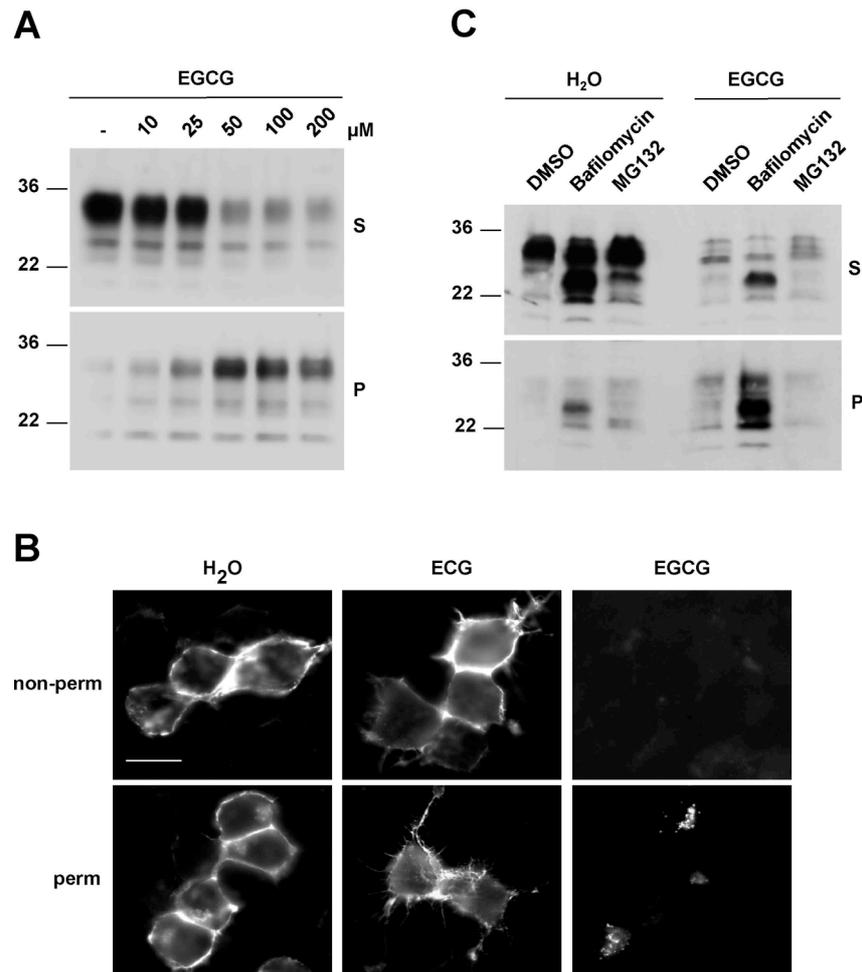
### 3.4.3 EGCG induziert die Missfaltung, Internalisierung und lysosomale Degradierung von PrP<sup>C</sup>

Die deutliche Abnahme von PrP<sup>C</sup> nach Behandlung mit EGCG führte zu der Frage, durch welchen Mechanismus dies mediert wird: EGCG könnte mit der Biogenese von PrP<sup>C</sup> interferieren oder zur Degradation von PrP<sup>C</sup> führen. Um dies zu testen, wurden N2a Zellen transient mit wtPrP transfiziert und dem Detergenz-Unlöslichkeits-Test unterzogen. Das transfizierte wtPrP trägt das humane 3F4-Epitop, das nicht in Maus-PrP enthalten ist, und kann so mittels des monoklonalen Anti-PrP Antikörpers 3F4 spezifisch detektiert werden. Nach Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen an EGCG konnte auch hier eine deutliche Abnahme von PrP in der löslichen-Fraktion (S) beobachtet werden (Abb. 41A). Überexprimiertes PrP konnte dafür zunehmend in der Detergenz-unlöslichen Fraktion (P) detektiert werden (Abb. 41A). Dieser Befund deutet darauf hin, dass PrP durch die Inkubation mit EGCG eine Detergenz-unlösliche Konformation einnimmt.

Um der Frage nachzugehen, in welchem Zellkompartiment sich PrP nach der EGCG-Behandlung befindet, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz-Analyse durchgeführt. N2a Zellen wurden transient mit wtPrP transfiziert und in An- und Abwesenheit von EGCG bzw. ECG oder Wasser für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Um PrP spezifisch an der Oberfläche der Zellen zu detektieren, wurden die Zellen mit 3% Paraformaldehyd fixiert und PrP mittels des monoklonalen Anti-PrP Antikörpers 3F4 visualisiert (non-perm). Zur Detektion von PrP im Inneren der Zellen wurden die Zellen nach der Fixierung und vor der Antikörper-Inkubation mit 0,2% Triton X-100 permeabilisiert (perm). Interessanterweise konnte nach Inkubation mit EGCG kein PrP an der Zelloberfläche detektiert werden, im Zellinneren konnten hingegen vesikuläre PrP-Färbungen festgestellt werden (Abb. 41B). Die Kontroll (Wasser)- sowie die ECG-Behandlung führten zu keiner Lokalisationsveränderung von PrP. Diese Daten deuten auf eine EGCG-vermittelte Internalisierung und mögliche Degradierung von PrP hin. Um dem Aspekt der Degradierung nachzugehen, wurden N2a Zellen mit EGCG behandelt und zeitgleich verschiedene Abbau-Wege inhibiert: die lysosomale Degradation mittels Bafilomycin A1 und der proteasomale Abbau mittels MG123 (mittlerweile konnte der lysosomale Abbau auch durch weitere lysosomale Inhibitoren gehemmt werden). Endogenes PrP konnte in EGCG behandelten Zellen detektiert werden, wenn die lysosomale Degradierung gehemmt wurde (Abb. 41C, Bafilomycin). Dahingegen konnte die Inhibition des Proteasoms PrP, in den mit EGCG behandelten Zellen, PrP nicht stabilisieren (Abb. 41C, MG123).

Diese Daten indizieren, dass die Behandlung mit EGCG dazu führt, dass PrP eine Detergenz-unlösliche Konformation annimmt, die schnell internalisiert und nachfolgend lysosomal degradiert wird. In Scrapie-infizierten Zellen interferiert der EGCG-induzierte Verlust von PrP<sup>C</sup> mit der *de novo* Synthese von PrP<sup>Sc</sup>.

Weiterführende Experimente wurden in der Gruppe um Martin Engelhard und Christian Becker durchgeführt. Sie konnten eine direkte Interaktion von EGCG mit rekombinanten PrP und eine daraus folgende Konformationsänderung von PrP mittels CD-Analyse und isothermaler Titrations-Kalometrie verifizieren (Daten nicht gezeigt). Aufbauend auf unseren Studien wird auch der therapeutische Effekt von EGCG in Scrapie-infizierten Mäusen untersucht. Diese Experimente werden momentan von der Gruppe um Michael Baier am Robert-Koch-Institut in Berlin durchgeführt.



**Abbildung 41: Die Behandlung mit EGCG führt zur lysosomalen Degradierung von PrP<sup>C</sup>.** (A, B) N2a Zellen wurden transient mit wtPrP transfiziert. (A) Die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen an EGCG und ECG inkubiert und PrP, in der Detergenz-löslichen (S) und -unlöslichen (P) Fraktion, wurde mittels Western Blot unter Verwendung des Anti-PrP Antikörpers 3F4 analysiert. (B) Die zelluläre Lokalisation von PrP nach Inkubation mit 100 μM EGCG und ECG (3 Stunden) wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz in permeabilisierten (perm) und nicht-permeabilisierten (non-perm) Zellen unter Verwendung des 3F4 Antikörpers visualisiert. (C) Nicht-infizierte N2a Zellen wurden für 5 Tage kultiviert und für 16 Stunden mit EGCG (100 μM), Bafilomycin A1 (100 nM) oder MG132 (5 μM) inkubiert. Endogenes PrP welches sich in der Detergenz-löslichen sowie -unlöslichen Fraktion befand wurde mittels Western Blot unter Verwendung des A7 Antikörpers detektiert. Größenmarker: 35μm.

## 4 Diskussion

Prion-Erkrankungen sind infektiöse, tödlich verlaufende, neurodegenerative Erkrankungen, die durch die Bildung von aberrant gefaltetem Prion-Protein (PrP) und einer äußerst progressiven Degeneration von Nervenzellen gekennzeichnet sind. Ein Großteil der Forschungsarbeiten widmete sich in den letzten Jahrzehnten der Charakterisierung der infektiösen und selbstpropagierenden Prion-Protein-Konformere (PrP<sup>Sc</sup>). Heute gilt es als gesichert, dass PrP<sup>Sc</sup> der Hauptbestandteil des infektiösen Agens darstellt. Die Identität des toxischen Agens und der Mechanismus der Neurodegeneration sind hingegen noch weitgehend ungeklärt. Dennoch geht man davon aus, dass die Bildung aberrant gefalteter PrP-Formen kausal mit der Neurodegeneration zusammenhängt. Darüber hinaus scheint PrP<sup>C</sup>, dessen physiologische Funktion nach wie vor unbekannt ist, ein essentieller Co-Faktor für die PrP<sup>Sc</sup>-induzierte Neurodegeneration zu sein.

### 4.1 PrP<sup>C</sup>, Missfaltung und Neurodegeneration

Bei klassischen Prion-Erkrankungen korreliert die Bildung und Ablagerung von PrP<sup>Sc</sup> mit der Generierung infektiöser Prionen und Neurodegeneration. Verschiedene Studien zeigen aber, dass die Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> im Gehirn nicht *per se* toxisch ist. PrP<sup>Sc</sup> induziert nur in Anwesenheit von neuronal exprimiertem und GPI-verankertem PrP<sup>C</sup> Neurodegeneration (Brandner et al., 1996; Chesebro et al., 2005; Mallucci et al., 2003). Diese Analysen bilden die Grundlage für die Vermutung, dass man mechanistisch zwischen Infektiosität und Neurotoxizität unterscheiden muss. Belegt wird dies durch Studien in transgenen Mäusen. Die Expression verschiedener PrP-Mutanten induziert Neurodegeneration, ohne dass es dabei zur Bildung von infektiösen Prionen kommt (Baumann et al., 2007; Chiesa et al., 1998; Li et al., 2007; Ma et al., 2002). *Vice versa* konnte gezeigt werden, dass die Fehlfaltung von PrP zur Bildung von infektiösen Prionen führen kann, ohne dabei eine klinische Manifestation der Krankheit zu induzieren (Chesebro et al., 2005). Die neurotoxischen PrP-Mutanten lassen sich grob in zwei Gruppen unterteilen. Zum einen scheint eine zytosolische Lokalisation für die Toxizität von PrP-Mutanten verantwortlich zu sein, zum anderen führen Veränderungen im N-terminalen, unstrukturierten Teil von PrP zum Zelltod. PrP<sup>C</sup> scheint also unter verschiedenen Bedingungen selbst ein toxisches Potential entwickeln zu können. Inwieweit dieses Potential während der Propagierung von PrP<sup>Sc</sup>/Prionen von Relevanz ist, ist nicht bekannt. Die Identifizierung der toxischen PrP-Form(en) und die Klärung, in welcher Weise PrP<sup>C</sup> selbst zur Neurotoxizität beitragen kann, ist daher von zentraler Bedeutung für die Erforschung von Prion-Erkrankungen und ist Thema dieser Arbeit.

## 4.2 Zytosolisches PrP

Ein möglicher Kandidat für das neurotoxische Agens bei Prion-Erkrankungen stellt zytosolisches PrP (zytoPrP) dar. Untersuchungen mit transgenen zytoPrP-exprimierenden Mäusen ergaben, dass bereits geringe Mengen an zytosolischem PrP zum neuronalen Zelltod führen kann (Ma et al., 2002). Die molekularen Mechanismen der zytoPrP-vermittelten Toxizität wurden in dieser Studie allerdings nicht untersucht. Der erste Teil der hier vorgelegten Arbeit gibt erstmals einen mechanistischen Einblick in diesen Prozess. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aggregation von PrP spezifisch im Zytosol zur Apoptose führt, wohingegen andere Zellkompartimente gegenüber den toxischen Effekten von missgefaltetem PrP vergleichsweise resistent zu sein scheinen. Als ein möglicher Mechanismus der zytoPrP-induzierten Apoptose konnte die Interaktion und Co-Aggregation von PrP mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2 identifiziert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Toxizität von zytosolischem PrP sowohl durch das Proteasom- als auch das Chaperon-System reguliert wird.

### 4.2.1 Pathophysiologische Relevanz von aggregiertem PrP im Zytosol

Die Bildung aberranter PrP-Formen scheint bei der Pathogenese von Prion-Erkrankungen eine zentrale Rolle zu spielen. Zwei voneinander unabhängig generierte transgene Mausmodelle zeigen aber, dass die Missfaltung des Prion-Proteins (PrP) nicht notwendigerweise zur Bildung von infektiösen Prionen und/oder Neurodegeneration führen muss. Die untersuchten PrP-Mutanten, zytosolisches PrP (zytoPrP) und PrP $\Delta$ GPI, eine Mutante mit deletierter GPI-Signalsequenz weisen ähnliche biochemische Eigenschaften auf: Beide liegen hauptsächlich unglykosyliert vor, sind teilweise PK resistent und bilden Aggregate. Die Expression dieser Mutanten in Mäusen hat jedoch entgegengesetzte Konsequenzen. Während die zytosolisch vorliegende PrP-Mutante in Mäusen zu Ataxie und neuronalem Zelltod führt (Ma et al., 2002), zeigen die PrP $\Delta$ GPI-Mäuse keine erkennbaren Krankheitszeichen (Chesebro et al., 2005). Diese Daten weisen darauf hin, dass aberrante PrP-Formen nicht unbedingt toxisch sind. Vielmehr könnte die Toxizität an eine spezifische Proteinkonformation oder ein spezifisches Zellkompartiment gekoppelt sein. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass nicht die Aggregation von PrP *per se* toxisch ist, sondern entscheidend ist, in welchem Kompartiment PrP eine missgefaltete Konformation einnimmt. PrP-Mutanten, die in verschiedenen Kompartimenten der Zelle vorliegen, aber gleiche biochemische Eigenschaften aufweisen, zeigen unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellen. Nur die Aggregation von PrP im Zytosol führt zum Zelltod. Andere Kompartimente, wie die Mitochondrien, der Nukleus und der sekretorische Weg, tolerieren die Aggregation von PrP (Abb. 19).

Die Tatsache, dass zytosolisches PrP ein deutlich höheres toxisches Potential besitzt als PrP-Aggregate in anderen Zellkompartimenten, macht es zu einem potenten Kandidaten für das toxische Agens bei Prion-Erkrankungen. Allerdings hat PrP als GPI-verankertes Zelloberflächenprotein normalerweise keinen Zugang zum Zytosol. Dies wirft die Frage auf, ob zytosolisches PrP von pathophysiologischer Relevanz sein kann. Hinweise für eine mögliche Beteiligung von zytosolischem PrP an pathophysiologischen Prozessen ergab die Untersuchung der pathogenen PrP-Mutanten W145Stop und Q160Stop. Diese Mutanten führen beim Menschen zu einer vererbaren Prion-Erkrankung, dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom. Interessanterweise zeigen zwei Studien, dass diese pathogenen Mutanten nicht effizient in das ER importiert werden können und daher eine partiell-zytosolische Lokalisation aufweisen (Heske et al., 2004), Abb. 20). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Toxizitätsanalysen verdeutlichen, dass sowohl die Mutante W145Stop als auch Q160Stop im Zellkulturmodell zytotoxisch ist. Für den toxischen Effekt sind die zytosolischen Fraktionen der Mutanten ausreichend (Abb. 21). Auch andere Untersuchungen zeigen, dass pathogene PrP-Mutanten in das Zytosol gelangen können. Die pathogene PrP-Mutante D177N fehlfaltet im ER und wird mittels ERAD ins Zytosol transportiert, wo es Aggregate bildet (Ma and Lindquist, 2001). Pathogene Mutationen in der hydrophoben Domäne von PrP führen zur Bildung einer transmembranständigen PrP-Form, die partiell zytosolisch vorliegt und in Mäusen zur Neurodegeneration führt (Hegde et al., 1998). Grundsätzlich scheint bei hereditären Prion-Erkrankungen eine Beteiligung von zytosolischem PrP am Pathomechanismus vorstellbar. Verschiedene pathogene Mutanten könnten durch Modulation des ER-Imports oder eine Fehlfaltung im ER und anschließendem retrogradem Export in das Zytosol gelangen und hier zum Zelltod führen.

Bei klassischen Prion-Erkrankungen, könnte PrP<sup>Sc</sup> zur Bildung von zytosolischem PrP beitragen. Diese Hypothese wird durch eine Studie gestützt, die zeigt, dass PrP<sup>Sc</sup> zur Modulation des ER-Imports von PrP führen und dadurch zur vermehrten Bildung der toxischen und partiell zytosolisch-vorliegenden C<sup>tm</sup>PrP-Formen beitragen kann (Hegde et al., 1998). Auch durch PrP<sup>Sc</sup>-generierter ER-Stress könnte zu einer erhöhten Bildung von zytosolischem PrP führen (Hetz et al., 2003; Orsi et al., 2006). Zytosolisches PrP stellt daher eine toxische PrP-Form dar, die in vererbaren und möglicherweise auch in spontanen und übertragbaren Prion-Erkrankungen zur neuronalen Degeneration führen könnte.

#### **4.2.2 Die zytoPrP/Bcl-2 Interaktion – ein toxischer Komplex mit möglicher pathophysiologischer Bedeutung**

Die oben erwähnten Studien zeigen, dass zytosolisches PrP in pathogenen Situationen entstehen und zum Zelltod führen kann. Die molekularen Mechanismen des zytoPrP-vermittelten Zelltods sind hingegen unbekannt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

deuten darauf hin, dass die Bildung eines zytoPrP/Bcl-2 -Komplexes dafür ursächlich sein könnte. Eine Interaktion zwischen Bcl-2 und PrP konnte bereits mittels *yeast two hybrid screen* identifiziert werden (Kurschner and Morgan, 1995). Diese Studie fand aber zum damaligen Zeitpunkt keine weitere Bedeutung, da eine Lokalisation von PrP im Zytosol nicht in Betracht gezogen wurde. Die Identifizierung verschiedener pathogener PrP-Mutanten, die im Zytosol akkumulieren, änderte dies. Im Rahmen dieser Arbeit wird erstmals gezeigt, dass die Interaktion zwischen zytosolischem PrP und Bcl-2 von pathophysiologischer Relevanz sein könnte, da nur zytosolische PrP-Formen mit toxischem Potential zur Bindung an und Co-Aggregation mit Bcl-2 führen (Abb. 25). Zytosolisch lokalisiertes PrP, das aufgrund einer Deletion der Bcl-2-Interaktionsdomäne oder infolge einer Überexpression von Hsp70/40 nicht mehr mit Bcl-2 interagiert, zeigt eine stark verringerte zytotoxische Aktivität (Abb. 25, 26 und 28).

Der Mechanismus, über den Bcl-2 seine anti-apoptotische Funktion vermittelt, ist noch nicht komplett verstanden. Ein Hauptmerkmal pro- und anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie ist ihre Fähigkeit, Homo- und Heterodimere auszubilden und so gegenseitig ihre Aktivität zu beeinflussen. Daher könnte die Interaktion von zytoPrP und Bcl-2 zu einer Inaktivierung der anti-apoptotischen Funktion von Bcl-2 führen. Diese Hypothese wird durch eine Analyse unterstützt, die zeigt, dass die Aggregation von Bcl-2 für die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), eine weitere neurodegenerative Erkrankung, von Bedeutung sein könnte: eine pathogene SOD1-Mutante bindet an und aggregiert mit Bcl-2 (Pasinelli et al., 2004). Alternativ dazu könnte aber auch die Interaktion zwischen zytoPrP und Bcl-2 zu einer Konformationsänderung von Bcl-2 führen und es in ein pro-apoptotisches Protein konvertieren. Evidenz für einen solchen Mechanismus wurde von Lin et al., generiert. Diese Arbeitsgruppe zeigt, dass die Interaktion von Bcl-2 mit Nur77 zur Bildung eines Bcl-2-„Killerproteins“ führt (Lin et al., 2004).

In Zellen ist, neben der Menge an Bcl-2, auch die Balance zwischen frei- und gebunden-vorliegenden pro-apoptotischen Proteinen ausschlaggebend für die Entscheidung zwischen Zelltod und Überleben. Die verminderte Bindung pro-apoptotischer Proteine an Bcl-2 könnte Zellen gegenüber Apoptose sensitivieren. Erste Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass die Interaktion zwischen zytoPrP und Bcl-2 zu einer Verringerung an Bcl-2/BAX Heterodimeren führt (Abb. 29). Vermutlich wird dies durch eine sterische Überlappung der Bindungsstelle für zytoPrP und BAX vermittelt. ZytoPrP benötigt für die Bindung an Bcl-2 eine Domäne, die sich direkt an die BH-2-Domäne anschließt, die wiederum für die Bindung pro-apoptotischer Proteine genutzt wird (Abb. 23). *In vitro*-Interaktionsstudien zeigen zudem, dass die BH-2-Domäne zu einer verstärkten Bindung zwischen PrP und Bcl-2 führt (Kurschner and Morgan, 1996). Die Erhöhung an frei vorliegendem BAX könnte zu dessen Multimerisierung und Induktion des intrinsischen Apoptosewegs führen (Abb. 42).



### 4.2.3 Modulation der zytoPrP-Toxizität – Implikationen für Prion-Erkrankungen

Die zytoPrP-vermittelte Toxizität kann von verschiedenen Faktoren moduliert werden: der proteasomalen Aktivität, dem Chaperon-System sowie der Menge an Bcl-2. Das Proteasom-System ist in Zellen für den Abbau kurzlebiger und missgefalteter Proteine zuständig. Auch zytosolisches PrP kann proteasomal degradiert werden, denn ohne Inhibition des Proteasoms ist zytosolisches PrP kaum zu detektieren (Abb. 18). Die Erhöhung der zytoPrP Menge nach proteasomaler Inhibition könnte die inverse Abhängigkeit der zytoPrP-Toxizität von der Aktivität des Proteasoms erklären (Abb. 19). Verschiedene Studien zeigen zudem, dass eine Inhibition der proteasomalen Aktivität zur Aktivierung pro-apoptotischer Proteine wie BAX führt (Dewson et al., 2003; Lang-Rollin et al., 2005). Eine erhöhte Menge an aktivem BAX könnte, durch die zytoPrP-vermittelte verminderte Bindung an Bcl-2, zum Zelltod führen.

Das zweite System mit Einfluss auf die Toxizität von zytoPrP sind zytosolische Chaperone. Die Überexpression von Hsp70/40 führt zur Bildung eines Hsp70/PrP-Komplexes und zu einer Verringerung der zytoPrP-induzierten Toxizität (Abb. 27 und 28). Die Ergebnisse legen nahe, dass dieser Effekt durch Bindung von zytosolischem PrP und gleichzeitiger Freisetzung von Bcl-2 aus dem zyto/Bcl-2-Komplex vermittelt wird (Abb. 28)

Könnten die beiden zellulären Qualitätskontrollsysteme – Proteasom und Chaperone - Einfluss auf die zytoPrP-Toxizität in Prion-Erkrankungen nehmen? Es ist bekannt, dass die Effizienz des Ubiquitin-Proteasom-Systems während des Alterns abnimmt (Ding et al., 2006; Hipkiss, 2006; Vernace et al., 2007). Dies könnte erklären, warum Prion-Erkrankungen erst im Alter auftreten und postmitotische Neuronen besonders sensibel auf Protein-Aggregate reagieren. Die abnehmende Aktivität des Proteasoms sowie eine daraus entstehende Überbelastung des Chaperonsystems könnte im Alter die Toxizität von zytosolischem PrP begünstigen. In diesem Zusammenhang ist außerdem von Bedeutung, dass die Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> zur Inhibition der 20S-Untereinheit des Proteasoms führen und die Akkumulation von BAX begünstigen kann (Kristiansen et al., 2007; Park et al., 2000). Somit könnte PrP<sup>Sc</sup> zu einem positiven *feedbackloop* führen, der die Toxizität von zytoPrP zusätzlich erhöht.

Im Rahmen des Alterungsprozesses kommt es ferner auch zu einer zunehmenden Lokalisation von Bcl-2 am Nukleus (Kaufmann et al., 2003). Welche Funktion Bcl-2 dort ausübt ist noch unklar. Verschiedene Studien weisen aber darauf hin, dass Nukleär-assoziiertes Bcl-2 nicht anti-apoptotisch wirkt (Kaufmann et al., 2003; Massaad et al., 2004). Die Verringerung der anti-apoptotisch aktiven Bcl-2-Menge im Alter zusammen mit der Sequestrierung durch zytoPrP könnte Zellen zusätzlich gegenüber toxischen Stimuli sensitivieren. Alternativ dazu könnte sich die Bildung des zytoPrP/Bcl-2 Komplexes auch auf autophagische Prozesse auswirken. ER-assoziiertes Bcl-2 reguliert die Induktion von

Autophagie (Hoyer-Hansen et al., 2007). Eine Dysregulation dieses Prozesses könnte durch die Interaktion zwischen Bcl-2 und zytoPrP zur Neurotoxizität beitragen. In diesem Zusammenhang erwähnenswert ist die Tatsache, dass bei Prion-Erkrankungen mehrfach eine Akkumulation von autophagischen Vesikeln beschrieben wurde (Liberski et al., 2008; Liberski et al., 2004; Sikorska, 2004; Sikorska et al., 2004). Es ist allerdings bislang nicht geklärt, ob die beobachteten autophagischen Vakuolen zur Erkrankung beitragen oder nur ein passives Produkt des Zelltods sind.

Im Kontext der aktuellen Prion-Forschung scheint die Bildung von zytoPrP/Bcl-2-Komplexen eine interessante Möglichkeit darzustellen, wie zytosolisches PrP zur Neurodegeneration führen könnte. Inwieweit dieser Mechanismus auf sporadische Prion-Erkrankungen übertragbar ist, bleibt zu untersuchen.

### 4.3 Neuroprotektion und Toxizität des Prion-Proteins

Transgene Mausmodelle zeigten, dass nicht nur zytosolisches PrP, sondern auch PrP-Mutanten, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind, ein toxisches Potential besitzen. Daher stellt sich die Frage, ob PrP<sup>Sc</sup>/Prionen PrP<sup>C</sup>-abhängige Signalwege beeinflussen und dadurch zum Zelltod führen können.

#### 4.3.1 Die physiologische Funktion von PrP

Für ein besseres Verständnis pathophysiologischer Prozesse ist es hilfreich, die Funktion der beteiligten Proteine unter physiologischen Bedingungen zu verstehen. Die Funktion von PrP<sup>C</sup> ist bis heute nicht eindeutig aufgeklärt. Die Generierung von PrP *knock-out* Mäusen erbrachte keine Erkenntnisse. Keine der PrP-defizienten Mäuse wies einen signifikanten Phänotyp auf (Büeler et al., 1992). Erst Analysen von PrP<sup>-/-</sup>-Mäusen unter Stressbedingungen lieferten Hinweise darauf, dass PrP<sup>C</sup> eine neuroprotektive Rolle zukommen könnte (McLennan et al., 2004; Mitteregger et al., 2007; Rangel et al., 2007a; Shyu et al., 2005; Spudich et al., 2005; Walz et al., 1999; Weise et al., 2004). Diese Studien sind rein deskriptiv und vermitteln keinen mechanistischen Einblick in die Funktion von PrP<sup>C</sup>. Die Etablierung eines Zellkulturmodells im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher einen genaueren Einblick in die physiologische Funktion von PrP<sup>C</sup> auf molekularer Ebene ermöglichen. Die hieraus gewonnenen Ergebnisse unterstützen die These, dass PrP<sup>C</sup> neuroprotektiv ist (Abb. 30, 31). Deletionsanalysen identifizieren drei PrP-Domänen, die für protektive Funktion von PrP<sup>C</sup> wichtig sind: die N-terminale Domäne (AS 27-89), die hydrophobe Domäne (AS 112-134) und der GPI-Anker. Zudem konnte gezeigt werden, dass PrP<sup>C</sup> in Detergenz-resistenten Membrandomänen als Dimer vorliegt und die hydrophobe Domäne Teil der Interaktionsfläche des Dimers darstellt (Abb. 33).

#### 4.3.1.1 PrP<sup>C</sup> zeigt eine protektive Aktivität

Grundsätzlich ist über den Mechanismus der Signaltransduktion GPI-verankerter Proteine wenig bekannt. Untersuchungen des GFR-alpha Proteins weisen darauf hin, dass GPI-verankerte Proteine über die Bindung von transmembranständigen Proteinen zur Aktivierung von Signalkaskaden führen können (Saarma, 2001). Auch im Falle des Prion-Proteins wird davon ausgegangen, dass PrP mit einem transmembranständigen PrP-Rezeptor interagiert und über diesen Signale vermittelt. Gemäß dem PrP/PrP-Rezeptor-Modell könnte der Verlust der protektiven Aktivität von PrP<sup>C</sup> nach Deletion der N-terminalen oder hydrophoben Domäne darauf hindeuten, dass diese Bereiche für eine Interaktion mit dem putativen PrP-Rezeptor wichtig sind. Die korrekte Bindung dieser Bereiche an den PrP-Rezeptor könnte zu einer Aktivierung des Rezeptors führen. Der N-Terminus könnte neben der Bindung des PrP-Rezeptors auch für die Aktivierung von Signalkaskaden in endozytischen Kompartimenten von Bedeutung sein. Einige Rezeptor-Komplexe aktivieren ihre spezifischen Signalwege nur nach Internalisierung (Schneider-Brachert et al., 2004). Gestützt wird diese Möglichkeit durch die Tatsache, dass der N-Terminus für die Endozytose von PrP essentiell ist (Taylor et al., 2005). Der toxische Funktionsgewinn von PrP durch Deletion der hydrophoben Domäne weist darauf hin, dass der hydrophoben Domäne von PrP eine weiter reichende Funktion als dem N-Terminus zukommt (Abb. 31). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Deletion der hydrophoben Domäne nicht zu einem vollkommenen Bindungsverlust sondern vielmehr zu einer Modulation der PrP<sup>C</sup>-Rezeptor-Bindung führt. Der so entstehende Komplex könnte das vermittelte Signal von protektiv zu toxisch umkehren. Unterstützt wird dieses Modell durch die Tatsache, dass die durch  $\Delta$ HD vermittelte Toxizität durch Co-Expression von wtPrP deutlich verringert werden kann (Daten nicht gezeigt). Auch zwei kürzlich publizierte Mausstudien konnten diese Daten bestätigen. Die Expression der  $\Delta$ CD-Mutante in Mäusen (Deletion der AS 94-134 bzw. 105-125) führte zur Neurodegeneration, welche durch die Expression von PrP<sup>C</sup> aufgehoben werden kann (Baumann et al., 2007; Li et al., 2007). Dies könnte auf eine kompetitive Bindung zwischen PrP<sup>C</sup> und PrP $\Delta$ HD an einen putativen PrP-Rezeptor (PR) hindeuten. Alternativ dazu ist aber nicht auszuschließen, dass die Toxizität der  $\Delta$ HD-Mutante durch Bindung eines anderen Rezeptors oder durch eine Konformationsänderung von PrP ausgelöst wird. Die unveränderte komplexe Glykosylierung der  $\Delta$ HD-Mutante sowie ihre korrekte Lokalisation in Detergenz-resistenten Membrandomänen sprechen eher gegen eine dramatische Fehlfaltung von PrP (Abb. 32). Der dritte Bereich, der für die neuroprotektive Aktivität von PrP<sup>C</sup> notwendig ist, ist der GPI-Anker. Der Austausch des GPI-Ankers gegen eine Transmembrandomäne führt interessanterweise zum Funktionsverlust von PrP, vermutlich durch eine veränderte zelluläre Lokalisation. Die transmembranständige PrP-Mutante, PrPCD4, liegt, im Gegensatz zu wtPrP, nicht in Detergenz-resistenten Domänen vor (Abb. 31). Detergenz-resistente

Membrandomänen sind Plattformen für die Aktivierung von Signaltransduktionswegen und Proteine, die diese Prozesse vermitteln, liegen bevorzugt in diesen Bereichen vor. Die fehlende Assoziation von PrPCD4 mit diesen Mikrodomänen könnte eine Interaktion zwischen PrP und seinem Rezeptor verhindern.

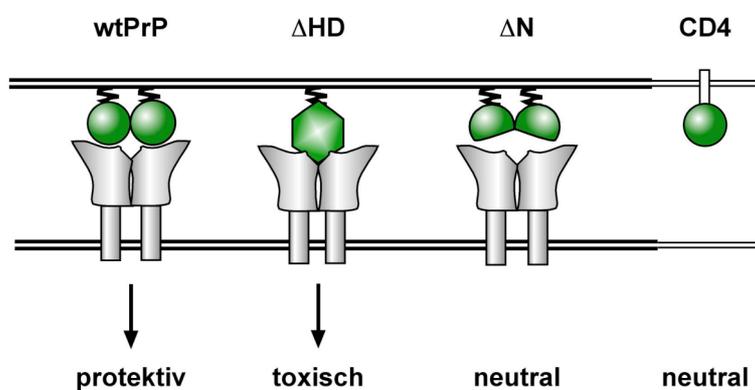
#### 4.3.1.2 Funktionelle Bedeutung der PrP<sup>C</sup>-Homodimerisierung

Die Aktivierung von Signalwegen ist oft mit der Dimerisierung oder Multimerisierung von Zelloberflächenproteinen verbunden. Eine frühere Studie zeigte, dass PrP Dimere bilden kann (Priola et al., 1995). Die von Priola *et al.*, identifizierten PrP-Dimere waren SDS-resistent und befanden sich nicht an der Zelloberfläche, sondern im ER. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass matures PrP<sup>C</sup> an der Zelloberfläche als Dimer vorliegen kann. Diese Dimere konnten durch SDS dissoziiert und durch PIPLC von der Plasmamembran freigesetzt werden, was für eine native Konformation spricht (Abb. 33). Deletionsanalysen zeigen zudem, dass für die Bildung von PrP-Dimeren die hydrophobe Domäne und die GPI-Verankerung wichtig sind (Abb. 34). Die Untersuchung eines artifiziell durch eine Disulfidbrücke induzierten PrP-Dimers, S131C, weist zudem darauf hin, dass die hydrophobe Domäne Teil des Dimer-*Interface* sein könnte (Abb. 33). Der Aminosäureaustausch Serin zu Cystein führt nur an Positionen innerhalb der hydrophoben Domäne, nicht aber im Bereich der N-terminalen Domäne zur Bildung von S-S-Dimeren (Daten nicht gezeigt). Dies führt zu der Annahme, dass der beobachtete Verlust an Dimeren der  $\Delta$ HD-Mutante durch die fehlende Interaktionsdomäne zustande kommt. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die Deletion der hydrophoben Domäne zu einer Konformationsänderung führen könnte und dadurch mit der Dimerisierung interferiert. Die korrekte Lokalisation von PrP $\Delta$ HD und deren unverändertes Glykosylierungsmuster sprechen allerdings gegen eine dramatische Fehlfaltung von PrP $\Delta$ HD (Abb. 32). Ferner liegt die hydrophobe Domäne innerhalb des unstrukturierten Bereichs von PrP. Der zweite Faktor, der für die Bildung von PrP<sup>C</sup>-Homodimeren wichtig ist, ist der GPI-Anker. Ein Austausch des GPI-Ankers gegen eine Transmembrandomäne verhindert die Bildung von PrP Dimeren (Abb. 34). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass PrPCD4 nicht in Detergenz-resistenten Membrandomänen vorliegt. Vielleicht ist für die PrP-Dimerisierung die Bindung eines, in diesen Mikrodomänen lokalisierten PrP-Rezeptor nötig. Alternativ dazu könnte die GPI-Verankerung auch eine höhere Flexibilität vermitteln als die C-terminale Transmembranverankerung.

PrP<sup>C</sup> scheint also in der Lage zu sein, Dimere zu bilden. Bisher ist aber ungeklärt, welche Funktion PrP-Homodimere erfüllen. Eine Studie postulierte, dass dimeres PrP eine Vorstufe für PrP<sup>Sc</sup> bildet und möglicherweise schädlich für Zellen ist (Goggin et al., 2007). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen deuten hingegen darauf

hin, dass PrP-Dimere die funktionell aktive und somit protektive Form von PrP darstellen könnten. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass sowohl für die Dimerisierung von PrP<sup>C</sup> als auch für dessen protektive Funktion die hydrophobe Domäne und der GPI-Anker von Bedeutung sind (Abb. 30, 31). Des Weiteren zeigen PrP-Mutanten, die keine Dimere bilden auch keine neuroprotektive Aktivität (Abb. 34). Weitere Hinweise darauf, dass die Dimerisierung von PrP zur Aktivierung von protektiven Signalwegen führen kann, wurden durch Antikörper-vermitteltes *Crosslinking* erbracht. Nur wtPrP, nicht aber die Mutanten mit Verlust der protektiven Funktion ( $\Delta N$  und CD4), zeigen nach einer Antikörper-medierten Dimerisierung eine Aktivierung des ERK-Signalwegs (Rambold et al., 2008).

Basierend auf den Daten der vorliegenden Arbeit, ist folgendes Modell vorstellbar (Abb. 43): GPI-verankertes PrP interagiert über die hydrophobe Domäne und bildet Homodimere. Diese binden an einen PrP-Rezeptor (in *cis* oder *trans*), wobei die Interaktion durch den N-terminalen Bereich und möglicherweise auch durch die hydrophobe Domäne vermittelt wird. Die Bildung dieses PrP-Dimer/PrP-Rezeptor-Komplexes führt zur Aktivierung des Rezeptors und Übertragung eines protektiven Signals. Nach Deletion der hydrophoben Domäne bindet PrP als Monomer an den PrP- oder einen alternativen Rezeptor, was zur Aktivierung toxischer Signalwege führt. Die PrP-Mutanten  $\Delta N$  und CD4 sind nicht in der Lage, mit dem Rezeptor zu interagieren und zeigen daher einen Verlust der protektiven Aktivität von PrP.



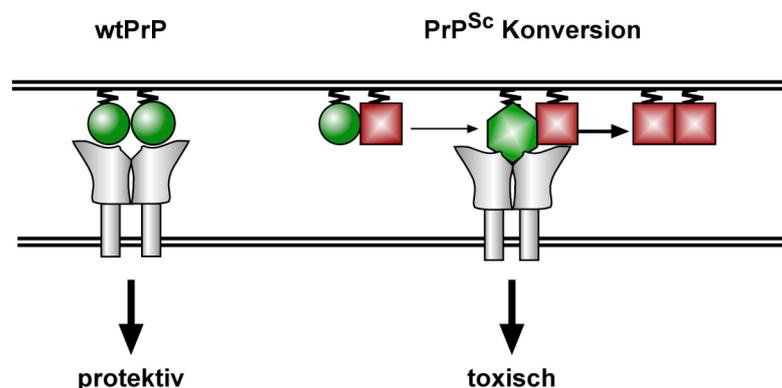
**Abbildung 43: Schematische Darstellung der Funktion von PrP in Signaltransduktionswegen.** Die Dimerisierung und Bindung von PrP (grün) an einen putativen PrP-Rezeptor (grau) führt zur Aktivierung eines protektiven Signals. Die Deletion der hydrophoben Domäne (HD) führt zu einer verminderten Dimerisierung und möglicherweise alternativen Bindung an den PrP- oder einen anderen Rezeptor. Diese Interaktion induziert toxische Signalwege. Die Deletion des N-terminalen Bereichs führt zu einer Verminderung des protektiven Potentials ohne Verlust der Dimerisierungskapazität. Die CD4-Mutante kann vermutlich aufgrund der veränderten Membranlokalisierung oder des fehlenden GPI-Ankers weder Dimere bilden noch protektive Signaltransduktionswege aktivieren.

#### 4.3.2 Funktionell aktives PrP<sup>C</sup> ist für die PrP<sup>Sc</sup>/Prionen-vermittelte Toxizität notwendig

Verschiedene Analysen in Mäusen deuten darauf hin, dass PrP<sup>Sc</sup> nur dann toxisch ist, wenn GPI-verankertes PrP in Neuronen exprimiert wird (Brandner et al., 1996; Büeler et al., 1994; Chesebro et al., 2005; Mallucci et al., 2003). Diese Studien waren bisher allerdings rein deskriptiv und konnten keinen mechanistischen Einblick in die Toxizität von PrP<sup>Sc</sup> vermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, einen Assay zu etablieren, der die Untersuchung der PrP<sup>Sc</sup>-vermittelten Toxizität in Zellkultur ermöglicht. Mit Hilfe des Co-Kultivierungs-Assay konnten zunächst die Daten aus den Mausstudien reproduziert werden: PrP<sup>Sc</sup> ist nur für Zellen toxisch, die GPI-verankertes PrP<sup>C</sup> exprimierten (Abb. 37). Des Weiteren gelang es, drei PrP-Domänen zu identifizieren, die für die PrP<sup>Sc</sup>-vermittelte Toxizität notwendig sind: die N-terminale Domäne, die hydrophobe Domäne und die GPI-Verankerung von PrP<sup>C</sup> (Abb. 37). Interessanterweise sind genau diese PrP-Domänen auch für die neuroprotektive Aktivität von PrP<sup>C</sup> essentiell. Die N-terminale Domäne ist für die toxischen Effekte von PrP<sup>Sc</sup> von Bedeutung, der Verlust dieser Domäne führt aber nicht zur vollständigen Inhibition des PrP<sup>Sc</sup>/Prionen-induzierten Zelltods (Abb. 37). Die Relevanz dieser Domäne wird durch weitere Studien gestützt. Mäuse mit entsprechender Deletion in der N-terminalen Domäne sterben, zeigen aber einen deutlich verlangsamten pathologischen Prozess (Fischer et al., 1996; Flechsig et al., 2000). Der Verlust der GPI-Verankerung und der hydrophoben Domäne verhindert die durch PrP<sup>Sc</sup>-induzierte Toxizität vollständig (Abb. 37). Zusätzliche Untersuchungen zeigen, dass die Propagierung von PrP<sup>Sc</sup> auch zu einer Verminderung von PrP<sup>C</sup>-Dimeren führt (Abb. 36). Dies deutet daraufhin, dass PrP<sup>Sc</sup> eine funktionell aktive Form von PrP benötigt um Apoptose zu induzieren.

Wie könnte man sich den PrP<sup>C</sup>-vermittelten Mechanismus der PrP<sup>Sc</sup>-Toxizität vorstellen? Grundsätzlich ist PrP<sup>C</sup> für die Konversion zu PrP<sup>Sc</sup> nötig. Dies führt zur Bildung von großen, heterogenen Aggregaten, die aus dimeren und/oder oligomeren PrP<sup>Sc</sup>-Vorläufer-Formen gebildet werden könnten. Eine Studie zeigte, dass PrP-Oligomere, bestehend aus 14-28-PrP Molekülen, die höchste Infektiosität vermitteln (Silveira et al., 2005). Möglicherweise erhöhen spezifische PrP-Formen auch die Bildung toxischer PrP-Konformere. Die Propagierung von PrP<sup>Sc</sup> führte in unseren Analysen zu einer verminderten Bildung von PrP<sup>C</sup>-Dimeren. Dies führt zu der Vermutung, dass funktionell aktives und als Dimer vorliegendes PrP<sup>C</sup> preferentiell zu PrP<sup>Sc</sup> umgewandelt wird und deshalb für die Toxizität von PrP<sup>Sc</sup> notwendig ist. Gegen diese Hypothese sprechen aber sowohl in unserem Labor durchgeführte Konversionsexperimente als auch eine weitere Studie, die zeigt, dass lösliches, dimerisiertes PrP zwar hochaffin an PrP<sup>Sc</sup> bindet aber nicht umgewandelt werden kann (Meier et al., 2003; Rambold et al., 2008). Die vermehrte Bildung von PrP<sup>Sc</sup> scheint für die PrP<sup>Sc</sup>-induzierte Toxizität nicht ursächlich zu sein. Gestützt wird dies von so genannten subklinischen Prion-Erkrankungen. Diese

zeichnen sich durch hohe Mengen von PrP<sup>Sc</sup> aber ausbleibenden oder extrem schwachen klinischen Symptome aus (Chiesa and Harris, 2001). Wahrscheinlicher ist daher, dass bei der Interaktion zwischen PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> eine toxische PrP-Form entsteht (Abb. 44). Diese könnte entweder ein Zwischenprodukt bei der Bildung von PrP<sup>Sc</sup> sein oder eine alternative Form darstellen, die nicht weiter zu PrP<sup>Sc</sup> umgewandelt wird. Vorstellbar wäre hier eine PrP-Form, die eine veränderte Faltung in der hydrophoben Domäne aufweist, welche ähnlich, wie die  $\Delta$ HD-Mutante, zu einer Modulation der PrP<sup>C</sup>/PrP-Rezeptor-Interaktion führen könnte. Diese Hypothese wird von Studien unterstützt, die zeigen, dass der hydrophobe Bereich essentiell für Bindung von PrP<sup>Sc</sup> an PrP<sup>C</sup> und die Konversion zu PrP<sup>Sc</sup> ist (Holscher et al., 1998; Norstrom and Mastrianni, 2005). In einem alternativen Modell könnte die Interaktion von PrP<sup>C</sup> mit PrP<sup>Sc</sup> zu einer Überstimulation des PrP<sup>C</sup> Signalwegs führen. Gestützt wird dieses Modell durch eine kürzlich publizierte Analyse die zeigt, dass PrP-Mutanten zu einer Interaktion mit PrP<sup>C</sup> und erhöhten Lokalisation in Detergenz-resistenten Membrandomänen führen (Schiff et al., 2008). Die Identifizierung der toxischen PrP-Form und deren toxische Mechanismen wären für ein besseres Verständnis der neurodegenerativen Prozesse von Bedeutung.



**Abbildung 44: Vermittlung von Neurotoxizität während der Propagierung von PrP<sup>Sc</sup>.** Modell zur PrP<sup>Sc</sup>-vermittelten Toxizität. Dieses Modell geht davon aus, dass PrP<sup>C</sup>-Dimere (grün) an einen PrP-Rezeptor (grau) binden und dies zur Aktivierung protektiver Signalkaskaden führt. Während des Konversionsprozesses zu PrP<sup>Sc</sup> (rot) könnte es zu Generierung einer toxischen PrP-Form (grünes Sechseck) kommen. Diese Form könnte entweder ein Zwischen- oder Seitenprodukt im Konversionsprozess darstellen. Die Bindung dieser toxischen PrP-Form könnte nach Bindung an den PrP- oder alternativen Rezeptor zur Aktivierung toxischer Signalwege führen.

#### 4.3.3 Degradierung von PrP<sup>C</sup> - Nutzung dieses Mechanismus als Therapieform?

Der letzte Teil dieser Arbeit zeigte, dass EGCG, eine Bestandteil aus grünem Tee zu einer Konformationsänderung und anschließender Degradierung von PrP<sup>C</sup> führt (Abb. 41). Als Konsequenz daraus steht in Scrapie-infizierten Zellen kein PrP<sup>C</sup> für die Neubildung von PrP<sup>Sc</sup> zur Verfügung (Abb. 39). Somit könnte die Behandlung mit EGCG eine mögliche therapeutische Strategie darstellen. Dennoch bleibt es aufgrund der hohen benötigten Wirkkonzentration in Zellkultur (50-100  $\mu$ M) fraglich, ob eine solche Substanz trotz ihrer

guten Blut-Hirnschranken-Gängigkeit als Anti-Prion-Mittel eingesetzt werden kann. Diesbezügliche Analysen in Mäusen werden momentan durchgeführt.

Die Deletion der Vorläufer-Form von PrP<sup>Sc</sup>, PrP<sup>C</sup>, scheint bisher der einzig erfolgreiche Ansatz zu sein, Prion-Erkrankungen im Mausmodell zu verhindern (Mallucci et al., 2003). PrP<sup>C</sup> als Ziel von therapeutischen Ansätzen könnte also durchaus von Bedeutung sein. Hierbei sollte allerdings beachtet werden, dass noch immer nicht bekannt ist welche Funktion PrP<sup>C</sup> selbst ausübt. Die Depletion eines möglicherweise neuroprotektiven Proteins könnte über die Zeit negative Folgen haben.

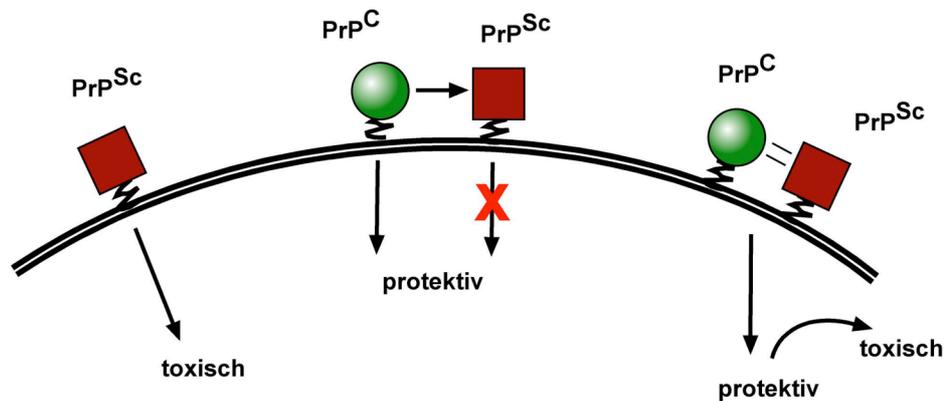
#### 4.4 Implikationen für Prion-Erkrankungen

Grundlegend lassen sich bezüglich der PrP<sup>Sc</sup>/Prionen-induzierte Neurotoxizität drei Szenarien unterscheiden: ein toxischer Funktionsgewinn von PrP<sup>Sc</sup>, ein Funktionsverlust von PrP<sup>C</sup> oder die Bildung alternativer PrP-Formen die toxisch sind (Abb. 45).

Normalerweise geht man bei dominant vererbten neurodegenerativen Erkrankungen, wie Prion-Erkrankungen oder auch der Alzheimer-, Huntington- oder Parkinson- Krankheit, von einem toxischen Funktionsgewinn aus. Hierfür spricht, dass APP oder PrP *knock-out* Mäuse keinen auffälligen Phänotyp zeigen. Es wird angenommen, dass Proteinaggregate oder deren Vorläufer, die im Gehirn akkumulieren, eine neurotoxische Aktivität besitzen. Dennoch zeigen verschiedene Studien, dass PrP<sup>Sc</sup> nur in Neuronen Zelltod induziert, wenn diese GPI-verankertes PrP<sup>C</sup> exprimieren. Diese Daten weisen eher auf einen Funktionsverlust oder eine Funktionsmodulation von PrP<sup>C</sup> während der Prion-Infektion hin. Der fehlende Phänotyp von PrP-*knock-out* Mäusen deutet an, dass primär nicht der Verlust der PrP-Funktion für die Induktion von Neurodegeneration verantwortlich ist. Die physiologische Aktivität von PrP, welche unter normalen Bedingungen nicht essentiell ist, könnte allerdings unter pathogenen Umständen durch erhöhten zellulären Stress zur Neurotoxizität beitragen. Das Modell, dass PrP<sup>Sc</sup> zu einer toxischen Modulation der PrP<sup>C</sup>-Funktion führt, scheint daher sehr plausibel. Während des Konversions-Prozesses könnte eine alternative toxische PrP-Form entstehen. Diese könnte entweder ein Intermediat während der PrP<sup>C</sup>- zur PrP<sup>Sc</sup>-Konversion darstellen oder ein Produkt eines Nebenwegs sein. Ein möglicher Kandidat für eine solche toxische Form ist zytosolisches PrP. Alternativ dazu könnte auch die Aktivität eines PrP<sup>C</sup> Signaltransduktionswegs durch die Bindung von PrP<sup>Sc</sup> (oder anderen Zwischenformen) verändert werden, wodurch ein toxisches Signal anstelle eines protektiven vermittelt wird. PrP<sup>Sc</sup> könnte diesen Effekt durch *Crosslinking* von PrP<sup>C</sup> an der Zelloberfläche vermitteln, von dem gezeigt werden konnte, dass es *in vivo* zur Induktion von Apoptose führt (Solfrosi et al., 2004). PrP<sup>Sc</sup> könnte auch durch die Bindung an spezifische funktionelle PrP-Domänen

(wie der hydrophoben Domäne) und deren Blockierung oder strukturelle Modulation zu einer PrP<sup>C</sup>-vermittelten Neurotoxizität führen (Baumann et al., 2007; Li et al., 2007).

Bisher ist nicht bekannt, ob Prion-Erkrankungen durch einen toxischen Funktionsgewinn, den Verlust der PrP<sup>C</sup>-Funktion oder durch Generierung anderer aberranter Formen zur Neurodegeneration führen. Eventuell ist sogar eine Kombination mehrerer dieser Möglichkeiten für die fatale Wirkung von Prion-Erkrankungen ausschlaggebend. Unklar ist auch, ob den vererbaren, sporadischen und infektiösen Formen der Prion-Erkrankungen der gleiche Mechanismus zugrunde liegt. Weiterführende Untersuchungen der physiologischen Funktion von PrP, die mechanistische Analyse weiterer toxischer PrP-Formen und die Identifikation des PrP-Rezeptors sind daher essentiell für ein tief greifendes Verständnis der neurodegenerativen Prozesse bei Prion-Erkrankungen.



**Abbildung 45: Vermittlung von Neurotoxizität während der Propagierung von PrP<sup>Sc</sup>.** Darstellung drei verschiedener Möglichkeiten: 1. Toxischer Funktionsgewinn von PrP<sup>Sc</sup>. 2. Verlust der protektiven Funktion von PrP<sup>C</sup> durch Konversion zu PrP<sup>Sc</sup>. 3. Modulation der protektiven Funktion von PrP<sup>C</sup> zu einer toxischen Aktivität während der Konversionsreaktion. Hierbei könnte es zu Bildung von aberranten toxischen Formen kommen. Deren Identität ist bisher noch unbekannt



## 5 Material

### 5.1 Biologisches Material

#### 5.1.1 Zelllinien

N2a	Typ: murine Neuroblastomzellen ATCC-Nr. CCI 131
ScN2a	Typ: murine Neuroblastomzellen Infiziert mit murinen Prionen
SH-SY5Y	Typ: humane Neuroblastomzellen DSMZ-Nr. ACC 209

#### 5.1.2 Bakterienstämme

DH5 $\alpha$	Genotyp: <i>supE44</i> , $\Delta$ <i>lac169</i> , ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ 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
pCMV-Tag 2B	Invitrogen, Karlsruhe
pmito-GFP	Clontech, Mountain View, Californien,USA
pCMV-EYFP	Clontech, Mountain View, Californien,USA
pBcl-2	(Rambold et al., 2006)
pXIAP	(Bartke et al., 2004)
YFP-Hsp70	(Kim et al., 2002)

#### 5.1.4 Antikörper

Anti-ACTIVE Caspase3 Antikörper	Promega, Mannheim
Anti-FLAG polyklonal	Sigma, Taufkirchen
Anti-FlagM2, monoklonal	Sigma, Taufkirchen
Anti-Maus Antikörper (HRP-gekoppelt) aus Schaf	Amersham Biosciences, Freiburg

Anti-Hase Antikörper (HRP-gekoppelt) aus Schaf	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-Kaninchen Antikörper Cy3	Dianova, Hamburg
Anti-Maus Antikörper Cy2	Dianova, Hamburg
Anti-Maus Antikörper Cy3	Dianova, Hamburg
3F4	Signet Laboratories, Dedham, MA, USA
A7	Hergestellt durch Immunisierung von Kaninchen mit gereinigtem Rekombinaten PrP (Winklhofer <i>et al.</i> 2003)
Anti-Bcl-2, monoklonal	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-GFP	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-Hsp70	(Winkelhofer <i>et al.</i> , 2003)
Anti-BAX	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-SAPK/JNK	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Anti-Phospho-SAPK/JNK	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Anti-ERK	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Anti-Phospho-p42/44	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Anti-p38	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Anti-Phospho-p38	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Anti-Hsp40, polyklonal	Stressgen, Ann Arbor, MI, USA
Anti- $\beta$ -Actin, monoklonal (AC-74)	Sigma, Taufkirchen
3B5	(Uelhoff <i>et al.</i> , 2005)

### 5.1.5 Enzyme, Proteine und Inhibitoren

Anisomycin	Sigma, Taufkirchen
Bafilomycin A1	Merck, Darmstadt
Brefeldin A	Merck, Darmstadt
BSA	USB, Cleveland, OH, USA
JNK Inhibitor II	Merck, Darmstadt
Kainat	Merck, Darmstadt
MG132	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
Pfu-Polymerase	Promega, Mannheim

Shrimp-Alkaline-Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
Trypsin	Gibco BRL LifeTechnologies, Karlsruhe

### 5.1.6 Standard-Größenmarker für Proteine und Nukleinsäuren

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

PCR-*Primer*: Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind jeweils angegeben (RE).  
Die Synthese der *Primer* wurde von der Firma Metabion, Martinsried durchgeführt.

Primername	Sequenz	RE
HindIII-forw	AAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCA CT	HindIII
XhoI-rev	CCCTCTAGACTCGAGGGCGCCATCCCCAAA CAGTGG	XhoI
zytoPrP-forw	AAGCTTAAGCGGCCAAAGCCTGGA	HindIII
$\Delta$ GPI-rev	GCGGCCGCTCATCTTCTCCCGTCGTAATA	NotI
Q160Stop-rev	GCGGCCGCTTGGTTAGGGTAGCGGTA	NotI
W145Stop-rev	GCGGCCGCTCAGTCGTTGCCAAAATGGAT	NotI
mt-SS-forw	GGTACCGCAAGCTTCGCCGGTGGAGGGTGG AACACCGGTGGAAGCCGGTATCCC	HindIII
mt-SS-rev	GGCGAAGGTTGCGGTACCCCGCAAGGCAGG TAACCTCAGCAGGGC	-
nuk-SS-forw	AAACTTAAGCTTATGGATCCAAAAAAGAAGA GAAAGGTA	HindIII
A115Stop-rev	CCGCTCGAGTCAAGCTCCTGCCATATGCTTC AT	XhoI
zyto $\Delta$ 27-156-forw	GGCCTCTGCAAAAAGCGGCCACAAGGAGGG GGT ACCCATAAT	HindIII
$\Delta$ 116-173-forw	CCGCTCGAGTCAGTTCTGGTTGCTGTACTGA	-

	TC	
$\Delta$ 116-173-rev	GATCAGTACAGCAACCAGAACTGACTCGAGC GG	-
Zyto108-173-forw	CCCAAGCTTATGAAGCATATGGCAGGGGCT	HindIII
Zyto108-173-rev	GATCAGTACAGCAACCAGAACTGACTCGAGC GG	XhoI
Bcl-2-forw	CCCAAGCTTATGGCGCACGCTGGGAGAACA	HindIII
Bcl-2-rev	GCCTATCTGGGCCACAAGTGAAGTCAAGCGG	XhoI
Bcl-2 $\Delta$ 202-210-forw	TGGGATGCCTTTGTGGAAGTCTGCTCAGTT TGGCCCTGGTG	-
Bcl-2 $\Delta$ 202-210-rev	CACCAGGGCCAAACTGAGCAGCAGTTCCAC AAAGGCATCCCA	-
S131C-forw	GGTGGCTACATGCTGGGGTGCGCCATGAGC AGGCCCAT	-
S131C-rev	ATGGGCCTGCTCATGGCGCACCCCAGCATG TAGCCACC	-
$\Delta$ HD-forw	CCAAAACCAACATGAAGCATATGCTGGGGA GCGCCATGAGCAGGCC	-
$\Delta$ HD-rev	GGGCCTGCTCATGGCGCTCCCCAGCATATG CTTCATGTTGGTTTTTGG	-
CD4-forw	TACGACGGGAGAAGATCCAGCAGCACCGTG	-
CD4-rev	CTCGAGTCAGATGAGATTATGGCTCTT	XhoI
S131C- $\Delta$ HD-forw	ATGCTGGGGtGCGCCATGAGCAGGCCCATG ATCCATTTTGGCAACGACTGG	-
S131C- $\Delta$ HD-rev	CCTGCTCATGGCGCaCCCCAGCATTGCCATA TGCTTCATGTTGGTTTTTGG	-
$\Delta$ N-forw	GGCCTCTGCAAAAAGCGGCCACAAGGAGGG GGTACCCATAAT	-
$\Delta$ N-rev	ATTATGGGTACCCCTCCTTGTGGCCGCTTT TTGCAGAGGCC	-

**Tabelle 4: Auflistung der benutzten Primer.** Die verwendeten Restriktionsendonukleasestellen sind in Spalte RE angegeben.

## 5.2 Chemikalien

Agarose	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Boehringer Mannheim, Mannheim
Amplify	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
APS	USB, Cleveland, OH, USA
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Complete Protease-Inhibitor	Boehringer Mannheim, Mannheim
DOC	Sigma, Deisenhofen
Desoxynucleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
EGC	Sigma, Taufkirchen
EGCG	Sigma, Taufkirchen
EDTA	USB, Cleveland, OH, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
FCS	Invitrogen, Karlsruhe
GCG Sigma, Taufkirchen	
Glycerol	USB, Cleveland, OH, USA
Glycin	USB, Cleveland, OH, USA
G418	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Instant-Magermilchpulver	Uelzena, Uelzen
Kaliumacetat	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	USB, Cleveland, OH, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	USB, Cleveland, OH, USA
Manganchlorid	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plättchen	Merck, Darmstadt

PBS Dulbecco's +/- Mg/Ca	Invitrogen, Karlsruhe
PBS Dulbecco's -/- Mg/Ca	Invitrogen, Karlsruhe
Pepton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Polyacrylamid/Bisacrylamid (29:1) 40%	Roth, Karlsruhe
ProMix <sup>35</sup> S-Methionin	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Proteasominhibitor MG132	CALBIOCHEM, Bad Soden
Protein A-Trisacryl-Matrix	Pierce, KMF Laborchemie, St. Augustin
Protein G-Sepharose-Matrix	Pierce, KMF Laborchemie, St. Augustin
Rubidiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sarkosyl	USB, Cleveland, OH, USA
SDS	Roth, Karlsruhe
Succinat	Merck, Darmstadt
TEMED	USB, Cleveland, OH, USA
TNT Quick-coupled Translations System	Promega, Mannheim
Transfektionsreagenz:	
Lipofectamine Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Plus Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Tris	USB, Cleveland, OH, USA
Triton X-100	USB, Cleveland, OH, USA
Trypan Blue	Invitrogen, Karlsruhe
Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Tween-20	USB, Cleveland, OH, USA
Wasserstoffperoxid 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Zellkulturzusatz	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin/Glutamin	

### 5.3 Lösungen und Puffer

APS-Lösung	10% Ammoniumperoxodisulfat in PBS -/-
<i>Blocking Milk</i> für Western Blot	5% Magermilchpulver 1x PBST ad 100 ml
Block-Lösung für Caspase3-Assay	0,1% Tween-20

---

	5% Horse Serum in PBS-/- New England Biolabs, Schwalbach
BSA 100x	
Co-IP-Puffer:	
Kalte IP	0,1% Triton X-100 in PBS-/-
Heiße IP, Puffer 1	0,1% Triton X-100 in PBS-/-
Heiße IP, Puffer 2	0,5% Triton X-100 0,5% DOC 0,1% SDS in PBS-/-
Coomassie-Entfärbelösung	40% Methanol 7% Essigsäure
DRM-Isolierungs-Puffer	1% Triton X-100 in PBS -/-
Lysepuffer, ionisch	0,5% Triton X-100 und 0,5% DOC in PBS -/-
DNA-Probenpuffer (6x)	0.25% Bromphenolblau 30% Glycerol
IP-Puffer	0,5% Triton X-100 0,5% DOC 0,5% Sarkosyl Protease-Inhibitor-Tablette in PBS -/-
Lämmli-Probenpuffer (2x)	120 mM Tris pH 6.8 2% SDS 20% Glycerol 0.5% Bromphenolblau 2% Mercaptoethanol
Lämmli-Probenpuffer (4x)	240 mM Tris pH 6.8 4% SDS 40% Glycerol 1% Bromphenolblau 4% Mercaptoethanol
Laufpuffer für SDS-Page (10x)	250 mM Tris, pH 6,8 1,9 M Glycin 1% SDS
MG132	10 mM MG132 in DMSO
MOPS (10x)	0,2 M MOPS 10 mM Na-Acetat

---

MitoB	10 mM EDTA 20 mM HEPES KOH pH 7.4 220 mM Mannitol 70 mM Saccharose 1 mM EDTA (pH 8) 0,2 mg/ml PMSF
MitoA	Mito B +2 mg/ml BSA
MitoC-Succinat	40 mM HEPES KOH pH 7,5 500 mM Saccharose 160 mM Kaliumazetat 10 mM Magnesiumazetat 10 mM Natriumsuccinat
NE – Puffer 2 (10x)	New England Biolabs, Schwalbach
PBS (10x)	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBST (10x)	1% Tween 20 in 1 x PBS
Pfu-Polymerase-Puffer (10x)	Promega, Mannheim
Puffer A	0,5% Triton X-100 0,5% DOC in PBS -/-
Puffer B	20 mM Tris, pH 7,5 150 mM Natriumchlorid 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1% Triton X-100 2,5 mM Natriumpyrophosphat 1 mM β-Glycerophosphate 1mM Natriumvanadat 1 µg/ml Leupeptin
Ponceau S – Färbelösung	0,2 g Ponceau S 5 ml Essigsäure 95 ml H <sub>2</sub> O
Sammelgelpuffer für SDS-Page (Upper Tris)	0,5 M Tris, pH 6,8 0,4% SDS pH 6,8

Shrimp-Alkaline-Phosphatase-Puffer (10x)	Roche Diagnostics, Mannheim
Sucrose-Gradient-Puffer	0,1% Triton X-100 in PBS-/-
T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Base 57,1 ml Eisessig 50 mM Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O, pH 8,0 H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
TBST-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,6 100 mM NaCl 0,1% Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0
TELT	50 mM Tris/HCl 62,5 mM EDTA 0,4% Triton X-100 2,5 M LiCl
TFB1-Puffer	30 mM K-Acetat 100 mM RbCl 10 mM CaCl <sub>2</sub> 50 mM MnCl <sub>2</sub> 15% Glycerol pH 5,8
TFB2-Puffer	10 mM MOPS 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM RbCl 15% Glycerol pH 6,5
Transferpuffer für Western Blot	20 mM Tris-Base 150 mM Glycin 0,01% SDS 20% Methanol
Trenngelbuffer für SDS-Page (Lower Tris)	1,5 M Tris, pH 8,8 0,4% SDS pH 8,8

## 5.4 Medien

*Dulbecco's Modified*

Invitrogen, Karlsruhe

*Eagle's Medium (DMEM)*

<i>Minimal Essential Medium (MEM)</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Minimal Essential Medium</i> ohne L-Methionin	Invitrogen, Karlsruhe
OPTIMEM 1	Invitrogen, Karlsruhe
LB-Medium	1% NaCl 1% Bacto Trypton 0,5% Hefeextrakt Ampicillin wird nach dem Autoklavieren (20 min 120 °C) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben
LB-Agar	LB-Medium + 1,5% Bacto Agar Ampicillin wird nach dem Autoklavieren (20 min 120 °C) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben

## 5.5 Kits

ECL RPN 2106	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Immobilon Western Chemolumineszenz HRP-Substrat	Millipore, Schwalbach
QIAprep Spin Plasmidextraktionskit Mini/Maxi/ EndoFree Maxi	Qiagen, Hilden
QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR-Reinigungskit	Qiagen, Hilden

## 5.6 Sonstige Materialien

Deckgläschen	neoLab, Heidelberg
Einmalkanülen Neolus 26G 0.45 mm	Terumo, Tokyo. Japan
Einmalpipetten, steril	Nunc, Wiesbaden
Einmal-Pasteurpipetten	neoLab, Heidelberg
Einmalspritzen Omnifix-F1 ml	Braun, Melsungen
Einmalspritzen 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Expositionskassetten	Fischer Scientific, Nidderau

für Röntgenfilme	
Faltenfilter Ø 90 mm	Schleicher & Schüll, Dassel
Gelladespitzen Sørensen	Roth, Karlsruhe
MultiFlex Round Tips	
Objektträger 76 x 26 mm	neoLab, Heidelberg
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen für Gilson P-Serie	Continental Lab Products, San Diego CA, USA
Polypropylen-Zentrifugenröhren	Falcon, Heidelberg
15 ml und 50 ml	
Polysterol-Röhrchen, steril, 18 x 95 mm	Greiner, Frickenhausen
Protran Nitrocellulose	Schleicher & Schüll, Dassel
Nucleinsäure- und Proteintransfer	
Röntgenfilme Kodak Biomax MR	Sigma, Deisenhofen
Reaktionsgefäße:	
Safe-Lock Micro Test Tubes	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml und 2 ml	
Schraubdeckel – Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg
1,5 ml und 2 ml	
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Abgene, Hamburg
Skalpellklinge	Bayha, Tuttlingen
Sterilfilter Millex®-HA 0,45 µm	Millipore, Eschborn
Sterilfilter Millex®-GS 0,22 µm	Millipore, Eschborn
Whatman Chromatographie-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Zellkulturflaschen	BD Biosciences Falcon, Heidelberg
Zellkulturschalen Ø3,5 oder 6 cm	BD Biosciences Falcon, Heidelberg
Zellschaber	Corning Inc., Corning, NY, USA

## 5.7 Geräte

Agarosegel-Elektrophoresekammern	Zentralwerkstatt, Max-Planck-Institut, Martinsried
Autoklav GE2606	Getinge Van Dijk, Straelen
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Filmentwickler X-Omat	Kodak, Stuttgart

Gefrierschränke:

Forma Scientific Bio Freezer (-80°C)	ThermoQuest, Egelsbach
AEG Öko-Artis (-20°C)	AEG, Frankfurt am Main
Gelbetrachter	MWG Biotech, Ebersberg
Geltrockner SGD300	Savant, Holbrook, NY, USA
Kühlschrank AEG Öko Santo	AEG, Frankfurt am Main
Kultur-Schüttler Forma Scientific 4518	ThermoQuest, Egelsbach
Mikroskope:	
Axiovert 25	Carl Zeiss, Göttingen
Axiovert 200M mit Software Axiovision	Carl Zeiss, Göttingen
Kühlschrank AEG Öko Santo	AEG, Frankfurt am Main
Kultur-Schüttler Forma Scientific 4518	ThermoQuest, Egelsbach
Mikrowelle M633	Samsung, Schwalbach
PCR-Geräte:	
T3 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
GeneAmp PCR-System 2400	Perkin Elmer, Shelton, CT, USA
pH-Meter	Fischer Scientific, Nidderau
Phosphoimager FLA-2000 mit Software AIDA	Fuji Photo Film, Düsseldorf
Pipetten Gilson	Abimed, Langenfeld
P2, P10, P20, P200, P1000	
Pipettierhilfe pipet-aid	Drummond Scientific, Broomall, PA, USA
Polyacrylamidgel-Elektrophorese- kammer Hoefer SE600 mit Power Supply EPS	Pharmacia Biotech, Freiburg
Reinstwasseranlage Milli-Q <sub>PLUS</sub>	Millipore, Eschborn
Schwenktisch GFL 3017	Merck eurolab, Ismaning
Spektralphotometer DU-640	Beckmann, Unterschleissheim
Thermoblöcke	Zentralwerkstatt, Max-Planck-Institut, Martinsried
Transferkammer Hoefer TE-Serie mit Power Supply EPS 2A200	Pharmacia Biotech, 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
Waagen:	
Laborwaage Mettler Toledo PB602	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Analysenwaage Mettler Toledo AG285	Mettler-Toledo GmbH, Giessen

Wasserbad MT	Roth, Karlsruhe
Zählkammer, Neubauer	Merck eurolab, Ismaning
Zellkulturschränke	ThermoQuest, Egelsbach
Forma Scientific 3111	
Zentrifugen:	
Kühlzentrifuge GS-6R mit Rotor GH3.8	Beckmann, Unterschleissheim
Kühlzentrifuge J2-21M mit Rotor JA-14	Beckmann, Unterschleissheim
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Speed-Vac Concentrator	Savant, Holbrook, NY, USA

## 6 Methoden

### 6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

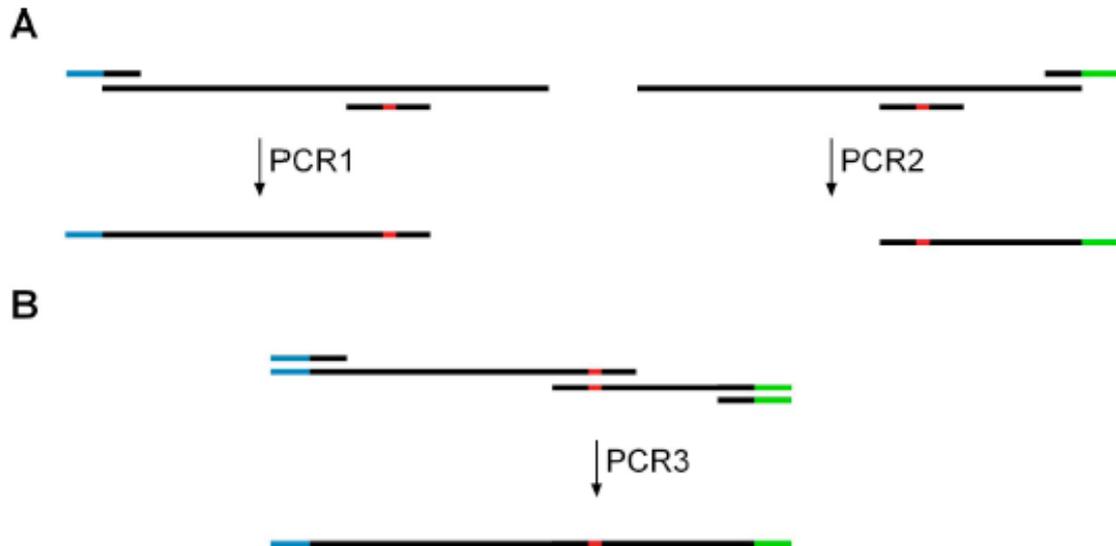
Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) (Saiki et al., 1988) dient der selektiven *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels thermostabiler DNA-Polymerase und spezifischer Oligonukleotide (*Primer*). Zur Generierung der Mutanten wurden die Form der Standard- und Rekombinanten-PCR angewendet.

#### 6.1.1 Standard-PCR

Die Standard Form der PCR wurde angewandt um bestimmte Sequenzabschnitte zu amplifizieren, durch Anhängen von Restriktionsschnittstellen zu modifizieren und anschließend in die unten angegebenen Vektoren einzufügen (siehe 6.1.5).

#### 6.1.2 Rekombinante-PCR

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte rekombinante PCR wurde eingesetzt, um verschiedene Genabschnitte ohne Einfügen von Restriktionsschnittstellen miteinander zu verknüpfen (Higuchi et al., 1990). Dabei wurden in zwei getrennten Ansätzen Genfragmente mit Primern mit überlappender Sequenzhomologie amplifiziert, welche dann in einer zweiten Reaktion als Matrize eingesetzt wurden. Die hybridisierenden Sequenzhomologien dienen als interne Primer. Durch entsprechende Wahl der internen Primer können Mutationen, Insertionen oder Deletionen in ein Gen eingefügt werden (Abb. 42). Die externen Primer enthielten jeweils eine Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease und dienen der Amplifikation des Produktes.



**Abbildung 46. Klonierungsstrategie zur Einführung von Punktmutation, Deletionen oder Insertionen mittels rekombinanter PCR. (A)** Die beiden zu verknüpfenden Fragmente, die N- und C-terminal zur Mutation liegen, werden separat per PCR amplifiziert (PCR1 und PCR2). Dabei enthalten die internen Primer jeweils die Punktmutation, Deletion oder Insertion (rot). **(B)** In der folgenden PCR-Reaktion (PCR3) lagern sich die überlappenden Sequenzen aneinander und fungieren somit als interne Primer. Fragmente mit der vollständigen Länge werden durch die externen Primer amplifiziert. Schwarz: Fragmente 1 bzw. 2, blau und grün: nicht-homologe Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen, rot: Mutation.

### 6.1.3 PCR-Bedingungen

Die PCR-Reaktionen wurden mit 15 pmol Primern, je 0,25 mM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 50 ng Matrizen-DNA, 2,5 U Pfu-DNA-Polymerase und dem vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer durchgeführt. Nach dreiminütiger Denaturierungsphase bei 96°C wurde folgender Zyklus 28-mal wiederholt:

Denaturierung:	45 Sekunden bei 96°C
Primer-Anlagerung:	45 Sekunden bei 50-55°C (je nach Schmelztemperatur des <i>Primers</i> )
Elongation :	2 Minuten/Kilobasenpaar zu amplifizierender DNA bei 72°C

Abschließend wurde die Reaktion 10 Minuten bei 72°C inkubiert und bis zur weiteren Verarbeitung auf 4°C gekühlt.

### 6.1.4 Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen wurden gemäß der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1997) von der Firma MediGenomix, Martinsried durchgeführt.

### 6.1.5 Generierung der PrP- und Bcl-2-Konstrukte

Alle PrP-Mutanten wurden in den Vektor pcDNA3.1/Zeo(+), der unter der Kontrolle des CMV (Cytomegalovirus)-Promotors steht, ligiert, um eine Expression in den verschiedenen Zelllinien zu ermöglichen. Als Matrize diente das Plasmid pcDNA-wtPrP welches murines Wildtyp-Prion-Protein kodiert. Die Aminosäuren 108 bis 112 entsprechen dem humanen PrP-Homolog und wurden als 3F4-Tag eingeführt, welcher spezifisch durch den 3F4-Antikörper detektiert werden kann.

Die Bcl-2 Mutanten wurden in den Vektor pCMV-Tag2B, ligiert, unter dessen Kontrolle sie in Zellkultur als aminoterminaler Flag-Fusionsproteine exprimiert werden können. Als Ausgangskonstrukt diente das Plasmid pBcl-2-FLAG, welches von Till Bartke bereitgestellt wurde (Rambold et al., 2006).

C-terminale PrP-Deletionsmutanten wurden ausgehend von dem Plasmid pcDNA-wtPrP mit den Primern *HindIII-forw* und *X-rev* amplifiziert. Der Buchstabe X steht für die jeweilige Konstruktbezeichnung. Über die Schnittstellen *HindIII* und *NotI* wurde das Produkt in das Plasmid pcDNA3.1/Zeo(+) ligiert.

Zur Klonierung von Punkt-, Deletions- und Fusionsmutanten wurden ausgehend von dem Plasmid pcDNA-wtPrP bzw. pCMV-Bcl-2-FLAG, das N-terminale Fragment mit den Primern *HindIII-forw* und *X-rev* und das C-terminale Fragment mit den Primern *Not-rev* (bzw. *XhoI-rev*) und *X-forw* amplifiziert. Die Amplifikation des Produkts erfolgte dann mit den externen Primern *HindIII-forw* und *NotI-rev* (bzw. *XhoI-rev*). Über die Schnittstellen *HindIII* und *NotI* (bzw. *XhoI*) wurde das Produkt in das Plasmid pcDNA3.1 Zeo(+) bzw. pCMV-Tag2B ligiert.

#### 6.1.5.1 Die pathogenen Mutanten Q160Stop und W145Stop und ihre zytosolischen Formen

Die pathogenen Carboxy-terminalen Deletionsmutanten sowie ihre zytosolisch-lokalisierenden Varianten wurden mittels Standard-PCR generiert. Die Deletionen dieser Konstrukte umfassen einen Großteil der globulären Domäne von PrP.

Die Konstrukte wurden unter Verwendung der unten angegebenen Primerpaare hergestellt. Hierbei wurde durch den Basenaustausch an der entsprechenden Stelle ein Stopcodon eingeführt. Die zytosolischen Varianten wurden durch PCR-vermittelte Deletion der ER-Signalsequenz (Aminosäuren 1 bis einschließlich 23) generiert.

Konstrukt	Primerpaare	Mutation
Q160Stop	<i>HindIII</i> -forw Q160Stop-rev	C-terminale Stopmutation
W145Stop	<i>HindIII</i> -forw W145Stop-rev	C-terminale Stopmutation
zytoQ160Stop	zytoPrP-forw Q160Stop-rev	C-terminale Stopmutation Deletion der ER-SS
zytoW145Stop	zytoPrP-forw W145Stop-rev	C-terminale Stopmutation Deletion der ER-SS

**Tabelle 5:** Auflistung der verwendeten Primer zur Herstellung der pathogenen Mutanten W145Stop und Q160Stop und deren zytosolischer Formen.

### 6.1.5.2 Die Lokalisationsmutanten mtPrP und nukPrP

#### 6.1.5.2.1 Prion-Protein mit mitochondrialer Signalsequenz (mtPrP)

Ausgehend von dem Plasmid pcDNA-wtPrP wurde ein PrP-Fragment mit Homologie-Überhang zu der mitochondrialen Signalsequenz der Ubichinon-Cytochrom C Reduktase Komplex (UCR) Untereinheit 1 generiert. Hierfür wurden die Primer mtPrP-forw und  $\Delta$ GPI-*NotI*-rev verwendet. Parallel wurde ein mt-Signalsequenz Fragment der UCR1 mit überhängender PrP-Sequenz mittels der Primer mtPrP-forw und mtPrP-rev generiert. Die beiden Fragmente wurden mit dem externen Primerpaar mtPrP-forw und  $\Delta$ GPI amplifiziert. Das Konstrukt kodiert PrP mit N-terminaler mitochondrialer Signalsequenz der UCR1 und C-terminaler Deletion der GPI-Signalsequenz (Aminosäuren 231 bis 255).

#### 6.1.5.2.2 Prion-Protein mit nukleärer Signalsequenz (nukPrP)

Ausgehend von dem Plasmid pcDNA-wtPrP wurde ein PrP-Fragment mit N-terminaler nukleärer Signalsequenz des großen T-Antigens des SV40-Virus, mittels des Primerpaares nukPrP-forw und  $\Delta$ GPI-rev hergestellt. Das Konstrukt kodiert PrP mit N-terminaler nukleärer Signalsequenz und C-terminaler Deletion der Aminosäuren 231 bis 255.

#### 6.1.5.3 Zytoplasmische Deletionsmutanten von PrP

Die Deletionsmutanten von PrP wurden mittels unten angegebener Primerpaare ausgehend von dem Plasmid pcDNA-wtPrP hergestellt. Alle PrP-Deletionsmutanten enthalten zusätzlich zu ihren deletierten Domänen keine ER (AS 2-22) und GPI (AS 231- 255) -Signalsequenz.

Konstrukt	Primerpaar	Mutation
zytoA114Stop	zytoPrP-forw / A115-Stop-rev	Alanin -> Stop Deletion der ER-SS
zyto $\Delta$ 27-156	zytoPrP-forw / $\Delta$ 27-156-rev $\Delta$ 27-156-forw / $\Delta$ GPI-rev	Deletion der AS 27-156 Deletion der ER-SS
zyto $\Delta$ 116-173	zytoPrP-forw / $\Delta$ 116-173-rev $\Delta$ 116-173-forw / $\Delta$ GPI-rev	Deletion der AS 116-173 Deletion der ER-SS
Zyto108-173	Zyto108-173 forw / 108-173-rev	Peptid von AS 108-173 Ohne ER-SS

**Tabelle 6:** Auflistung der verwendeten Primer zur Herstellung der zytosolischen Deletionsmutanten.

#### 6.1.5.4 Deletionsmutante von Bcl-2

Ausgehend von dem Plasmid pCMV-Bcl-2 wurde mittels rekombinanter PCR die Mutante Bcl-2- $\Delta$ 202-219 hergestellt. Das Konstrukt wurde über zwei Fragmente mittels der Bcl-2-forw und Bcl-2- $\Delta$ 202-219-rev und Bcl-2 $\Delta$ 202-219-forw und Bcl-2-rev -Primer hergestellt. Die beiden entstandenen Fragmente wurden über die externen Primer Bcl-2-forw und Bcl-2-rev amplifiziert. Das Konstrukt kodiert humanes Bcl-2 mit Deletion der Aminosäuren 202 bis einschließlich 219.

#### 6.1.5.5 Induziertes PrP-Dimer S131C

Das Konstrukt pcDNA-S131C wurde mittels rekombinanter PCR mit den Primern *HindIII*-forw und S131C-forw sowie S131C-rev und *XhoI*-rev generiert. Die im ersten Schritt entstandenen Fragmente wurden über die externen Primer *HindIII*-forw und *XhoI*-rev amplifiziert. Das Konstrukt kodiert für PrP mit einem Aminosäureaustausch an Stelle 131 von Serin zu Cystein.

#### 6.1.5.6 PrP-Dimer S131C mit Deletionen und Austauschen

Ausgehend von dem Konstrukt pcDNA-S131C wurden verschiedene Bereiche des Prion-Proteins deletiert bzw. ausgetauscht. Die Konstrukte wurden mit Hilfe unten aufgeführter Primerpaare hergestellt.

Die Deletion  $\Delta$ N umfasst hierbei die Aminosäuren 27 bis einschließlich 89. Der Mutante  $\Delta$ N fehlt der gesamte Oktarepeat-Bereich.

Die Deletion  $\Delta$ HD umfasst die Aminosäuren 112 bis einschließlich 128. Ihr fehlt die putative Transmembrandomäne von PrP, welche hier als hydrophobe Domäne (HD) bezeichnet wird.

Für die Mutante CD4 wurde die GPI-Signalsequenz von PrP (Aminosäure 231 bis einschließlich 255) durch die Transmembrandomäne von CD4, einem Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors ausgetauscht (Winklhofer et al., 2003).

Konstrukt	Primerpaar	Mutation
$\Delta$ HD-S131C	<i>HindIII</i> -forw / $\Delta$ HD-S131C-rev $\Delta$ HD-S131C-forw / <i>XhoI</i> -rev	Deletion der 112-128 Serin -> Cystein
$\Delta$ N-S131C	<i>HindIII</i> -forw / $\Delta$ N-rev $\Delta$ N-forw/ <i>XhoI</i> -rev	Deletion 27-89 Serin -> Cystein
CD4-S131C	<i>HindIII</i> -forw / S131C-rev S131C-forw / CD4rev	Austausch GPI-SS durch TM von CD4 Serin -> Cystein

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Primer zur Herstellung der Dimersierungsmutanten.

#### 6.1.5.7 Weitere verwendete Konstrukte

Folgende Konstrukte wurden von vorangegangenen Doktoranden generiert und sind in unten angeführter Liste kurz beschrieben.

Konstrukt	Mutation	Referenz
zytoPrP	Deletion der ER und GPI-SS	Heske et al., 2004
$\Delta$ N	Deletion der AS 27-89	Winklhofer et al. 2003
$\Delta$ HD	Deletion der AS 112-135	Winklhofer et al. 2003
CD4	Austausch der GPI-SS durch die TM-Domäne des CD4-Co-Rezeptors	Winklhofer et al. 2003

Tabelle 8: Auflistung verwendeter Konstrukte. Die Konstrukte waren bereits im Labor vorhanden. Die entsprechenden Publikationen sind unter Referenz angegeben.

## 6.2 Bakterienkultur

### 6.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Um Zellen von *Escherichia coli* (*E.coli*) kompetent zu machen, d.h. diese zur Aufnahme von Plasmid-DNA zu befähigen, wird eine Kultur bis zur logarithmischen Phase angezogen und mit divalenten Kationen behandelt. Dieses Verfahren führt zu einer Destabilisierung der Zellwand (Sambrook, J. et al. 1989). Zunächst wurde eine Vorkultur hergestellt: 2 ml *Luria Broth* (LB)-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie des *E.coli*-Stammes DH5 $\alpha$  beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Der Ansatz wurde anschließend in 250 ml LB-Medium gegeben und 2-3

Stunden lang bis zu einem OD590-Wert zwischen 0,4 und 0,6 kultiviert. Die Kultur wurde 5 Minuten bei 4°C und 3.750 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 ml eiskalten TFB1-Puffer resuspendiert, die Suspension 5 Minuten lang auf Eis inkubiert und anschließend 5 Minuten lang bei 4°C und 3.750 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml kaltem TFB2-Puffer resuspendiert, 15-60 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend aliquotiert (100 µl/Reaktionsgefäß). Die Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **6.2.2 Transformation kompetenter Bakterien**

Die Transformation (Sambrook et al., 1989) dient der Aufnahme und Amplifikation von Plasmiden durch *E.coli*. Tiefgefrorene Aliquots kompetenter Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 100 bis 1000 ng Plasmid-DNA wurde in einem Volumen von 10 µl mit 100µl Bakteriensuspension vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension 90 Sekunden bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und anschließend 5 Minuten lang auf Eis gestellt.

Nach Zugabe von 800 µl antibiotikafreiem LB-Medium wurden die Kulturen 1 Stunde lang bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien in unterschiedlichen Konzentrationen auf entsprechenden selektiv-Agarplatten ausplattiert und 16-20 Stunden lang bei 37°C inkubiert (Ampicillin für alle Konstrukte in pcDNA3.1/Zeo(+); Kanamycin für alle Konstrukte in pCMV-Tag 2B).

### **6.2.3 DNA-Präparation**

Zur Herstellung von Plasmid-DNA wurde der Qiagen-Mini- bzw. Qiagen-Maxi-Kit verwendet. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers Qiagen verfahren.

## **6.3 Zellkultur**

### **6.3.1 Kultivierung von Zellen**

Murine und humane Neuroblastomzellen wurden als adhärenter Einzelzellrasen kultiviert. Murine Neuroblastomzellen (N2a bzw. ScN2a) wurden in MEM unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum, 1% Antibiotika-Lösung (Endkonzentration: 1U/ml Penicillin G, 1µg/ml Streptomycin) und 2 mM Glutamin in Zellkulturschalen bzw. -flaschen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das ScN2a-Zell-Medium wurden zusätzlich mit 5 mg G418 versetzt (Endkonzentration 10mg/l)

Humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) wurden in DMEM unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum, 1% Antibiotika-Lösung (Endkonzentration: 10 U/ml

Penicillin G, 10 µg/ml Streptomycin) und 2 mM Glutamin in Zellkulturschalen bzw. -flaschen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Die Kulturen wurden alle fünf Tage passagiert, wobei die Zellen 1:8 und 1:16 gesplittet wurden. ScN2a-Zellen wurden im gleichen Rhythmus im Verhältnis 1:10 und 1:20 gesplittet.

### **6.3.2 Passagierung von Zellen**

Nach Abziehen des Kulturmediums wurden die Zellen einer 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit 5 ml PBS -/- gespült und anschließend mit 0,5 ml Trypsin (0,5 g/l Trypsin) einige Minuten lang inkubiert. Die Zellen wurden leicht von ihrer Unterlage abgeklopft, in 8 ml (bei N2a und SH-SY5Y) bzw. 10 ml (bei ScN2a) vorgewärmtem Vollmedium sorgfältig resuspendiert und im gewünschten Verhältnis aufgeteilt. Nach Zusatz von Vollmedium (ad 5 ml Gesamtvolumen) wurden die Zellen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **6.3.3 Ausplattieren von Zellen**

Zum Ausplattieren der Zellen wurde zunächst die vorhandene Zellmenge ermittelt. Ein Aliquot der mit Trypsin gelösten Zellen (siehe 3.5.2.) wurde mit Hilfe einer Neubauer-Kammer gezählt. SH-SY5Y Zellen wurden in einer Dichte von  $7 \times 10^5$  Zellen auf 3,5 cm-Schalen ausplattiert. N2a- und ScN2a-Zellen wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen auf 3,5 cm-Schalen bzw.  $2,5 \times 10^6$  Zellen auf 6 cm-Schalen ausplattiert. Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden die Zellen dünner ausplattiert, um vereinzelte Zellen besser zu erkennen. In diesem Fall wurden  $5 \times 10^5$  SH-SY5Y Zellen auf 3,5 cm-Schalen, welche Deckgläschen enthielten, ausplattiert.

### **6.3.4 Transfektion**

24 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen wurden diese mit Medium gewaschen und mit Plasmid-DNA mit dem Transfektions-Kit Lipofectamine plus nach Angaben des Herstellers Invitrogen transfiziert. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde 1 ml Vollmedium zugesetzt. Für die Apoptose-Versuche wurde endotoxinfreie Plasmid-DNA verwendet (EndoFree Maxi, Qiagen).

## **6.4 Proteinpräparation und Analyse**

### **6.4.1 Proteinextraktion aus Zellen**

Die zu extrahierenden Zellen wurden zweimal mit PBS -/- gewaschen, mit 500 µl PBS -/- versetzt und mit einem Zellschaber abgekratzt. Es wurde mit 500 µl PBS -/- nachgespült und 10 Sekunden lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt. Die Zellen wurden wie unter 6.4.2 bzw. 6.4.3 weiter behandelt.

#### **6.4.2 Herstellung von Gesamtlysaten**

Um Gesamtlysate zu erstellen wurden die pelletierten Zellen in 150 µl Detergenzpuffer mit Protease-Inhibitor resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Lysat mit 50 µl 4 x LSB versetzt und für 10 Minuten bei 96°C aufgeköcht.

#### **6.4.3 Trennung von Detergenz-löslichen und -unlöslichen Proteinen**

Zur Auftrennung der Detergenz unlöslichen von der löslichen Fraktion wurden die Zellpellets mit 180 µl Detergenzpuffer resuspendiert, 5 Minuten lang auf Eis inkubiert und 20 Minuten lang bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. 150 µl des Überstandes wurden mit 50 µl 4 x Lämmli-Probenpuffer versetzt. Das Pellet wurde in 200 µl 2 x Lämmli-Probenpuffer resuspendiert. Beide Proben wurden 10 Minuten lang bei 95°C inkubiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Zum Scheren von störenden DNA-Strängen wurde das Pellet mehrmals durch eine 0,45 mm Kanüle gezogen.

Die Proben wurden auf Trockeneis eingefroren und bei -20°C gelagert.

#### **6.4.4 Isolierung von GPI-verankerten Proteinen**

Um spezifisch GPI-verankerte Proteine von der Zelloberfläche zu entfernen wurden die Zellen 2x in PBS+/+ gewaschen und mit 0,5 U/ml Phosphatidylinositol Phospholipase C (PIPLC) in PBS für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und entweder mittels Trichloressigsäure (TCA, siehe 6.4.5) gefällt, in 60µl 2 x LSB aufgenommen, 10 Minuten bei 95°C aufgeköcht und mit SDS-PAGE analysiert oder mit Hilfe von Vivaspinröhrchen (30.000 MW, siehe 6.4.6) aufkonzentriert, mit Coomassie beladen und auf Native Gele geladen.

#### **6.4.5 Fällung von Proteinen**

Für die Fällung von Proteinen mittels Trichloressigsäure (TCA) wurden die Proben mit 1/10 Volumen 50% TCA-Lösung versetzt, 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 500 µl Aceton gewaschen, an der Luft getrocknet und in 2x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Die gefällten Proteine wurden mittels Western Blot analysiert.

#### **6.4.6 Aufkonzentrieren von Proteinen**

GPI-verankertes PrP, welches durch die Inkubation mit PIPLC (siehe 6.4.4) von seinem Membrananker abgeschnitten und in den Überstand freigesetzt wird liegt nur in geringen Konzentration vor. Um diese Fraktion im nativen Zustand untersuchen zu können, wurden die Überstände von 4 Platten vereinigt und mittels Zentrifugation von 1.000 g für 15 Minuten

bei 4°C in Vivaspinnröhrchen (Ausschlussgröße 30.000 MW) aufkonzentriert. Das Konzentrat wird für 10 Minuten mit Coomassie-Lösung inkubiert und anschließend auf Native Gele geladen (siehe 6.4.9).

#### **6.4.7 Nachweis der Sekretion von Proteinen**

Um zu untersuchen, ob eine Sekretion der überexprimierten Proteine in den Zellkulturüberstand vorliegt, wurden die Zellen zweimal mit MEM gewaschen und mit 1 ml MEM 3 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und vorhandene Proteine mit TCA (siehe 6.4.5) gefällt.

#### **6.4.8 Proteinkonzentration nach Bradford**

Nach der Zelllyse wurde die Gesamtproteinmenge des Überstandes mit Hilfe des Protein Assay Kits nach der Methode von Bradford entsprechend den Angaben des Herstellers Bio-Rad bestimmt.

#### **6.4.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte zumeist durch eindimensionale, diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, U. K. 1970). Je nach der Größe des zu untersuchenden Proteins wurde eine Polyacrylamid-Konzentration von 8% oder 12% für das Trenngel und 4% für das Sammelgel verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 150- 250 V in einer Hoefer-SE600-Kammer durchgeführt. Nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Trenngel auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet (siehe 6.4.10).

#### **6.4.10 Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen im nativen Zustand**

Bei der nativen Gelelektrophorese richtet sich die Ladung der Proteine im Gel nicht nach ihrem Molekulargewicht sondern nach ihrem isoelektrischen Punkt und der Ladung des verwendeten Laufpuffers. Zusätzlich behalten sie ihre native Konformation bei. Das heißt, dass Proteine zwar nicht bzgl. ihres Molekulargewichts analysiert werden können, Proteininteraktionen jedoch bleiben bestehen, so dass diese Methode zum Nachweis von Proteinkomplexen geeignet ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde natives PrP durch PIPLC-Verdau von der Oberfläche von Zellen solubilisiert (6.4.4) und aufkonzentriert (6.4.6). Anschließend wurde zu den Proben 6x Laemmli-Proben Puffer (für native Gele: 360 mM Tris-HCl (pH 6,8), 60% Glycerol, 0,4% Coomassie-Blau brilliant servablau) und die Proben

anschließend auf Native Gele aufgetrennt. Native Gele wurden wie folgt hergestellt: Sammelgel (4% Acrylamid, 150mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% TEMED, 0,1% APS), Trenngel (8% Acrylamid, 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% TEMED, 0,1% APS). Der Laufpuffer bestand aus 25 mM Tris und 189 mM Glycine. Das Gel wurde einem für 4 Stunden einem elektrischen Feld ausgesetzt, wobei die Arbeitsspannung sukzessiv von 80 bis auf 180 V erhöht wurde. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine bei 80V für 1 Stunde auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Transferpuffer bestand aus 20 mM Tris, 150 mM Glycine, 20% Methanol. Die Membran wurde getrocknet, anschließend in Isopropanol gewaschen und mit H<sub>2</sub>O neutralisiert. Letztlich wurde die PVDF-Membran mit PBST gewaschen und unspezifische Proteinbindungsstellen durch 1-stündige Inkubation in 5% Milch in PBST verhindert.

#### **6.4.11 Proteintransfer auf Nitrozellulose (Western Blot)**

Die Proteine wurden zum Zwecke der Immundetektion (siehe 6.4.12) mit Transferpuffer auf eine Nitrozellulose-Membran der Porengröße 0,45 µm transferiert (Towbin, H. *et al.* 1979). Der Transfer erfolgte für 2 Stunden bei einer festen Stromstärke von 1 A bei 4°C.

#### **6.4.12 Immundetektion von Proteinen**

Die Immundetektion wurden mit dem *Enhanced Chemiluminescenc* (ECL)-System oder dem Immobilon Western Chemolumineszenz HRP-Substrat nach Angaben des Herstellers detektiert. Die Nitrozellulose-Membran wurde 1 Stunde in PBST mit 5% Milchpulver (*Blocking Milk*) bei Raumtemperatur blockiert und über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper bzw. Antiserum inkubiert. Die Membran wurde dreimal 10 Minuten mit PBST gewaschen und für 40 Minuten mit dem sekundären Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Schaf-Anti-Maus- bzw. Esel-Anti- Kaninchen-Antikörper (1:5.000 in PBST) inkubiert. Die Membran wurde erneut mit PBST gewaschen und mit HRP-Substrat inkubiert. Die Signale wurden durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

#### **6.4.13 Ponceau S – Färbung**

Nach dem Blotten wurde die Membran 5 bis 10 Minuten lang in Ponceau S-Lösung geschwenkt und in H<sub>2</sub>O entwickelt. Durch die unspezifische Anfärbung der Proteine kann die Effizienz des Proteintransfers kontrolliert werden. Vor der Immunreaktion wurde die Membran in PBST entfärbt.

#### **6.4.14 Immunfluoreszenz**

##### **6.4.14.1 Indirekte Immunfluoreszenz**

Um die zelluläre Lokalisierung von Proteinen in lebenden Zellen zu bestimmen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit permeabilisierten Zellen durchgeführt. Dazu wurden SH-SY5Y-Zellen auf Glasdeckgläschen ausplattiert (siehe 6.3.3) und transfiziert (siehe 6.3.4). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen zur Permeabilisierung für 10 Minuten in Methanol (-20°C) fixiert und anschließend mit dem Erstantikörper (1:200 in PBS -/-, 1% BSA) eine Stunde lang bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS -/- gewaschen und mit dem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper Cy3 oder FITC (1:200 in PBS -/-, 1% BSA) versehen. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Präparate in Mowiol (+ DAPI, 1 µg/ml) eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Für Analysen am Konfokalmikroskop wurden die Zellen mit 3% PFA fixiert und mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert.

##### **6.4.14.2 Apoptose-Detektion**

Die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers, der gegen aktive Caspase-3 gerichtet ist, ermöglicht die spezifische Detektion von apoptotischen Zellen. SHSY5Y- Zellen wurden auf Glasdeckgläschen aufplattiert (siehe 6.3.3) und transfiziert (siehe 6.3.4). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für drei Stunden mit Kainat (500 µM), Kupfersulfat (25 µM) oder MG132 (30 µM) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 20 Minuten mit 3% Paraformaldehyd (PFA) fixiert, mit 0,2% Triton X-100 für 10 Minuten permeabilisiert und für weitere 60-120 Minuten mit Blockierungspuffer bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Inkubation des Anti-ACTIVE Caspase-3 Antikörpers (1:250 in Blockierungspuffer) erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Die Zellen wurden mit PBS -/- gewaschen und mit dem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper Cy3 (1:500 in PBS -/-) versehen. Nach 2-stündiger Inkubation bei RT wurden die Zellen in Mowiol (+ DAPI, 1 µg/ml) eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die apoptotischen Zellen wurden durch Zählen der Caspase-positiven Zellen quantifiziert.

#### **6.4.15 Radioaktive Immunpräzipitation**

Transfizierte Zellen wurden mit Hilfe der radioaktiven Markierung und der anschließenden Immunpräzipitation auf Stabilität und Degradation bestimmter transfizierter Konstrukte hin untersucht.

#### 6.4.15.1 Radioaktive Markierung von Proteinen mit <sup>35</sup>S-Methionin

Die am Vortag transfizierten Zellen (siehe 6.3.4) wurden zweimal mit MEM ohne Methionin (Met<sup>-</sup>-Medium) unter Zusatz von 1% Antibiotikallösung (Endkonzentration: 1U/ml Penicillin, 1 µg/ml Streptomycin) und 2 mM Glutamin gewaschen. Anschließend wurde pro Platte 1 ml Met<sup>-</sup>-Medium zugegeben und für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, um vorhandenes Methionin (Met) aufzubrechen („Hungern“). Das Medium wurde abgenommen und durch 500 µl Markierungsmedium <sup>35</sup>S-Methionin (300 µCi/ml Medium) ersetzt. Nach 30-minütiger Markierung (*Pulse*) wurden die Zellen zweimal in N2a- oder SH-SY5Y- Vollmedium gewaschen. Die zur Bestimmung der während der *Pulse*-Phase synthetisierten Proteine vorgesehenen Schalen wurden auf Eis in 500 µl IP-Puffer geerntet und mit weiteren 500 µl IP-Puffer nachgespült. Für einen *Chase* bestimmte Schalen wurden zweimal mit Vollmedium gewaschen, mit 2 ml Vollmedium versetzt und weiter bei 37°C inkubiert. Die Zellyse erfolgte wie oben beschrieben.

#### 6.4.15.2 Immunpräzipitation (IP)

Die Zellysate wurden 5 Minuten auf Eis inkubiert, 10 Sekunden lang gevortext und 20 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktions-Gefäß überführt, mit 1 µl Erstantikörper (3F4 für PrP Konstrukte, Anti-Flag bei Bcl-2-Konstrukten oder Anti-GFP bei YFP-Hsp70) versetzt und über Nacht bei 4°C im Überkopfschwenker inkubiert. Das Pellet wurde in 100 µl IP-Puffer mit 1%SDS versetzt resuspendiert und für 10 Minuten bei 100 °C aufgeköcht um das Pellet zu lösen. Anschließend wurden 900 µl IP-Puffer zugegeben und diese Lösung ebenfalls mit 1 µl Erstantikörper (3F4 für PrP Konstrukte, Anti-Flag bei Bcl-2-Konstrukten oder Anti-GFP bei YFP-Hsp70) versetzt. Um die Protein-Antikörper-Komplexe zu isolieren, wurde der Lösung 30 µl Trisacryl-Protein A (in 0,5% Triton-DOC 0,5% Sarkosyl gewaschen) bzw. zur Präzipitation von Flag- und GFP-Konstrukten Sepharose-Protein G (in 0,5% Triton-DOC, 0,5% Sarkosyl gewaschen) zugegeben und für weitere 90 min im Überkopfschwenker inkubiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Markierung aller Proben wurde 30 µl Überstand abgenommen und mit 10 µl Lämmli-Probenpuffer (4x) 10 Minuten bei 100°C aufgeköcht (Lysate). Das Protein A bzw. G Pellet wurde zweimal mit 500 µl 0,5% Triton-DOC gewaschen und mit 50 µl Lämmli-Probenpuffer (2x) 10 Minuten bei 100°C aufgeköcht. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

#### 6.4.15.3 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Die Zellen wurden in 0,1% Triton X-100 lysiert und anschließend mit dem 1. Antikörper für 16 Stunden bei 4°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Der Protein-Antikörper-Komplex wurde durch Zugabe von 30 µl Trisacryl-Protein A oder G unter 90-minütiger Inkubation isoliert. Der

Protein-Antikörper-Komplex wurde durch Inkubation bei 100°C in 0,5% Triton-DOC, 0,9% SDS Puffer aufgelöst und anschließend mit dem Co-IP-Antikörper für 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Der zweite Protein-Antikörper-Komplex wird durch Zugabe von Trisacryl-Protein A oder G (abhängig vom Co-IP-Antikörper) isoliert. 60 µl des ungebundenen Überstands und das Immunpellet wurden auf SDS-Gelen aufgetrennt.

#### **6.4.16 Autoradiodiagramme und Phosphoimaging**

Gele mit radioaktiv markierten Proteinen wurden 30 Minuten fixiert (40% Methanol, 7% Essigsäure) und weitere 30 Minuten mit Amplify inkubiert. Auf einem Whatman-Papier wurden sie dann in einem Gelrockner für eine Stunde bei 72°C unter Vakuum getrocknet. Die markierten Proteine wurden durch Exposition eines Röntgenfilms visualisiert. Eine computergestützte Visualisierung und Quantifizierung radioaktiv markierter Proteine wurde mittels Phosphoimaging durchgeführt. Auf die getrockneten Gele wurde für 1-48 Stunden ein Phosphoimaging-Schirm aufgelegt. Die Signale wurden von einem Phosphoimager ausgelesen und mit dem Programm AIDA (Raytest) ausgewertet.

#### **6.4.17 *In vitro* Translation**

Die *in vitro* Translation wurde mit dem TNT T7 *Quick Coupled Transcription/Translation* System gemäß den Angaben des Herstellers Promega durchgeführt. Nach 90-minütiger Translation wurde die Reaktion durch Zugabe von Laemmli-Probenpuffer gestoppt und die Proben auf einem SDS-Gel analysiert.

#### **6.4.18 Mitochondrien-Import-Assay (*in vitro*-Import)**

##### **6.4.18.1 Isolierung von Mitochondrien aus Rattenleber**

Ca. 1 g einer Rattenleber wird isoliert und unter Zugabe von 10 Volumeneinheiten MitoA-Puffer mit Hilfe eines Mörsers homogenisiert. Die Suspension wird mit MitoB-Puffer im Verhältnis 1 : 4 verdünnt und für 10 Minuten bei 600 g und 4 °C abzentrifugiert. Das entstehende Pellet wird verworfen, während der die Mitochondrien enthaltende Überstand bei 9.000 g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert wird. Bei diesem Zentrifugationsschritt werden die Mitochondrien pelletiert. Das Pellet wird dann in 2 ml MitoC+Succinat Puffer aufgenommen und nochmals homogenisiert. Anschließend wird die Protein Konzentration durch Zugabe von MitoC+Succinat Puffer auf einen Wert von 5-10 mg Protein pro ml eingestellt. Durch Zugabe von 1 mM DTT und 0,2 mM ADP werden die Mitochondrien auf die Importreaktion vorbereitet. In diesem Zustand können sie für einen Zeitraum von 6 Stunden auf Eis aufbewahrt werden.

#### 6.4.18.2 Mitochondrialer Import Assay

Zunächst werden die zu untersuchenden Konstrukte *in vitro* translatiert (siehe 6.4.17) und bis zur Importreaktion bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Durch Zugabe von  $25\text{ }\mu\text{l}$   $2\times$  TT (RT) wird die radioaktive Markierung der Proteine gestoppt und das Volumen der Ansätze verdoppelt. Es werden  $10\text{ }\mu\text{l}$  des Translationsansatzes abgenommen um den Erfolg der *in vitro* Translation zu überprüfen (ivTsl). Die Mitochondrien werden 5 Minuten vor posttranslationaler Zugabe des Translationsansatzes auf Raumtemperatur erwärmt.

Der verbleibende Rest des Translationsansatzes ( $40\text{ }\mu\text{l}$ ) wird halbiert. Hierbei werden zu je einem Ansatz ( $20\text{ }\mu\text{l}$ )  $20\text{ }\mu\text{l}$  Valinomycin ( $1\text{ }\mu\text{M}$ ) behandelte Mitochondrien zugesetzt. Bei Valinomycin handelt es sich um einen Entkoppler der Atmungskette unter dessen Einfluss keine Importreaktionen stattfinden können. Dieser Ansatz dient als Negativ Kontrolle. Die verbleibenden  $20\text{ }\mu\text{l}$  des Translationsansatzes werden mit  $20\text{ }\mu\text{l}$  unbehandelter Mitochondrien versetzt. Beide mit Mitochondrien versetzten Ansätze werden für 30 Minuten bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Während dieser Zeit findet der mitochondriale Import statt. Nach Ablauf dieser Zeit wird die Importreaktion beider Ansätze durch Zugabe von  $160\text{ }\mu\text{l}$  MitoB+ $1\mu\text{M}$  Valinomycin gestoppt und die Mitochondrien durch 5-minütige Zentrifugation bei  $9.000\text{ g}$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  pelletiert. Um weitere nicht an die Mitochondrien gebundenen oder importierte Proteine zu entfernen, werden die Ansätze mit  $200\text{ }\mu\text{l}$  MitoB Puffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Mitochondrien Pellets werden anschließend in  $40\text{ }\mu\text{l}$  MitoB resuspendiert und erneut halbiert. Hierbei wird je ein Ansatz der mit Valinomycin behandelte und unbehandelte Mitochondrien einem Proteinase K-Verdau (Zugabe von  $0,25\text{ mg/ml}$  PK) unterzogen. Durch den Proteinase K-Verdau kann untersucht werden, ob und welche Proteine importiert wurden. Nicht importierte Proteine sind der Proteinase zugänglich und werden verdaut, während importierte Proteine durch die mitochondriale Membran vor dem Verdau geschützt sind. Der Ansatz des Proteinase K-Verdau in den Ansätzen mit Valinomycin behandelte Mitochondrien dient als Kontrolle für die Effizienz des Verdau durch PK. Der Verdau wird für 10 Minuten bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend durch Zugabe von  $1\text{ }\mu\text{l}$  einer  $100\text{ }\mu\text{M}$  PMSF Lösung abgestoppt. Nach Inkubation aller Ansätze mit PMSF für 10 Minuten bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  werden die verdauten und unverdauten Proben für 5 Minuten bei  $12.000\text{ g}$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert und die Pellets anschließend mit  $40\mu\text{l}$  Ladepuffer versetzt. Die Proben werden für 5 Minuten in einen Schüttler gestellt um die Mitochondrien im Lauffpuffer zu lysieren. Abschließend werden die Proben für 10 Minuten bei  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgekocht und die Proteine laut 6.4.16 detektiert.

#### 6.4.19 Co-Immunpräzipitation

Die klassische Co-Immunpräzipitation ist bei unlöslichen Proteinen (wie zytoPrP) oft ungeeignet. Pull-up Analysen haben hier den Vorteil, dass interagierende Proteine hier nicht

durch Zentrifugation co-pelletiert werden, sondern mittels eines magnetischen Feldes nach oben gezogen werden.

Für die Pull-Up Analyse wurden SH-SY5Y Zellen mit Bcl-2 und zytoPrP co-transfiziert und geerntet. Die Zellen wurden in 400 µl Co-IP-Puffer lysiert und mit 1,5 µl des Anti-Flag M2 Antikörpers für 16 Stunden und 4°C unter andauernder Rotation inkubiert. Anschließend wurde das Lysat mit 50 µl *anti-Mouse-Magnetic-Beads* für 30 Minuten im Überkopfschwenker inkubiert. Unter dem Einfluss eines magnetischen Feldes werden die magnetischen beads im Anschluss an die Seite des Eppendorf-Gefäßes gezogen und die ungebundenen Proteine wurden abgesaugt. Der Immunkomplex wurde 2-mal mit dem Co-IP-Puffer gewaschen und durch Zugabe von 60 µl 2x LSB und Aufkochen bei 95°C für 10 Minuten aufgelöst. Die Proben wurden mittels Western Blot analysiert wobei sie je auf die Anwesenheit von Bcl-2 (Anti-FLAG M2) als auch auf zytoPrP (A7) und dessen Mutanten untersucht wurde.

#### **6.4.20 Sucrose-Gradient**

Die transfizierten SH-SY5Y Zellen wurden von den Schalen abgekratzt, pelletiert und in 150 µl Gradienten-Puffer lysiert. Der Sucrose-Stufengradient bestehend aus 0,5 ml 40% gefolgt von 1 ml 30% und 1,5 ml 5% Sucrose-Lösung wurde mit den 150µl Zelllysat überschichtet und für 4 Stunden bei 16.000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Gradient wurde in 10 500µl Fraktionen von der 5% bis zur 40% Sucrose-Schicht geerntet Diese wurden mittels TCA gefällt und mit Hilfe des Western Blots (siehe 6.4.5 und 6.4.11) analysiert.

#### **6.4.21 Isolation von Proteinen in Detergenz-resistenten-Membranen**

Detergenz-resistente Membranen (DRM) sind in eiskaltem 1% Triton X-100-haltigem Puffer unlöslich und schwimmen durch ihren Lipidanteil in Sucrose Gradienten nach oben. Um zu analysieren ob verschiedene PrP-Mutanten in DRM lokalisiert sind wurde diese Methode durchgeführt. Hierfür wurden die transfizierten Zellen geerntet, pelletiert und in 200 µl eiskaltem 1% Triton-haltigem MES-Puffer resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren wurden sie 15-mal durch eine 21 Luer Gauche Nadel auf- und abgezogen. Das Lysat wurde bei 500 g für 5 Minuten und 4°C abzentrifugiert und der lösliche Überstand wurde mittels 80% Sucrose-MES-Lösung auf 40% Sucrose eingestellt. Das 400 µl Lysat wurde mit 3 ml 30% und 1 ml 5% Sucrose-MES-Lösung überschichtet und für 18 Stunden bei 140.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Gradient wurde in 10 Fraktionen von oben nach unten geerntet und die einzelnen Proben durch TCA präzipitiert in 60 µl 2x LSB aufgenommen, aufgeköcht und mittels Western Blot analysiert (6.4.11).

## 6.5 Induktion von Zellstress

Zur Funktionsanalyse verschiedener PrP-Mutanten und von PrP<sup>C</sup> wurde deren Wirkung auf SH-SY5Y unter verschiedenen Zellstressbedingungen untersucht. Die transfizierten Zellen wurden für 3 Stunden mit unterschiedlichen Stress-Induktoren bei 37°C inkubiert und anschließend mittels des Caspase-3 Assays auf Apoptose untersucht (siehe 6.4.14.2). Die Induktoren wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Kainat: 500 µM, Kupfersulfat: 25 µM

MG132 diente sowohl der Induktion von Zellstress als auch ganz spezifisch der Inhibition des proteasomalen Abbaus von zytosolischem PrP und wurde in einer Konzentration von 30 µM eingesetzt.

### 6.5.1 Inhibition des JNK Signalwegs

Um die Aktivierung des JNK Signalwegs zu verhindern wurden die co-kultivierten Zellen direkt nach dem Einsetzen der SH-SY5Y Zellen (siehe 6.6) mit 1 µM des JNK Inhibitors II versetzt und für 20 Stunden bei 37°C inkubiert.

### 6.5.2 Inhibition des lysosomalen Abbaus

Die Inhibition des Lysosoms wurde durch Zugabe von 400 nM Bafilomycin A1 für 3 Stunden bei 37°C zu den PrP-exprimierenden SH-SY5Y Zellen erreicht.

## 6.6 Co-Kultivierungs-Analysen

SH-SY5Y Zellen wurden in 3,5 cm Zellkulturschalen die ein Glasplättchen enthielten ausplattiert und 24 Stunden später transfiziert. Zwei Stunden nach der Transfektion wurde das Glasplättchen in Zellkulturschalen mit Scrapie infizierte (ScN2a) und uninferierte (N2a) murine Neuroblastomzellen gesetzt und die Zelllinien für 20 Stunden co-kultiviert. Um ein Abkratzen der ScN2a und N2a Zellen durch das eingesetzte Glasplättchen zu verhindern wurde zu den ScN2a und N2a Zellen zum Zeitpunkt des Ausplattierens ebenfalls ein Glasplättchen der gleichen Größe eingesetzt, welches dann 4 Tage später durch das SH-SY5Y Plättchen ersetzt wurde. Die Zellen wurden nach Ablauf der 20 Stunden durch den Caspase3-Assay (siehe 6.4.14.2) oder mittels Western Blot (siehe 6.4.11) untersucht.

## 6.7 Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Alle Transfektionen wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der T-Test angewendet. Die P-Werte sind angegeben oder wie folgend definiert: \* P < 0.05, \*\* P < 0.005 und \*\*\* P < 0.0005.

## 7 Bibliographie

- Aguzzi, A., Sigurdson, C. and Heikenwaelder, M. (2008) Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu Rev Pathol*, **3**, 11-40.
- Alais, S., Simoes, S., Baas, D., Lehmann, S., Raposo, G., Darlix, J.L. and Leblanc, P. (2008) Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. *Biol Cell*.
- Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A. and Clarke, M.C. (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, **214**, 764-766.
- Appel, T.R., Dumpitak, C., Matthiesen, U. and Riesner, D. (1999) Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold. *Biol Chem*, **380**, 1295-1306.
- Aronoff-Spencer, E., Burns, C.S., Avdievich, N.I., Gerfen, G.J., Peisach, J., Antholine, W.E., Ball, H.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. and Millhauser, G.L. (2000) Identification of the Cu<sup>2+</sup> binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy. *Biochemistry*, **39**, 13760-13771.
- Bartke, T., Pohl, C., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. (2004) Dual role of BRUCE as an antiapoptotic IAP and a chimeric E2/E3 ubiquitin ligase. *Mol Cell*, **14**, 801-811.
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D.F., McKinley, M.P., Prusiner, S.B. and Weissmann, C. (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, **46**, 417-428.
- Baumann, F., Tolnay, M., Brabeck, C., Pahnke, J., Kloz, U., Niemann, H.H., Heikenwalder, M., Rulicke, T., Burkle, A. and Aguzzi, A. (2007) Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *Embo J*, **26**, 538-547.
- Bendheim, P.E., Brown, H.R., Rudelli, R.D., Scala, L.J., Goller, N.L., Wen, G.Y., Kascsak, R.J., Cashman, N.R. and Bolton, D.C. (1992) Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology*, **42**, 149-156.
- Bernoulli, C., Siegfried, J., Baumgartner, G., Regli, F., Rabinowicz, T., Gajdusek, D.C. and Gibbs, C.J., Jr. (1977) Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery. *Lancet*, **1**, 478-479.
- Blochberger, T.C., Cooper, C., Peretz, D., Tatzelt, J., Griffith, O.H., Baldwin, M.A. and Prusiner, S.B. (1997) Prion protein expression in Chinese hamster ovary cells using a glutamine synthetase selection and amplification system. *Protein Eng*, **10**, 1465-1473.
- Bolton, D.C., McKinley, M.P. and Prusiner, S.B. (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, **218**, 1309-1311.
- Borchelt, D.R., Taraboulos, A. and Prusiner, S.B. (1992) Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.*, **267**, 16188-16199.
- Bounhar, Y., Zhang, Y., Goodyer, C.G. and LeBlanc, A. (1997) Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, **276**, 39145-39149.
- Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C. and Aguzzi, A. (1996) Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature*, **379**, 339-343.
- Bresjanac, M., Smid, L.M., Vovko, T.D., Petric, A., Barrio, J.R. and Popovic, M. (2003) Molecular-imaging probe 2-(1-[6-[(2-fluoroethyl)(methyl) amino]-2-naphthyl]ethylidene) malononitrile labels prion plaques in vitro. *J Neurosci*, **23**, 8029-8033.
- Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Stome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D. and Kretzschmar, H. (1997a) The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, **390**, 684-687.
- Brown, D.R., Schulz-Schaeffer, W.J., Schmidt, B. and Kretzschmar, H.A. (1997b) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol*, **146**, 104-112.
- Brown, D.R., Wong, B.S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S.J. and Jones, I.M. (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J*, **344**, 1-5.
- Brown, P. (1990) The phantasmagoric immunology of transmissible spongiform encephalopathy. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, **68**, 305-313.
- Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.-A., Autenried, P., Aguet, M. and Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, **73**, 1339-1347.
- Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.-P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M. and Weissmann, C. (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, **356**, 577-582.

- Büeler, H., Raeber, A., Sailer, A., Fischer, M., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (1994) High prion and PrP<sup>Sc</sup> levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol. Med.*, **1**, 19-30.
- Butler, D.A., Scott, M.R.D., Bockman, J.M., Borchelt, D.R., Taraboulos, A., Hsiao, K.K., Kingsbury, D.T. and Prusiner, S.B. (1988) Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J. Virol.*, **62**, 1558-1564.
- Cao, H., Bangalore, L., Dompe, C., Bormann, B.J. and Stern, D.F. (1992) An extra cysteine proximal to the transmembrane domain induces differential cross-linking of p185neu and p185neu. *J Biol Chem*, **267**, 20489-20492.
- Caughey, B., Ernst, D. and Race, R.E. (1993) Congo red inhibition of scrapie agent replication. *J Virol*, **67**, 6270-6272.
- Caughey, B., Kocisko, D.A., Raymond, G.J. and Lansbury, P.T., Jr. (1995) Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem Biol*, **2**, 807-817.
- Caughey, B., Race, R.E., Ernst, D., Buchmeier, M.J. and Chesebro, B. (1989) Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J. Virol.*, **63**, 175-181.
- Caughey, B. and Raymond, G.J. (1991) The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem.*, **266**, 18217-18223.
- Caughey, B. and Raymond, G.J. (1993) Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol*, **67**, 643-650.
- Caughey, B., Raymond, G.J., Ernst, D. and Race, R.E. (1991a) N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J. Virol.*, **65**, 6597-6603.
- Caughey, B.W., Dong, A., Bhat, K.S., Ernst, D., Hayes, S.F. and Caughey, W.S. (1991b) Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry*, **30**, 7672-7680.
- Caughey, W.S., Raymond, L.D., Horiuchi, M. and Caughey, B. (1998) Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12117-12122.
- Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T. and Korsmeyer, S.J. (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, **8**, 705-711.
- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L. and Keith, J.M. (1985) Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*, **315**, 331-333.
- Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., Raymond, L., Favara, C., Baron, G., Priola, S., Caughey, B., Masliah, E. and Oldstone, M. (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science*, **308**, 1435-1439.
- Chiesa, R. and Harris, D.A. (2001) Prion diseases: what is the neurotoxic molecule? *Neurobiol Dis*, **8**, 743-763.
- Chiesa, R., Piccardo, P., Ghetti, B. and Harris, D.A. (1998) Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. *Neuron*, **21**, 1339-1351.
- Chipuk, J.E. and Green, D.R. (2005) Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 268-275.
- Collinge, J. (2001) Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 519-550.
- Collinge, J., Whittington, M.A., Sidle, K.C., Smith, C.J., Palmer, M.S., Clarke, A.R. and Jefferys, J.G.R. (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, **370**, 295-297.
- Davanipour, Z., Goodman, L., Alter, M., Sobel, E., Asher, D. and Gajdusek, D.C. (1984) Possible modes of transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*, **311**, 1582-1583.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B. and Martinou, J.C. (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*, **144**, 891-901.
- Dewson, G., Snowden, R.T., Almond, J.B., Dyer, M.J. and Cohen, G.M. (2003) Conformational change and mitochondrial translocation of Bax accompany proteasome inhibitor-induced apoptosis of chronic lymphocytic leukemic cells. *Oncogene*, **22**, 2643-2654.
- Ding, Q., Dimayuga, E. and Keller, J.N. (2006) Proteasome regulation of oxidative stress in aging and age-related diseases of the CNS. *Antioxid Redox Signal*, **8**, 163-172.
- Distelhorst, C.W. and Shore, G.C. (2004) Bcl-2 and calcium: controversy beneath the surface. *Oncogene*, **23**, 2875-2880.

- Dorandeu, A., Wingertsman, L., Chretien, F., Delisle, M.B., Vital, C., Parchi, P., Montagna, P., Lugaresi, E., Ironside, J.W., Budka, H., Gambetti, P. and Gray, F. (1998) Neuronal apoptosis in fatal familial insomnia. *Brain Pathol*, **8**, 531-537.
- Duffy, P., Wolf, J., Collins, G., DeVoe, A.G., Streeten, B. and Cowen, D. (1974) Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*, **290**, 692-693.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. and Martinou, J.C. (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol*, **20**, 929-935.
- Ferrer, I., Tortosa, A., Macaya, A., Sierra, A., Moreno, D., Munell, F., Blanco, R. and Squier, W. (1994) Evidence of nuclear DNA fragmentation following hypoxia-ischemia in the infant rat brain, and transient forebrain ischemia in the adult gerbil. *Brain Pathol*, **4**, 115-122.
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H. and Raposo, G. (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9683-9688.
- Fischer, M., Rüllicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.*, **15**, 1255-1264.
- Flechsig, E., Shmerling, D., Hegyi, I., Raeber, A.J., Fischer, M., Cozzio, A., von Mering, C., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (2000) Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice. *Neuron*, **27**, 399-408.
- Flechsig, E. and Weissmann, C. (2004) The role of PrP in health and disease. *Curr Mol Med*, **4**, 337-353.
- Fraser, J.R. (2002) What is the basis of transmissible spongiform encephalopathy induced neurodegeneration and can it be repaired? *Neuropathol Appl Neurobiol*, **28**, 1-11.
- Gilch, S., Winklhofer, K.F., Nunziante, M., Lucassen, R., Spielhauer, C., Muranyi, W., Groschup, M.H., Riesner, D., Tatzelt, J. and Schätzl, H.M. (2001) Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrPSc and delays onset of prion diseases. *EMBO J*, **20**, 3957-3966.
- Glatzel, M. and Aguzzi, A. (2001) The shifting biology of prions. *Brain Res Brain Res Rev*, **36**, 241-248.
- Goggin, K., Bissonnette, C., Grenier, C., Volkov, L. and Roucou, X. (2007) Aggregation of cellular prion protein is initiated by proximity-induced dimerization. *J Neurochem*, **102**, 1195-1205.
- Goping, I.S., Gross, A., Lavoie, J.N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S.J. and Shore, G.C. (1998) Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol*, **143**, 207-215.
- Graner, E., Mercadante, A.F., Zanata, S.M., Forlenza, O.V., Cabral, A.L., Veiga, S.S., Juliano, M.A., Roesler, R., Walz, R., Minetti, A., Izquierdo, I., Martins, V.R. and Brentani, R.R. (2000) Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res*, **76**, 85-92.
- Griffith, J.S. (1967) Self-replication and scrapie. *Nature*, **215**, 1043-1044.
- Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Korsmeyer, S.J. (1999) Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem*, **274**, 1156-1163.
- Haigh, C.L. and Brown, D.R. (2006) Prion protein reduces both oxidative and non-oxidative copper toxicity. *J Neurochem*, **98**, 677-689.
- Harada, H., Becknell, B., Wilm, M., Mann, M., Huang, L.J., Taylor, S.S., Scott, J.D. and Korsmeyer, S.J. (1999) Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell*, **3**, 413-422.
- Harmey, J.H., Doyle, D., Brown, V. and Rogers, M.S. (1995) The cellular isoform of the prion protein, PrPc, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **210**, 753-759.
- Hartsough, G.R. and Burger, D. (1965) Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis*, **115**, 387-392.
- Hegde, R.S., Mastrianni, J.A., Scott, M.R., DeFea, K.A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. and Lingappa, V.R. (1998) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science*, **279**, 827-834.
- Henn, I.H., Gostner, J.M., Tatzelt, J. and Winklhofer, K.F. (2005) Pathogenic mutations inactivate parkin by distinct mechanisms. *J Neurochem*, **92**, 114-122.
- Heske, J., Heller, U., Winklhofer, K.F. and Tatzelt, J. (2004) The C-terminal domain of the prion protein is necessary and sufficient for import into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **279**, 5435-5443.
- Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Maundrell, K., Castilla, J. and Soto, C. (2003) Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *Embo J*, **22**, 5435-5445.

- Higuchi, H., Endo, T. and Kaji, A. (1990) Enzymic synthesis of oligonucleotides containing methylphosphonate internucleotide linkages. *Biochemistry*, **29**, 8747-8753.
- Hipkiss, A.R. (2006) Accumulation of altered proteins and ageing: causes and effects. *Exp Gerontol*, **41**, 464-473.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L. and Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, **75**, 241-251.
- Holscher, C., Bach, U.C. and Dobberstein, B. (2001) Prion protein contains a second endoplasmic reticulum targeting signal sequence located at its C terminus. *J Biol Chem*, **276**, 13388-13394.
- Holscher, C., Delius, H. and Burkle, A. (1998) Overexpression of nonconvertible PrP<sup>Sc</sup> delta114-121 in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells leads to trans-dominant inhibition of wild-type PrP<sup>Sc</sup> accumulation. *J Virol*, **72**, 1153-1159.
- Hornemann, S. and Glockshuber, R. (1996) Autonomous and Reversible Folding of a Soluble Amino-Terminally Truncated Segment of the Mouse Prion Protein. *J. Mol. Biol.*, **262**, 614-619.
- Hornemann, S., Korth, C., Oesch, B., Riek, R., Wider, G., Wuthrich, K. and Glockshuber, R. (1997) Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Lett*, **413**, 277-281.
- Hornshaw, M.P., McDermott, J.R., Candy, J.M. and Lakey, J.H. (1995) Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, **214**, 993-999.
- Hoyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., Mathiasen, I.S. and Jaattela, M. (2007) Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell*, **25**, 193-205.
- Hsu, Y.T. and Youle, R.J. (1998) Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem*, **273**, 10777-10783.
- Hutter, G., Heppner, F.L. and Aguzzi, A. (2003) No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo. *Biol Chem*, **384**, 1279-1285.
- Jackson, G.S., Murray, I., Hosszu, L.L.P., Gibbs, N., Waltho, J.P., Clarke, A.R. and Collinge, J. (2001) Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8531-8535.
- Jarrett, J.T. and Lansbury, P.T., Jr. (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, **73**, 1055-1058.
- Jesionek-Kupnicka, D., Buczynski, J., Kordek, R. and Liberski, P.P. (1999) Neuronal loss and apoptosis in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *Folia Neuropathol*, **37**, 283-286.
- Jesionek-Kupnicka, D., Buczynski, J., Kordek, R., Sobow, T., Kloszewska, I., Papierz, W. and Liberski, P.P. (1997) Programmed cell death (apoptosis) in Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *Folia Neuropathol*, **35**, 233-235.
- Jesionek-Kupnicka, D., Kordek, R., Buczynski, J. and Liberski, P.P. (2001) Apoptosis in relation to neuronal loss in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, **61**, 13-19.
- Kane, D.J., Sarafian, T.A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Ord, T. and Bredesen, D.E. (1993) Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*, **262**, 1274-1277.
- Kaufmann, J.A., Perez, M., Zhang, W., Bickford, P.C., Holmes, D.B. and Tagliatela, G. (2003) Free radical-dependent nuclear localization of Bcl-2 in the central nervous system of aged rats is not associated with Bcl-2-mediated protection from apoptosis. *J Neurochem*, **87**, 981-994.
- Kiachopoulos, S., Heske, J., Tatzelt, J. and Winklhofer, K.F. (2004) Misfolding of the prion protein at the plasma membrane induces endocytosis, intracellular retention and degradation. *Traffic*, **5**, 426-436.
- Kim, S., Nollen, E.A., Kitagawa, K., Bindokas, V.P. and Morimoto, R.I. (2002) Polyglutamine protein aggregates are dynamic. *Nat Cell Biol*, **4**, 826-831.
- Klein, T.R., Kirsch, D., Kaufmann, R. and Riesner, D. (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.
- Kondo, K. and Kuroiwa, Y. (1982) A case control study of Creutzfeldt-Jakob disease: association with physical injuries. *Ann Neurol*, **11**, 377-381.
- Korth, C., Kaneko, K. and Prusiner, S.B. (2000) Expression of unglycosylated mutated prion protein facilitates PrP<sup>Sc</sup> formation in neuroblastoma cells infected with different prion strains. *J. Gen. Virol*, **81**, 2555-2563.
- Kretschmar, H.A., Ironside, J.W., DeArmond, S.J. and Tateishi, J. (1996) Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol*, **53**, 913-920.

- Kretzschmar, H.A., Prusiner, S.B., Stowring, L.E. and DeArmond, S.J. (1986) Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol*, **122**, 1-5.
- Kristiansen, M., Deriziotis, P., Dimcheff, D.E., Jackson, G.S., Ovaa, H., Naumann, H., Clarke, A.R., van Leeuwen, F.W., Menendez-Benito, V., Dantuma, N.P., Portis, J.L., Collinge, J. and Tabrizi, S.J. (2007) Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome. *Mol Cell*, **26**, 175-188.
- Kurschner, C. and Morgan, J.I. (1995) The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res Mol Brain Res*, **30**, 165-168.
- Kurschner, C. and Morgan, J.I. (1996) Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein. *Brain Res Mol Brain Res*, **37**, 249-258.
- Ladogana, A., Casaccia, P., Ingrosso, L., Cibati, M., Salvatore, M., Xi, Y.-G., Masullo, C. and Pocchiari, M. (1992) Sulphate polyanions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters. *J. Gen. Virol.*, **73**, 661-665.
- Lang-Rollin, I., Maniati, M., Jabado, O., Vekrellis, K., Papantonis, S., Rideout, H.J. and Stefanis, L. (2005) Apoptosis and the conformational change of Bax induced by proteasomal inhibition of PC12 cells are inhibited by bcl-xL and bcl-2. *Apoptosis*, **10**, 809-820.
- Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.O., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B. (2004) Synthetic mammalian prions. *Science*, **305**, 673-676.
- Leopoldt, J.G. (1759) Von denen mancherley Krankheiten des Schaafviehes, und was vor Euren damit vorgenommen werden. In *Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zu der Landwirthschaft. Fünf Theile*. Christian Friedrich Günthern, Berlin und Glogau, pp. 344-360.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S. and Korsmeyer, S.J. (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, **2**, 183-192.
- Li, A., Christensen, H.M., Stewart, L.R., Roth, K.A., Chiesa, R. and Harris, D.A. (2007) Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105-125. *Embo J*, **26**, 548-558.
- Li, A. and Harris, D.A. (2005) Mammalian prion protein suppresses Bax-induced cell death in yeast. *J Biol Chem*, **280**, 17430-17434.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**, 491-501.
- Liberski, P.P., Brown, D.R., Sikorska, B., Caughey, B. and Brown, P. (2008) Cell death and autophagy in prion diseases (transmissible spongiform encephalopathies). *Folia Neuropathol*, **46**, 1-25.
- Liberski, P.P., Sikorska, B., Bratosiewicz-Wasik, J., Gajdusek, D.C. and Brown, P. (2004) Neuronal cell death in transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases) revisited: from apoptosis to autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 2473-2490.
- Lin, B., Kolluri, S.K., Lin, F., Liu, W., Han, Y.H., Cao, X., Dawson, M.I., Reed, J.C. and Zhang, X.K. (2004) Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell*, **116**, 527-540.
- Lobao-Soares, B., Walz, R., Carlotti, C.G., Jr., Sakamoto, A.C., Calvo, F., Terzian, A.L., da Silva, J.A., Wichert-Ana, L., Coimbra, N.C. and Bianchin, M.M. (2007) Cellular prion protein regulates the motor behaviour performance and anxiety-induced responses in genetically modified mice. *Behav Brain Res*, **183**, 87-94.
- Lopes, M.H., Hajj, G.N., Muras, A.G., Mancini, G.L., Castro, R.M., Ribeiro, K.C., Brentani, R.R., Linden, R. and Martins, V.R. (2005) Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci*, **25**, 11330-11339.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**, 481-490.
- Ma, J. and Lindquist, S. (2001) Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14955-14960.
- Ma, J. and Lindquist, S. (2002) Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP<sup>Sc</sup>-like conformation in the cytosol. *Science*, **298**, 1785-1788.
- Ma, J., Wollmann, R. and Lindquist, S. (2002) Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science*, **298**, 1781-1785.
- Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klohn, P.C., Brandner, S. and Collinge, J. (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science*, **302**, 871-874.

- Manson, J.C., Hope, J., Clarke, A.R., Johnston, A., Black, C. and MacLeod, N. (1995) PrP gene dosage and long term potentiation. *Neurodegeneration*, **4**, 113-114.
- Massaad, C.A., Portier, B.P. and Tagliavola, G. (2004) Inhibition of transcription factor activity by nuclear compartment-associated Bcl-2. *J Biol Chem*, **279**, 54470-54478.
- Mathai, J.P., Germain, M., Marcellus, R.C. and Shore, G.C. (2002) Induction and endoplasmic reticulum location of BIK/NBK in response to apoptotic signaling by E1A and p53. *Oncogene*, **21**, 2534-2544.
- McKinley, M.P., Bolton, D.C. and Prusiner, S.B. (1983) A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell*, **35**, 57-62.
- McLennan, N.F., Brennan, P.M., McNeill, A., Davies, I., Fotheringham, A., Rennison, K.A., Ritchie, D., Brannan, F., Head, M.W., Ironside, J.W., Williams, A. and Bell, J.E. (2004) Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *Am J Pathol*, **165**, 227-235.
- Meier, P., Genoud, N., Prinz, M., Maissen, M., Rulicke, T., Zurbriggen, A., Raeber, A.J. and Aguzzi, A. (2003) Soluble dimeric prion protein binds PrP(Sc) in vivo and antagonizes prion disease. *Cell*, **113**, 49-60.
- Mikhailov, V., Mikhailova, M., Pulkrabek, D.J., Dong, Z., Venkatachalam, M.A. and Saikumar, P. (2001) Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*, **276**, 18361-18374.
- Milhavet, O. and Lehmann, S. (2002) Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev*, **38**, 328-339.
- Mironov, A.J., Latawiec, D., Wille, H., Bouzamondo-Bernstein, E., Legname, G., Williamson, R.A., Burton, D., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. and Peters, P.J. (2003) Cytosolic prion protein in neurons. *J Neurosci*, **23**, 7183-7193.
- Mitteregger, G., Vosko, M., Krebs, B., Xiang, W., Kohlmansperger, V., Nolting, S., Hamann, G.F. and Kretzschmar, H.A. (2007) The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein. *Brain Pathol*, **17**, 174-183.
- Monnet, C., Gavard, J., Mege, R.M. and Sobel, A. (2004) Clustering of cellular prion protein induces ERK1/2 and stathmin phosphorylation in GT1-7 neuronal cells. *FEBS Lett*, **576**, 114-118.
- Moore, R.C., Lee, I.Y., Silverman, G.L., Harrison, P.M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S.H., Chishti, M.A., Liang, Y., Mastrangelo, P., Wang, K., Smit, A.F.A., Katamine, S., Carlson, G.A., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Melton, D.W., Tremblay, P., Hood, L.E. and Westaway, D. (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein Doppel. *J.Mol.Biol.*, **292**, 797-817.
- Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J.L., Lehmann, S., Launay, J.M. and Kellermann, O. (2000) Signal Transduction Through Prion Protein. *Science*, **289**, 1925-1928.
- Munter, L.M., Voigt, P., Harmeier, A., Kaden, D., Gottschalk, K.E., Weise, C., Pipkorn, R., Schaefer, M., Langosch, D. and Multhaup, G. (2007) GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *Embo J*, **26**, 1702-1712.
- Murphy, K.M., Streips, U.N. and Lock, R.B. (2000) Bcl-2 inhibits a Fas-induced conformational change in the Bax N terminus and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem*, **275**, 17225-17228.
- Nakano, K. and Vousden, K.H. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, **7**, 683-694.
- Nechushtan, A., Smith, C.L., Hsu, Y.T. and Youle, R.J. (1999) Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *Embo J*, **18**, 2330-2341.
- Nishimura, T., Sakudo, A., Nakamura, I., Lee, D.C., Taniuchi, Y., Saeki, K., Matsumoto, Y., Ogawa, M., Sakaguchi, S., Itohara, S. and Onodera, T. (2004) Cellular prion protein regulates intracellular hydrogen peroxide level and prevents copper-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **323**, 218-222.
- Norstrom, E.M. and Mastrianni, J.A. (2005) The AGAAAAGA palindrome in PrP is required to generate a productive PrPSc-PrPC complex that leads to prion propagation. *J Biol Chem*, **280**, 27236-27243.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. and Tanaka, N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, **288**, 1053-1058.
- Oesch, B., Westaway, D., Wälchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B.H., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E., Prusiner, S.B. and Weissmann, C. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, **40**, 735-746.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L. and Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, **74**, 609-619.
- Orsi, A., Fioriti, L., Chiesa, R. and Sitia, R. (2006) Conditions of endoplasmic reticulum stress favor the accumulation of cytosolic prion protein. *J Biol Chem*, **281**, 30431-30438.

- Pan, K.-M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (1993) Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10962-10966.
- Park, S.K., Choi, S.I., Jin, J.K., Choi, E.K., Kim, J.I., Carp, R.I. and Kim, Y.S. (2000) Differential expression of Bax and Bcl-2 in the brains of hamsters infected with 263K scrapie agent. *Neuroreport*, **11**, 1677-1682.
- Parry, H.B. (1962) Scrapie: a transmissible and hereditary disease of sheep. *Heredity*, **17**, 75-105.
- Pasinelli, P., Belford, M.E., Lennon, N., Bacskai, B.J., Hyman, B.T., Trott, i.D. and Brown, R.H. (2004) Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron*, **43**, 19-30.
- Pauly, P.C. and Harris, D.A. (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem*, **273**, 33107-33110.
- Pearson, G.R., Gruffydd-Jones, T.J., Wyatt, J.M., Hope, J., Chong, A., Scott, A.C., Dawson, M. and Wells, G.A. (1991) Feline spongiform encephalopathy. *Vet Rec*, **128**, 532.
- Perez, D. and White, E. (2000) TNF-alpha signals apoptosis through a bid-dependent conformational change in Bax that is inhibited by E1B 19K. *Mol Cell*, **6**, 53-63.
- Peters, P.J., Mironov, A.J., Peretz, D., Van Donselaar, E., Leclerc, E., Erpel, S., DeArmond, S.J., Burton, D.R., Williamson, R.A., Vey, M. and Prusiner, S.B. (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol*, **162**, 703-717.
- Porat, Y., Abramowitz, A. and Gazit, E. (2006) Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem Biol Drug Des*, **67**, 27-37.
- Priola, S.A., Caughey, B., Wehrly, K. and Chesebro, B. (1995) A 60-kDa prion protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP. *J Biol Chem*, **270**, 3299-3305.
- Priola, S.A., Raines, A. and Caughey, W.S. (2000) Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science*, **287**, 1503-1506.
- 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. (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13363-13383.
- Prusiner, S.B., McKinley, M.P., Groth, D.F., Bowman, K.A., Mock, N.I., Cochran, S.P. and Masiarz, F.R. (1981) Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 6675-6679.
- Prusiner, S.B., Scott, M., Foster, D., Pan, K.-M., Groth, D., Miranda, C., Torchia, M., Yang, S.-L., Serban, D., Carlson, G.A., Hoppe, P.C., Westaway, D. and DeArmond, S.J. (1990) Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, **63**, 673-686.
- Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M. and Strasser, A. (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell*, **3**, 287-296.
- Quaglio, E., Chiesa, R. and Harris, D.A. (2001) Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform. *J Biol Chem*, **276**, 11432-11438.
- Rambold, A.S., Miesbauer, M., Rapaport, D., Bartke, T., Baier, M., Winklhofer, K.F. and Tatzelt, J. (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., Muller, V., Ron, U., Ben-Tal, N., Winklhofer, K.F. and Tatzelt, J. (2008) Stress-protective signalling of prion protein is corrupted by scrapie prions. *Embo J*.
- Rangel, A., Burgaya, F., Gavin, R., Soriano, E., Aguzzi, A. and Del Rio, J.A. (2007a) 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.
- Rangel, A., Burgaya, F., Gavin, R., Soriano, E., Aguzzi, A. and Del Rio, J.A. (2007b) 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.
- Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmezas, C.I. and Weiss, S. (1997) The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med*, **3**, 1383-1388.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. and Wuthrich, K. (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature*, **382**, 180-182.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R. and Wuthrich, K. (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett*, **413**, 282-288.

- Rogers, M., Yehiely, F., Scott, M. and Prusiner, S.B. (1993) Conversion of truncated and elongated prion proteins into the scrapie isoform in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3182-3186.
- Roucou, X., Guo, Q., Zhang, Y., Goodyer, C.G. and LeBlanc, A.C. (2003) Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *J Biol Chem*, **278**, 40877-40881.
- Roucou, X. and LeBlanc, A.C. (2005) Cellular prion protein neuroprotective function: implications in prion diseases. *J Mol Med*, **83**, 3-11.
- Saarma, M. (2001) GDNF recruits the signaling crew into lipid rafts. *Trends Neurosci*, **24**, 427-429.
- Saborio, G.P., Permanne, B. and Soto, C. (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, **411**, 810-813.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sailer, A., Büeler, H., Fischer, M., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (1994) No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell*, **77**, 967-968.
- Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., Irie, S., Iwama, N., Boise, L.H., Thompson, C.B., Golemis, E., Fong, L., Wang, H.G. and et al. (1994) Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9238-9242.
- Schätzl, H.M., Laszlo, L., Holtzman, D.M., Tatzelt, J., DeArmond, S.J., Weiner, R.I., Mobley, W.C. and Prusiner, S.B. (1997) A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J. Virol.*, **71**, 8821-8831.
- Schiff, E., Campana, V., Tivodar, S., Lebreton, S., Gousset, K. and Zurzolo, C. (2008) Coexpression of Wild-type and Mutant Prion Proteins Alters Their Cellular Localization and Partitioning into Detergent-resistant Membranes. *Traffic*.
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschwender, M., Adam, D., Mentlein, R., Kabelitz, D. and Schutze, S. (2004) Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity*, **21**, 415-428.
- Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blättler, T., Brandner, S., Götz, J., Rüllicke, T., Flechsig, E., Cozzio, A., von Mehring, C., Hangartner, C., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell*, **93**, 203-214.
- Shyng, S.L., Heuser, J.E. and Harris, D.A. (1994) A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol*, **125**, 1239-1250.
- Shyu, W.C., Harn, H.J., Saeki, K., Kubosaki, A., Matsumoto, Y., Onodera, T., Chen, C.J., Hsu, Y.D. and Chiang, Y.H. (2002) Molecular modulation of expression of prion protein by heat shock. *Mol Neurobiol*, **26**, 1-12.
- Shyu, W.C., Lin, S.Z., Chiang, M.F., Ding, D.C., Li, K.W., Chen, S.F., Yang, H.I. and Li, H. (2005) Overexpression of PrPC by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model. *J Neurosci*, **25**, 8967-8977.
- Sikorska, B. (2004) Mechanisms of neuronal death in transmissible spongiform encephalopathies. *Folia Neuropathol*, **42 Suppl B**, 89-95.
- Sikorska, B., Liberski, P.P., Giraud, P., Kopp, N. and Brown, P. (2004) Autophagy is a part of ultrastructural synaptic pathology in Creutzfeldt-Jakob disease: a brain biopsy study. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 2563-2573.
- Silveira, J.R., Raymond, G.J., Hughson, A.G., Race, R.E., Sim, V.L., Hayes, S.F. and Caughey, B. (2005) The most infectious prion protein particles. *Nature*, **437**, 257-261.
- Solforosi, L., Criado, J.R., McGavern, D.B., Wirz, S., Sanchez-Alavez, M., Sugama, S., DeGiorgio, L.A., Volpe, B.T., Wiseman, E., Abalos, G., Maslah, E., Gilden, D., Oldstone, M.B., Conti, B. and Williamson, R.A. (2004) Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science*, **303**, 1514-1516.
- Sparkes, R.S., Simon, M., Cohn, V.H., Fournier, R.E., Lem, J., Klisak, I., Heinzmann, C., Blatt, C., Lucero, M., Mohandas, T. and et al. (1986) Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 7358-7362.
- Spielhaupt, C. and Schätzl, H.M. (2001) PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J Biol Chem*, **276**, 44604-44612.
- Spudich, A., Frigg, R., Kilic, E., Kilic, U., Oesch, B., Raeber, A., Bassetti, C.L. and Hermann, D.M. (2005) Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1. *Neurobiol Dis*, **20**, 442-449.

- Stahl, N., Baldwin, M.A., Teplow, D.B., Hood, L., Gibson, B.W., Burlingame, A.L. and Prusiner, S.B. (1993) Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry*, **32**, 1991-2002.
- Stöckel, J., Safar, J., Wallace, A.C., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (1998) Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry*, **37**, 7185-7193.
- Sumudhu, W., Perera, S. and Hooper, N.M. (2001) Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Cur Biol*, **11**, 519-523.
- Sundararajan, R. and White, E. (2001) E1B 19K blocks Bax oligomerization and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis. *J Virol*, **75**, 7506-7516.
- Sunyach, C., Jen, A., Deng, J., Fitzgerald, K.T., Frobert, Y., Grassi, J., McCaffrey, M.W. and Morris, R. (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J*, **22**, 3591-3601.
- Suzuki, M., Youle, R.J. and Tjandra, N. (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, **103**, 645-654.
- Tagliavini, F., McArthur, R.A., Canciani, B., Giaccone, G., Porro, M., Bugiani, M., Lievens, P.M., Bugiani, O., Peri, E., Dall'Ara, P., Rocchi, M., Poli, G., Forloni, G., Bandiera, T., Varasi, M., Suarato, A., Cassutti, P., Cervini, M.A., Lansen, J., Salmona, M. and Post, C. (1997) Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters. *Science*, **276**, 1119-1122.
- Tagliavini, F., Prelli, F., Verga, L., Giaccone, G., Sarma, R., Gorevic, P., Ghetti, B., Passerini, F., Ghibaudi, E., Forloni, G. and et al. (1993) Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9678-9682.
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L. and Prusiner, S.B. (1995) Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol*, **129**, 121-132.
- Tatzelt, J., Prusiner, S.B. and Welch, W.J. (1996) Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J*, **15**, 6363-6373.
- Tatzelt, J., Zuo, J.R., Voellmy, R., Scott, M., Hartl, U., Prusiner, S.B. and Welch, W.J. (1995) Scrapie prions selectively modify the stress response in neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2944-2948.
- Taylor, D.R., Watt, N.T., Perera, W.S. and Hooper, N.M. (2005) Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci*, **118**, 5141-5153.
- Tegethoff, S., Behlke, J. and Scheidereit, C. (2003) Tetrameric oligomerization of I $\kappa$ B kinase gamma (IKKgamma) is obligatory for IKK complex activity and NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*, **23**, 2029-2041.
- Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B. (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., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rülicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A. and Manson, J.C. (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*, **380**, 639-642.
- Uelhoff, A., Tatzelt, J., Aguzzi, A., Winklhofer, K.F. and Haass, C. (2005) A pathogenic PrP mutation and doppel interfere with polarized sorting of the prion protein. *J Biol Chem*, **280**, 5137-5140.
- Vassallo, N. and Herms, J. (2003) Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J Neurochem*, **86**, 538-544.
- Vella, L.J., Sharples, R.A., Lawson, V.A., Masters, C.L., Cappai, R. and Hill, A.F. (2007) Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol*, **211**, 582-590.
- Vernace, V.A., Schmidt-Glenewinkel, T. and Figueiredo-Pereira, M.E. (2007) Aging and regulated protein degradation: who has the UPPer hand? *Aging Cell*, **6**, 599-606.
- Viles, J.H., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Goodin, D.B., Wright, P.E. and Dyson, H.J. (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.
- Waggoner, D.J., Drisaldi, B., Bartnikas, T.B., Casareno, R.L., Prohaska, J.R., Gitlin, J. and Harris, D.A. (2000) Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J Biol Chem*, **275**, 7455-7458.
- Walmsley, A.R., Zeng, F. and Hooper, N.M. (2003) The N-terminal region of the prion protein ectodomain contains a lipid raft targeting determinant. *J Biol Chem*, **278**, 37241-37248.

- Walz, R., Amaral, O.B., Rockenbach, I.C., Roesler, R., Izquierdo, I., Cavalheiro, E.A., Martins, V.R. and Brentani, R.R. (1999) Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia*, **40**, 1679-1682.
- Wang, X., Wang, F., Arterburn, L., Wollmann, R. and Ma, J. (2006) The interaction between cytoplasmic prion protein and the hydrophobic lipid core of membrane correlates with neurotoxicity. *J Biol Chem*, **281**, 13559-13565.
- Warwicker, J. (2000) Modeling a prion protein dimer: predictions for fibril formation. *Biochem Biophys Res Commun*, **278**, 646-652.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. and Korsmeyer, S.J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, **292**, 727-730.
- Weise, J., Crome, O., Sandau, R., Schulz-Schaeffer, W., Bahr, M. and Zerr, I. (2004) Upregulation of cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. *Neurosci Lett*, **372**, 146-150.
- Weise, J., Sandau, R., Schwarting, S., Crome, O., Wrede, A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I. and Bahr, M. (2006) Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke*, **37**, 1296-1300.
- Wells, G.A.H., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Jeffrey, M., Dawson, M. and Bradley, R. (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, **121**, 419-420.
- Westaway, D., Cooper, C., Turner, S., Da Costa, M., Carlson, G.A. and Prusiner, S.B. (1994) Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6418-6422.
- Westergard, L., Christensen, H.M. and Harris, D.A. (2007) The cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>): Its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta*, **1772**, 629-644.
- Williams, E.S. and Young, S. (1980) Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis*, **16**, 89-98.
- Winklhofer, K.F., Heske, J., Heller, U., Reintjes, A., Muranji, W., Moarefi, I. and Tatzelt, J. (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**, 14961-14970.
- Winklhofer, K.F., Reintjes, A., Hoener, M.C., Voellmy, R. and Tatzelt, J. (2001) Geldanamycin restores a defective heat shock response in vivo. *J Biol Chem*, **276**, 45160-45167.
- Winklhofer, K.F. and Tatzelt, J. (2000) Cationic lipopolyamines induce degradation of PrP<sup>Sc</sup> in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *Biol Chem*, **381**, 463-469.
- Winklhofer, K.F., Tatzelt, J. and Haass, C. (2008) The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *Embo J*, **27**, 336-349.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G. and Youle, R.J. (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*, **139**, 1281-1292.
- Yedidia, Y., Horonchik, L., Tzaban, S., Yanai, A. and Taraboulos, A. (2001) Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *Embo J*, **20**, 5383-5391.
- Yost, C.S., Lopez, C.D., Prusiner, S.B., Myers, R.M. and Lingappa, V.R. (1990) Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein. *Nature*, **343**, 669-672.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell*, **7**, 673-682.
- Zanata, S.M., Lopes, M.H., Mercadante, A.F., Hajji, G.N., Chiarini, L.B., Nomizo, R., Freitas, A.R., Cabral, A.L., Lee, K.S., Juliano, M.A., De Oliveira, E., Jachieri, S.G., Burlingame, A., Huang, L., Linden, R., Brentani, R.R. and Martins, V.R. (2002) Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *Embo J*, **21**, 3307-3316.
- Zanusso, G., Petersen, R.B., Jin, T., Jing, Y., Kanoush, R., Ferrari, S., Gambetti, P. and Singh, N. (1999) Proteasomal degradation and N-terminal protease resistance of the codon 145 mutant prion protein. *J Biol Chem*, **274**, 23396-23404.
- Zong, W.X., Lindsten, T., Ross, A.J., MacGregor, G.R. and Thompson, C.B. (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev*, **15**, 1481-1486.

## 8 Glossar

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAK	Bcl-2 homologous antagonist/killer
BAX	Bcl-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bid	Bcl-2-interacting death protein
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
Ci	Curie
Da	Dalton
DAPI	4', 6-Diamidino-2- phenylindoldihydrochlorid
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsufoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholat
DRM	Detergenz-resistente Membranen
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhances Chemiluminescence</i>
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
Hsp	Hitzeschockprotein
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa/kD	Molekulargewicht von Proteinen

---

MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MG132	Carboxybenzoyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucinal
NEM	N-Ethyl-Maleimid
ODx	optische Dichte bei $\lambda = x$ nm
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PrP	Prion-Protein
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> - Ionenkonzentration
Ponceau S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfophenylazo)-phenylazo]-2,7 naphthalendisulfonsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SAP	Alkalische Phosphatase ( <i>shrimp alkaline phosphatase</i> )
Sarkosyl	N-Lauroylsarkosin
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfate</i> )
SOD	Superoxiddismutase
SS	Signalsequenz
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrosefaktor $\alpha$
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	Enzymaktivität, Umsetzung von 1 $\mu$ mol Substanz/min, 1U = 1,667 * 10 <sup>-8</sup> Kat
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
wt	Wildtyp

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

## 9 Lebenslauf

**Name:** Angelika Rambold  
**Adresse:** Auenstrasse 33  
80469 München  
Tel.: 089/72656869  
**Geburtsdatum:** 7. Februar 1978  
**Geburtsort:** München  
**Familienstand:** ledig

---

**Doktorarbeit:** seit April 2004 in der Gruppe von **Prof. Dr. Jörg Tatzelt**  
Thema: Funktionelle Charakterisierung des Prion-Proteins –  
physiologische Aktivität und pathophysiologische Alteration

1/2006 bis 6/2008 Ludwig-Maximilians Universität, München  
Prof. Dr, Jörg Tatzelt, Labor für Neurobiochemie

4/2004 bis 12/2005 Max-Planck Institut für Biochemie (MPI),  
Martinsried, Abteilung für zelluläre Biochemie, AG Dr. Jörg  
Tatzelt

**Studium:** 1998 bis 2004 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians  
Universität, München  
Diplomarbeit: AG Tatzelt, MPI für Biochemie, Martinsried  
Thema: Mechanismen und pathophysiologische Konsequenzen  
der Generierung von zytosolischem Prion-Protein

# Association of Bcl-2 with Misfolded Prion Protein Is Linked to the Toxic Potential of Cytosolic PrP

Angelika S. Rambold,\* Margit Miesbauer,\* Doron Rapaport,<sup>†</sup> Till Bartke,<sup>‡</sup> Michael Baier,<sup>§</sup> Konstanze F. Winklhofer,\*<sup>||</sup> and Jörg Tatzelt\*<sup>||</sup>

\*Department of Biochemistry, Neurobiochemistry, Ludwig-Maximilians-Universität München, D-80336 München, Germany; <sup>†</sup>Institut für Physiologische Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München, D-81377 München, Germany; <sup>‡</sup>Department of Pathology, University of Cambridge, Cambridge CB2 1QP, United Kingdom; and <sup>§</sup>Robert-Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany

Submitted January 27, 2006; Revised April 17, 2006; Accepted May 10, 2006  
Monitoring Editor: Jonathan Weissman

**Protein misfolding is linked to different neurodegenerative disorders like Alzheimer's disease, polyglutamine, and prion diseases. We investigated the cytotoxic effects of aberrant conformers of the prion protein (PrP) and show that toxicity is specifically linked to misfolding of PrP in the cytosolic compartment and involves binding of PrP to the anti-apoptotic protein Bcl-2. PrP targeted to different cellular compartments, including the cytosol, nucleus, and mitochondria, adopted a misfolded and partially proteinase K-resistant conformation. However, only in the cytosol did the accumulation of misfolded PrP induce apoptosis. Apoptotic cell death was also induced by two pathogenic mutants of PrP, which are partially localized in the cytosol. A mechanistic analysis revealed that the toxic potential is linked to an internal domain of PrP (amino acids 115–156) and involves coaggregation of cytosolic PrP with Bcl-2. Increased expression of the chaperones Hsp70 and Hsp40 prevented the formation of PrP/Bcl-2 coaggregates and interfered with PrP-induced apoptosis. Our study reveals a compartment-specific toxicity of PrP misfolding that involves coaggregation of Bcl-2 and indicates a protective role of molecular chaperones.**

## INTRODUCTION

Prion diseases are a group of transmissible neurodegenerative disorders including Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (GSS) in humans, scrapie in sheep and goat, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle and chronic wasting disease (CWD) in free-ranging deer. A hallmark of prion diseases is the conversion of the cellular prion protein PrP<sup>C</sup> into PrP<sup>Sc</sup>, a misfolded and proteinase K (PK)-resistant isoform, which is the main component of infectious prions (reviewed in Weissmann *et al.*, 1996; Prusiner *et al.*, 1998; Collinge, 2001; Chesebro, 2003; Aguzzi and Polymenidou, 2004).

In the majority of prion diseases neurodegeneration is tightly linked to the propagation of infectious prions. However, transgenic mouse models revealed that misfolding or mistargeting of PrP<sup>C</sup> can induce neuronal cell death in the absence of infectious prions. Vice versa, propagation of infectious prions was observed without inducing neuronal cell death, but only when PrP<sup>C</sup> is not expressed in neurons (reviewed in Winklhofer and Tatzelt, 2006). Moreover, neuronal expression of a secreted PrP mutant devoid of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor sustains propagation of infectious prions in the absence of clinical symptoms (Chesebro *et al.*, 2005).

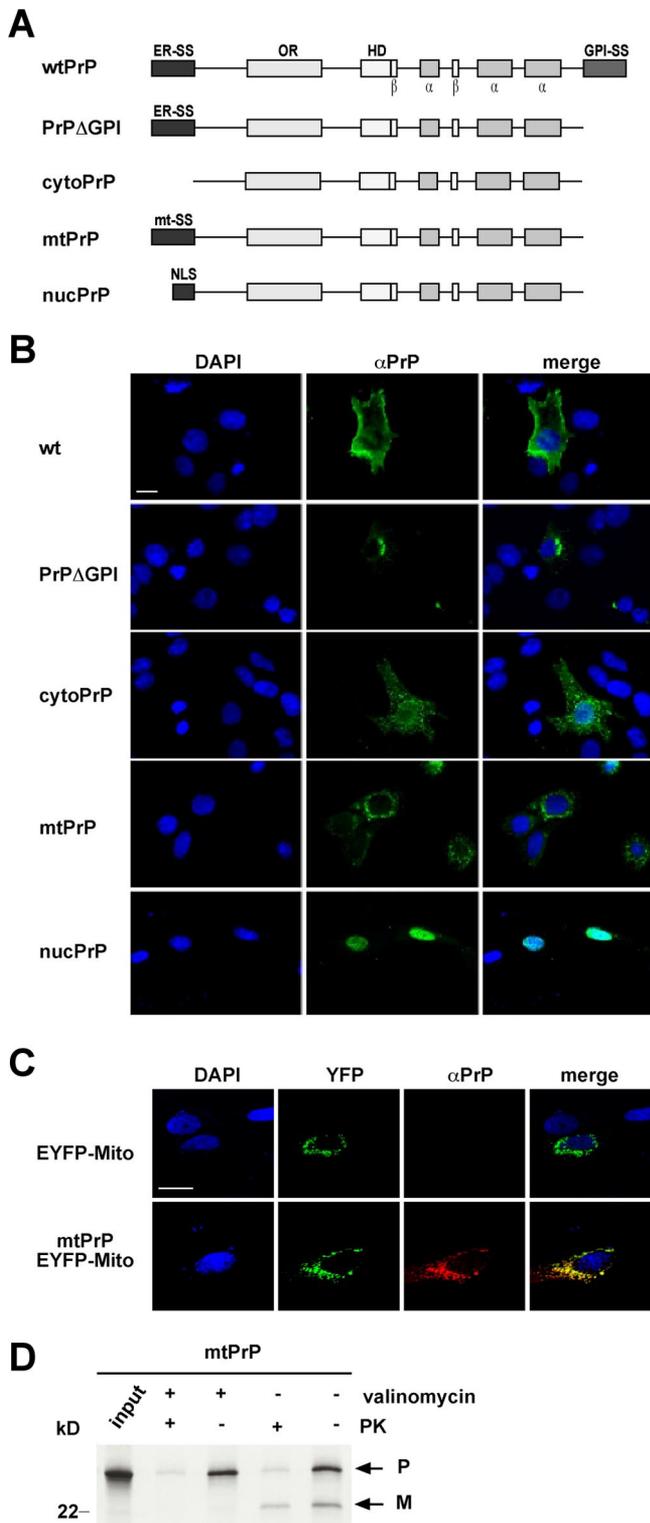
The biogenesis of PrP<sup>C</sup> is characterized by a series of co- and posttranslational modifications (reviewed in Tatzelt and Winklhofer, 2004). It involves import of the nascent chain into the endoplasmic reticulum (ER) and the attachment of two N-linked core glycans and a GPI anchor. After processing of the glycans into complex structures in the Golgi compartment, PrP<sup>C</sup> is targeted to the outer leaflet of the plasma membrane.

Several studies indicated that PrP can acquire a neurotoxic potential when its import into the ER is partially or completely compromised. Lingappa and coworkers demonstrated that during import into the ER, PrP can attain two different transmembrane topologies termed C<sup>tm</sup>PrP and N<sup>tm</sup>PrP (Yost *et al.*, 1990). Interestingly, increased synthesis of C<sup>tm</sup>PrP has been shown to coincide with progressive neurodegeneration both in GSS syndrome patients with an A117V mutation and in transgenic mice carrying a triple mutation within the hydrophobic domain (AV3; Hegde *et al.*, 1998; Stewart *et al.*, 2005). A different transgenic mouse model revealed that preventing the import of PrP into the ER leads to the formation of a neurotoxic PrP species. Mice expressing a PrP mutant with a deleted N-terminal ER targeting signal (cytoPrP) acquired severe ataxia due to cerebellar degeneration and gliosis (Ma *et al.*, 2002). Earlier results already indicated that both wild-type PrP and a PrP mutant associated with an inherited prion disease in humans can be found in the cytosol and are subjected to proteasomal degradation (Ma and Lindquist, 2001; Yedidia *et al.*, 2001). Cytotoxic effects of cytoPrP were also observed in some cell culture models (Ma *et al.*, 2002; Rane *et al.*, 2004), whereas in other studies expression of cytoPrP seemed not to interfere with cellular viability (Roucou *et al.*, 2003; Fioriti *et al.*, 2005). Support for a toxic potential of cytosolically localized PrP was also obtained in a yeast model. During posttranslational targeting of

This article was published online ahead of print in *MBC in Press* (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E06-01-0083>) on May 17, 2006.

<sup>||</sup> These authors contributed equally to this work.

Address correspondence to: Jörg Tatzelt (Joerg.Tatzelt@med.uni-muenchen.de).



**Figure 1.** Specific targeting of PrP to different cellular compartments. (A) Schematic presentation of the PrP mutants analyzed. ER-SS, ER signal sequence; OR, octarepeat; HD, hydrophobic domain;  $\alpha$ , alpha helix;  $\beta$ , beta strand; GPI-SS, GPI anchor signal sequence; mt-SS, mitochondrial signal sequence; NLS, nuclear localization signal. All mutants are devoid of the GPI-SS (aa 231–253). (B) SH-SY5Y cells were transiently transfected with plasmids encoding wild-type PrP or the mutant prion proteins and analyzed by indirect immunofluorescence using the anti-PrP mAb 3F4 ( $\alpha$ PrP). Nuclei were stained with DAPI. (C) Confocal images of SH-SY5Y

PrP to the ER, PrP was missorted to the cytosol and interfered with yeast growth (Heller *et al.*, 2003).

So far, mutations within the N-terminal signal sequence of PrP, which could affect the efficiency of ER import, have not been identified in patients suffering from prion diseases. The analysis of PrP-W145Stop, however, revealed that a pathogenic PrP mutant linked to GSS syndrome, is found in the cytosolic and nuclear compartment (Zanusso *et al.*, 1999). Further studies including a different pathogenic mutant, PrP-Q160Stop, corroborated these findings and revealed that information in the C-terminal domain of PrP is necessary and sufficient for import into the endoplasmic reticulum (Heske *et al.*, 2004).

In this study, we directed PrP to different cellular compartments and analyzed the impact on cell viability. Although in all compartments analyzed PrP adopted a detergent-insoluble, partially PK-resistant conformation, only cytosolic PrP interfered with cell viability and induced apoptosis. The apoptotic potential of cytosolic PrP was linked to an internal domain of PrP, comprising the hydrophobic domain and helix 1, and correlated with the binding of Bcl-2 to misfolded PrP. Binding of Bcl-2 to PrP, as well as apoptosis, could be prevented by the increased expression of Hsp70 and its cochaperone Hsp40, indicating a protective role of chaperones in PrP-induced toxicity.

## MATERIALS AND METHODS

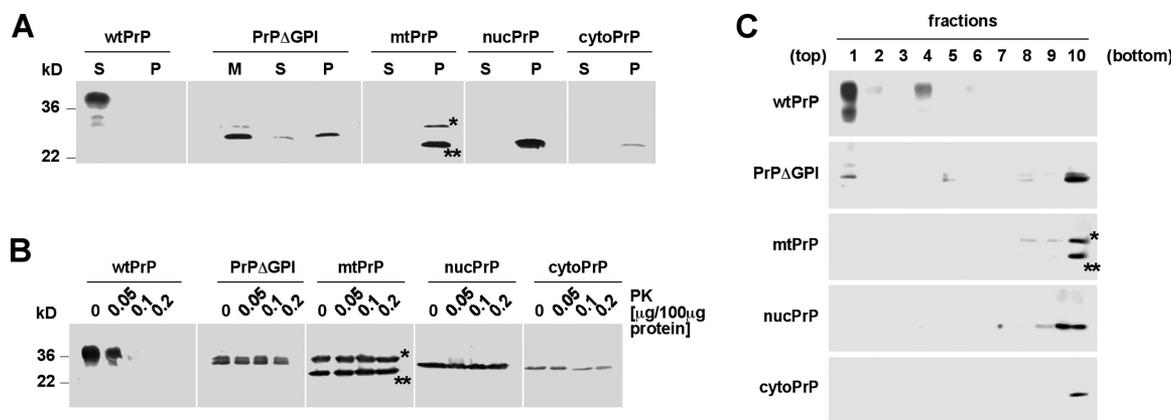
### Antibodies and Reagents

The following antibodies were used: anti-PrP 3F4 monoclonal antibody (mAb; Kacsak *et al.*, 1987), anti-PrP 3B5 mAb (Krasemann *et al.*, 1996), anti-PrP antiserum A7 (Winkhofer *et al.*, 2003a), anti-ACTIVE caspase-3 polyclonal antibody (pAb; Promega, Madison, WI), anti-Hsp40 pAb (Stressgen, Victoria, British Columbia, Canada), anti-Bcl-2 mouse mAb (BD Biosciences, San Diego, CA), anti-GAPDH mouse mAb (6C5; Calbiochem, La Jolla, CA), Cy3-conjugated anti-mouse IgG antibody and Cy3-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Dianova, Hamburg, Germany), anti-FLAG M2 mAb (Sigma, Deisenhofen, Germany), anti-FLAG pAb (rabbit, Sigma), anti-GFP mAb (Roche, Indianapolis, IN). The following reagents were used: MG132 (Calbiochem), PK (Roche), and staurosporin and valinomycin (Sigma). The mounting medium Mowiol (Calbiochem) was supplemented with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma).

### Plasmids

The following constructs were described previously: wtPrP, PrP $\Delta$ GPI (Winkhofer *et al.*, 2003c), Q160Stop, W145Stop, cytoPrP (Heske *et al.*, 2004), and EYFP-Hsp70, Hsp40 (Kim *et al.*, 2002; Winkhofer *et al.*, 2003b). All amino acid numbers refer to the mouse PrP sequence (GenBank accession number M18070). For the generation of PrP targeted to the nucleus (nucPrP) or mitochondria (mtPrP), the authentic ER signal sequence of PrP<sup>C</sup> was replaced by the nuclear localization signal of SV40 large T antigen (MDPKKKRKV) or the mitochondrial signal sequence of subunit 1 of the ubiquinol cytochrome C reductase complex (MAASAVCRAACSGTQVLLRTRRRSPALLRPRALRGATATFA), respectively. Human XIAP with a N-terminal FLAG-tag (MDYKDDDDDK) was described earlier (Bartke *et al.*, 2004). FLAG-Bcl-2 was generated by fusing a FLAG-tag (DYKDDDDK) to the C-terminus of human Bcl-2 (GenBank accession number AAA51813). As a mitochondrial marker pEYFP-Mito vector (Clontech, Heidelberg, Germany) was used.

cells coexpressing mtPrP and EYFP-Mito, which is specifically targeted to mitochondria. Indirect immunofluorescence was performed using the anti-PrP mAb 3F4. (D) mtPrP is imported into mitochondria in vitro. mtPrP cDNA was translated in vitro and the radiolabeled mtPrP (input) was incubated with isolated mitochondria for 20 min at 25°C. To one sample valinomycin was added (valinomycin +) to inhibit mitochondrial import. After import, each sample was divided into two aliquots. From one aliquot the mitochondria were pelleted directly and boiled in sample buffer (PK -). The other aliquot was first treated with PK (500  $\mu$ g/ml; PK +). All samples were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. P, precursor with the uncleaved mitochondrial targeting signal sequence; M, mature protein. Bars, 15  $\mu$ m.



**Figure 2.** PrP mutants adopt a misfolded and partially PK-resistant conformation. (A–C) SH-SY5Y cells were transiently transfected with wild-type PrP<sup>C</sup> or the indicated PrP mutants and analyzed 24 h after transfection. (A) Cells were lysed in cold buffer A and fractionated by centrifugation. PrP present in the detergent-soluble (S) and -insoluble (P) fractions was analyzed by Western blotting using the mAb 3F4. In case of PrP $\Delta$ GPI, secretion of PrP was analyzed in addition. Cells were cultivated for 3 h in serum-free medium at 37°C, and PrP present in the medium was then analyzed by Western blotting (PrP $\Delta$ GPI, M). (B) Total cell lysates were treated with increasing concentrations of PK as indicated at 4°C for 30 min. Residual PrP was detected by Western blotting. Molecular size markers are indicated as bars on the left side of the panels. (C) Cells were lysed in gradient buffer (0.5% Triton X-100) and placed on top of a 30–40% sucrose step gradient. After ultracentrifugation 10 fractions were collected from the top of the gradient and analyzed by Western blotting using the anti-PrP antibody 3F4. Precursor and mature form of mtPrP are indicated by \* and \*\*, respectively.

### Cell Culture, Transfection, Proteasomal Inhibition, and Proteinase K Digestion

SH-SY5Y cells were cultivated as described earlier (Winklhofer *et al.*, 2003c). Cells cultivated on a 3.5-cm cell culture dish (Nunc, Wiesbaden-Biebrich, Germany) were transfected with a total of 2  $\mu$ g DNA by a liposome-mediated method using LipofectAMINE Plus reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's instructions. To keep the amount of transfected cytoPrP constant, a plasmid expressing EYFP or ECFP under the same promoter was added to a total of 2  $\mu$ g DNA. The proteasomal inhibitor MG132 was dissolved in dimethyl sulfoxide, added to the cell culture medium (30  $\mu$ M), and incubated for 3 h at 37°C. For proteolysis experiments, cells were lysed in cold buffer A (0.5% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate [DOC] in phosphate-buffered saline [PBS]) and incubated for 30 min at 4°C with PK at the concentrations indicated. The reaction was terminated by addition of Pefabloc SC (Roche) and boiling in Laemmli sample buffer. Residual PrP was detected by Western blotting.

### Detergent Solubility Assay, Western Blotting, and Sucrose Step Gradient

As described earlier (Tatzelt *et al.*, 1996), cells were washed twice with cold saline buffer (PBS), scraped off the plate, pelleted by centrifugation, and lysed in cold buffer A. After centrifugation the detergent-soluble and -insoluble fractions were analyzed by Western blotting. To examine the secretion of PrP into the cell culture supernatant, cells were cultivated in serum-free medium for 3 h at 37°C. Medium was collected, and proteins precipitated with trichloroacetic acid (TCA) and then analyzed by Western blotting. SDS-PAGE and Western blotting were described previously (Winklhofer and Tatzelt, 2000). For sucrose step gradient analysis, cells were lysed in 150  $\mu$ l gradient buffer containing 0.1% Triton X-100, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 5% glycerol. The gradient was performed as described earlier (Henn *et al.*, 2005). Ten fractions were collected from the top of the gradient. The proteins were precipitated by TCA and analyzed by Western blotting.

### Scrapie Infection and Preparation of Brain Extracts

Intracerebral infections of C57B/6 mice with scrapie-strain 139A were carried out as previously described (Schultz *et al.*, 2004). Brain extracts were prepared in buffer A (10% w/vol) and fractionated by centrifugation into the detergent-soluble and -insoluble fraction as described above. For PK digestion the whole lysate was adjusted to 1% Sarkosyl and incubated with PK (50  $\mu$ g/ml) for 1 h at 37°C. The reaction was terminated by addition of Pefabloc SC and boiling in Laemmli sample buffer. Residual PrP was detected by Western blotting using the anti-PrP antiserum A7.

### In Vitro Translation and Mitochondrial Import Assay

The in vitro translation was carried out by using the TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) by following the manufacturer's instructions. After translation the samples were used for the

mitochondrial import assay as described earlier (Stan *et al.*, 2003). Protein import in yeast mitochondria was performed in SI buffer (3% BSA [w/vol], 0.5 M sorbitol, 50 mM HEPES-KOH, 80 mM KCl, 10 mM MgAc, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP, 2 mM NADH, pH 7.2). Protease treatment of mitochondria was performed by incubation with PK for 15 min on ice, followed by the addition of 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride for 5 min as described before. Products were analyzed by SDS-PAGE. Gels were impregnated with Amplify (GE Healthcare, Waukesha, WI) and exposed to film.

### Metabolic Labeling and Immunoprecipitation

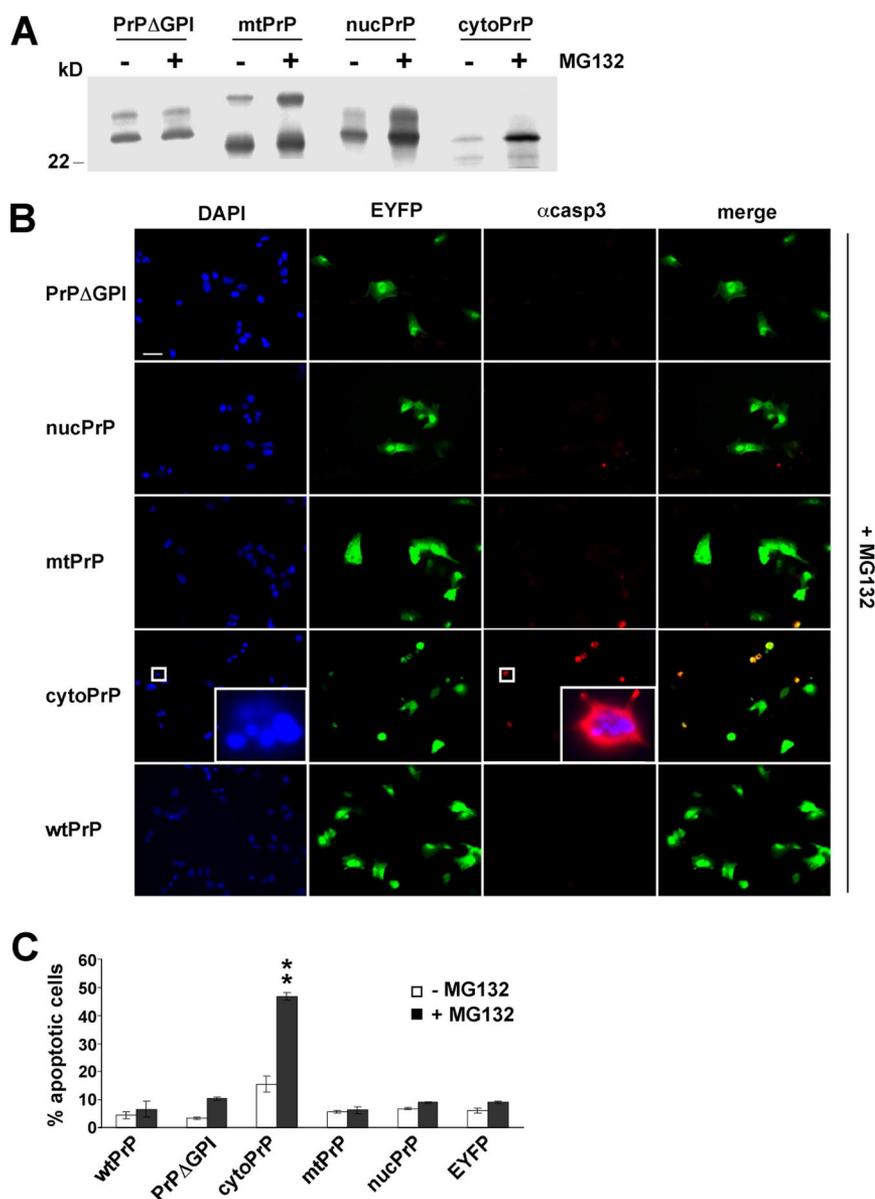
Cells were starved for 30 min in methionine-free minimum Eagle's medium (Invitrogen) and subsequently labeled for 45 min with 300  $\mu$ Ci/ml Promix [L-<sup>35</sup>S] in vitro cell label mix (Amersham Biosciences, Braunschweig, Germany; >37 TBq/mmol) in methionine-free minimum Eagle's medium (pulse). When indicated, the proteasomal inhibitor MG132 was present during starvation, labeling, and chase periods (30  $\mu$ M final concentration). For the chase, labeling medium was removed, cells were washed twice and then incubated in complete medium for 30 min at 37°C. Immunoprecipitation of PrP was performed as described earlier (Winklhofer *et al.*, 2003c). For the immunoprecipitation experiments, low-detergent buffer (0.1% Triton X-100 in PBS) was used for cell lysis and incubation with the antibody. Proteins present in the immunopellet were released by boiling in buffer B (Triton X-100, DOC, Sarkosyl, 0.5% each in PBS) and subjected to a second immunoprecipitation under nonnative conditions.

### Co-pullup Experiments

Cells were lysed in low-detergent buffer (0.1% Triton X-100 in PBS) and incubated for 16 h with anti-FLAG M2 mAb at 4°C. To extract FLAG-tagged Bcl-2 proteins, the cell lysate was incubated with magnetic anti-mouse IgG-DYNAbeads (Invitrogen) for 2 h and exposed to a magnetic field for 2 min to pull up bound immunocomplexes. Unbound material was removed and analyzed by Western blotting. After washing, the immunocomplexes were dissolved by boiling in Laemmli sample buffer and analyzed for bound cytoPrP by Western blotting, using the anti-PrP antibody A7. Anti-FLAG M2 mAb was used to detect the Bcl-2 constructs.

### Indirect Immunofluorescence and Apoptosis Assay

For indirect immunofluorescence experiments, SH-SY5Y cells were grown on glass coverslips, fixed with 3% PFA for 20 min, and permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min at room temperature. The primary antibody was incubated for 45 min at 37°C in PBS containing 1% BSA. After extensive washing with cold PBS, an incubation with the Cy3-conjugated secondary antibody followed at 37°C for 30 min. For detection of apoptosis, cells were fixed and permeabilized as described above. Blocking of the cells was performed with 5% horse serum and 0.1% Tween 20 in PBS for 1 h at room temperature. Cells were then incubated with anti-ACTIVE caspase-3 antibody overnight at 4°C, followed by Cy3-conjugated secondary antibody for 1 h at



**Figure 3.** PrP misfolding in the cytosol induces apoptosis. (A) PrP localized in the cytosol and nucleus is degraded by the proteasome. Transiently transfected SH-SY5Y cells were labeled for 45 min with [ $^{35}$ S]methionine in the presence (MG132 +) or absence (MG132 -) of the proteasome inhibitor MG132 (30  $\mu$ M). PrP was then analyzed by immunoprecipitation using the mAb 3F4. (B and C) Cytosolic PrP induces apoptosis after inhibition of the proteasome. SH-SY5Y cells were cotransfected with EYFP and PrP mutants as indicated. Twenty-four hours after transfection cells were incubated with MG132 (30  $\mu$ M) at 37°C for 3 h, fixed, permeabilized, and analyzed by indirect immunofluorescence. Activation of caspase-3 was detected by using the anti-ACTIVE caspase-3 pAb. Nuclei were stained with DAPI. (C) Quantification of apoptosis. One thousand transfected cells were counted in at least three independent experiments. Shown is the percentage of apoptotic cells among the transfected cells. \*\* $p < 0.001$  compared with all other PrP mutants and the EYFP control. Bars, 40  $\mu$ m.

room temperature. Cells were mounted onto glass slides and examined by fluorescence microscopy using a Zeiss Axiovert 200M microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). To analyze the apoptotic potential of the various PrP constructs, the number of activated caspase-3-positive cells out of 1000 transfected cells was determined. All quantifications were based on at least three independent experiments. Confocal images were obtained on a Leica DM IRE2 confocal microscope (Leica, Heidelberg, Germany) and evaluated with the Leica confocal software version 2.6.1.

#### Statistical Analysis

Data were expressed as means  $\pm$  SE. All experiments were performed in duplicates and repeated at least three times. Statistical analysis among groups was performed using student's *t* test. P-values are as follows: \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , and \*\*\* $p < 0.0001$ .

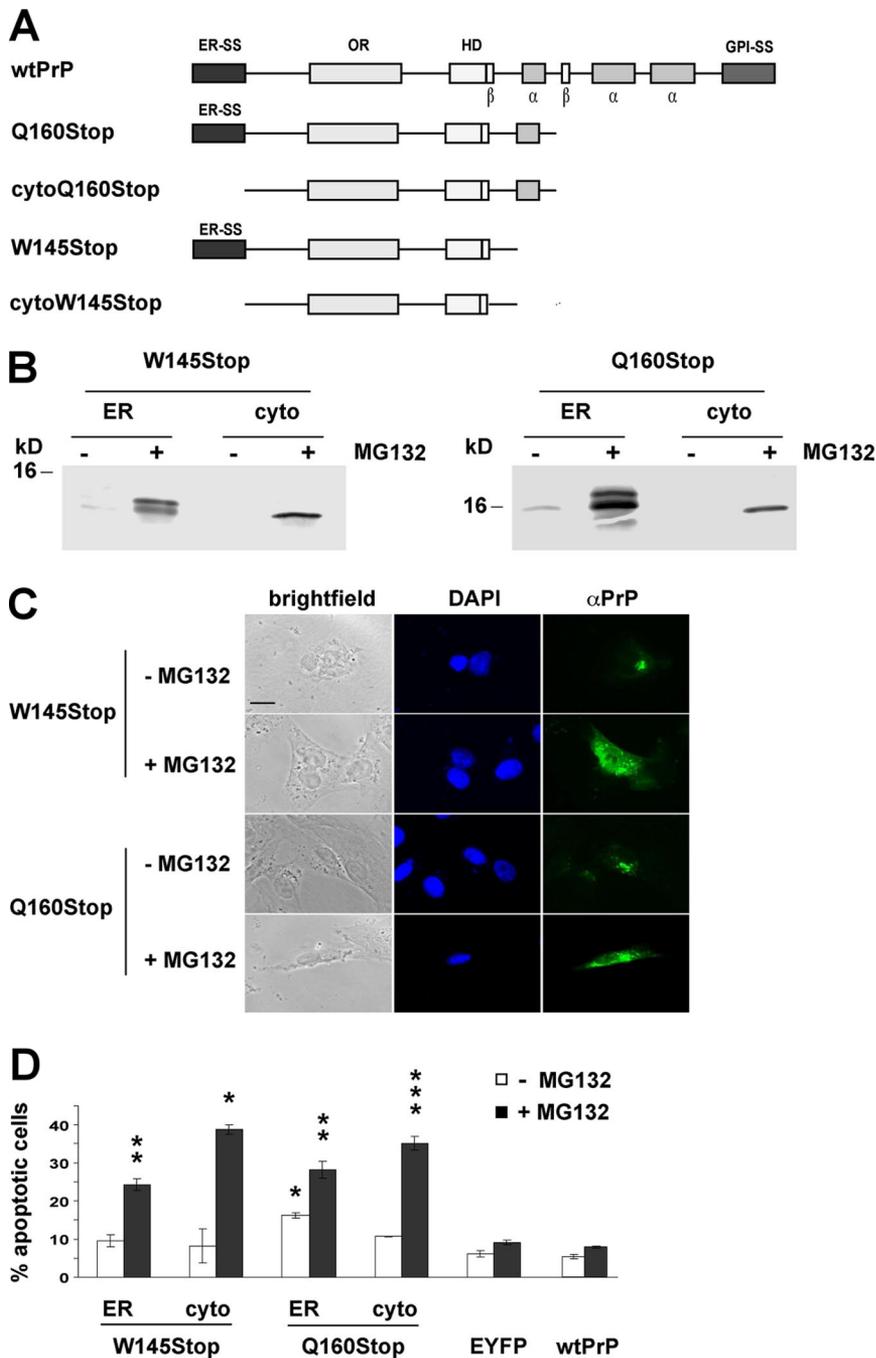
## RESULTS

### PrP Directed to Different Cellular Compartments Adopts a Misfolded Conformation

Previous studies in transgenic mice revealed that misfolding of PrP in the cytosol can induce neurodegeneration

(Ma *et al.*, 2002). The neurotoxic PrP conformer present in the cytosol (cytoPrP) is quite distinct from infectious PrP<sup>Sc</sup>. CytoPrP adopts a misfolded and partially PK-resistant conformation; however, it lacks posttranslational modifications, like the GPI anchor and N-linked carbohydrates; moreover, it does not seem to be infectious. In the present study we addressed the question of whether misfolding of PrP is cytotoxic per se or whether PrP-induced toxicity is linked to the cellular compartment in which PrP adopts a misfolded conformation.

To achieve subcellular targeting of PrP to different compartments, including the nucleus, cytosol, mitochondria and ER, the following constructs were generated: nucPrP with the nuclear localization signal (NLS) of SV40 T antigen, mtPrP with the mitochondrial signal sequence of ubiquinol cytochrome C reductase complex subunit 1, and cytoPrP lacking the authentic ER signal sequence (Figure 1A). To include a PrP conformer that misfolds in the secretory pathway, we used a mutant that contains the N-terminal ER-



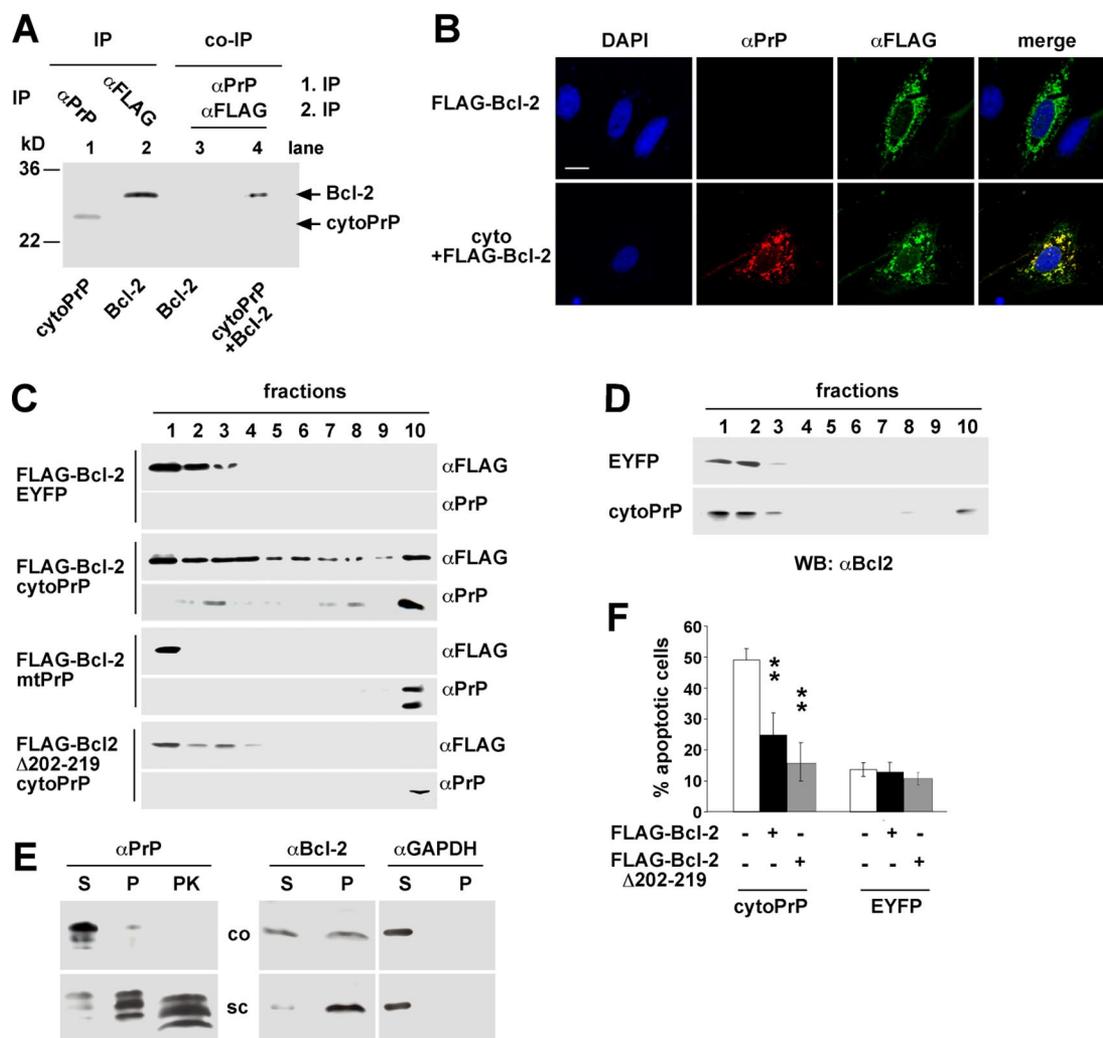
**Figure 4.** Pathogenic mutants are missorted to the cytosol and induce apoptosis. (A) Schematic presentation of two pathogenic PrP mutants linked to inherited prion diseases in humans. Two versions of each mutant were generated, one version with the authentic N-terminal ER signal sequence (ER-SS) and one for cytosolic expression by deleting the ER-SS (cyto). (B–D) Transiently transfected SH-SY5Y cells expressing the pathogenic mutants either with the ER signal sequence (ER) or without (cyto) were cultivated for 45 min (B) or 3 h (C) in the presence or in the absence of the proteasome inhibitor MG132. PrP was analyzed by immunoprecipitation (B) and indirect immunofluorescence (C) as described in Figure 3. (D) Quantification of apoptosis induced by the pathogenic PrP mutants. Apoptosis was detected by indirect immunofluorescence using the anti-ACTIVE caspase-3 pAb. Shown is the percentage of apoptotic cells among the transfected cells. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , and \*\*\* $p < 0.0001$  compared with EYFP-transfected cells. Bars, 15  $\mu$ m.

targeting signal but lacks the C-terminal GPI signal sequence (designated PrP $\Delta$ GPI). Targeting to and import into the ER of PrP $\Delta$ GPI is efficient, but in the secretory pathway PrP $\Delta$ GPI spontaneously adopts a misfolded conformation and is secreted (Rogers *et al.*, 1993; Blochberger *et al.*, 1997; Winklhofer *et al.*, 2003c).

First, we analyzed the subcellular localization of the different PrP constructs. Indirect immunofluorescence analysis of transiently transfected SH-SY5Y cells revealed that the targeting sequences efficiently directed PrP to the respective cellular compartments (Figure 1B). Targeting of PrP into mitochondria was further confirmed using an *in vitro* import assay and colocalization analysis (Figure 1, C and D). In addition, import of PrP $\Delta$ GPI into the ER was corroborated

by the detection of secreted PrP $\Delta$ GPI in the cell culture supernatant (Figure 2A). Notably, SH-SY5Y cells do not express significant levels of endogenous PrP<sup>C</sup> (unpublished data). Thus, only the heterologously expressed PrP constructs are detected in our assays.

To compare the conformation of PrP in different cellular compartments, we made use of three biochemical assays: solubility in detergent buffer, sensitivity to a limited PK digestion, and a sedimentation analysis on a sucrose step gradient. In contrast to wild-type PrP<sup>C</sup>, all PrP mutants, including PrP $\Delta$ GPI, were mainly insoluble in detergent buffer (Figure 2A) and showed an increased resistance to proteolytic digestion (Figure 2B). In addition, all mutants formed aggregates. Protein extracts of transiently trans-



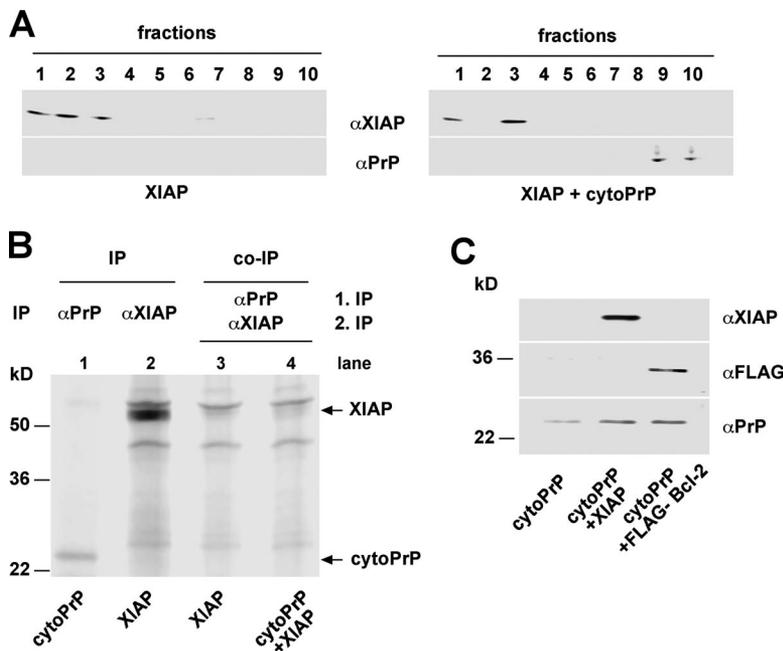
**Figure 5.** CytoPrP binds to and induces aggregation of Bcl-2. (A and B) CytoPrP interacts with Bcl-2 in SH-SY5Y cells. (A) For coimmunoprecipitation experiments (lanes 3 and 4) SH-SY5Y cells were transfected with cytoPrP and FLAG-tagged Bcl-2 (lane 4) or with Bcl-2 only (lane 3). Cells were metabolically labeled for 45 min in the presence of MG132 (30  $\mu$ M) and lysed in low-detergent buffer. After immunoprecipitation of PrP under native conditions with the anti-PrP antibody 3B5 (1. IP,  $\alpha$ PrP), proteins released from the immunopellet were subjected to a second immunoprecipitation under nonnative conditions using an anti-FLAG antibody (2. IP,  $\alpha$ FLAG). As a control, PrP and Bcl-2 were analyzed by immunoprecipitation under nonnative conditions (lanes 1 and 2). (B) Transfected cells were analyzed by indirect immunofluorescence using the anti-FLAG pAb and the PrP-specific 3F4 mAb by confocal microscopy. (C) CytoPrP induces aggregation of Bcl-2 but not of Bcl-2 $\Delta$ 202-219. Cells were cotransfected with FLAG-tagged Bcl-2 or Bcl-2 $\Delta$ 202-219 and either EYFP, cytoPrP, or mtPrP. Total cell lysates were prepared in gradient buffer, loaded on a 30–40% sucrose step gradient, and centrifuged at 200,000  $\times$  g for 90 min at 4°C. Ten fractions were collected from the top of the gradient, proteins were precipitated by TCA and immunoblotted for FLAG-Bcl-2 and PrP, respectively. A long exposure image was used for FLAG-Bcl-2 + cytoPrP ( $\alpha$ PrP) to show that cytoPrP also localizes to the upper fractions of the gradient. (D) CytoPrP interacts with endogenous Bcl-2. SH-SY5Y cells were transfected with either EYFP or cytoPrP. CytoPrP-induced aggregation of endogenous Bcl-2 was analyzed by centrifugation through a 30–40% sucrose step gradient as described in C. (E) Brain extracts of terminally scrapie-ill (sc) and control (co) mice were prepared and fractionated by centrifugation into the detergent-soluble (S) and -insoluble fraction (P). Samples were analyzed by Western blotting for PrP, Bcl-2, and GAPDH, respectively. In addition, one sample was digested with proteinase K to specifically detect PrP<sup>Sc</sup> ( $\alpha$ PrP, PK). (F) Overexpression of Bcl-2 and Bcl-2 $\Delta$ 202-219 interferes with cytoPrP-induced apoptosis. Cells were transfected with cytoPrP alone or cotransfected with cytoPrP and Bcl-2 or Bcl-2 $\Delta$ 202-219. Apoptotic cells were identified by indirect immunofluorescence using the anti-ACTIVE caspase-3 pAb. Shown is the percentage of apoptotic cells among the transfected cells. \*\*p < 0.001 compared with cytoPrP-expressing cells. Bars, 15  $\mu$ m.

fecting cells were applied on top of a sucrose step gradient. After centrifugation all mutant PrP constructs were found in the bottom fraction, whereas wild-type PrP<sup>C</sup> remained in the top fractions (Figure 2C).

These experiments established that PrP can efficiently be targeted to different cellular compartments. The biochemical properties of the PrP mutants present in the nucleus, cytosol, mitochondria and ER are similar and indicate the formation of misfolded and aggregated conformers.

#### Apoptosis Is Selectively Induced by Misfolding of PrP in the Cytosol

The Western blot analysis indicated that the steady state level of cytoPrP was considerably lower than that of the other PrP mutants (Figure 2A). The most plausible explanation for this phenomenon was proteasomal degradation of cytoPrP. Indeed, after proteasomal inhibition by MG132 (3 h, 30  $\mu$ M) the relative levels of cytoPrP and



**Figure 6.** CytoPrP neither interacts with nor induces aggregation of XIAP. (A) CytoPrP does not induce aggregation of XIAP. SH-SY5Y cells were transfected with XIAP and XIAP/cytoPrP, respectively. The sedimentation profile of XIAP and cytoPrP was analyzed by a sucrose step gradient as described in Figure 5. (B) XIAP does not interact with cytoPrP. SH-SY5Y cells expressing XIAP alone or in combination with cytoPrP were analyzed by coimmunoprecipitation experiments as described in Figure 5 (lanes 3 and 4). After a first immunoprecipitation under native conditions using the anti-PrP antibody 3B5, proteins in the immunopellet were analyzed by a second immunoprecipitation under nonnative conditions using an anti-XIAP antibody (lanes 3 and 4). As a control, PrP and XIAP were analyzed by immunoprecipitation under nonnative conditions from cells expressing either PrP or XIAP (lanes 1 and 2). (C) Coexpression of Bcl-2 or XIAP does not interfere with expression of cytoPrP. SH-SY5Y cells were cotransfected with cytoPrP/ECFP, cytoPrP/Bcl-2, or cytoPrP/XIAP. The cells were lysed in cold buffer A and analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies.

nucPrP were significantly increased, whereas the proteasome inhibitor had no significant effect on the relative amount of PrP imported into the ER or mitochondria (Figure 3A).

Next, we analyzed possible adverse effects of misfolded PrP on cellular viability. To identify cells undergoing apoptosis, transiently transfected neuroblastoma cells were analyzed by indirect immunofluorescence using an antibody specific for activated caspase-3. The specificity of the antibody was confirmed in control experiments with cells subjected to increasing concentrations of staurosporine, a known inducer of apoptosis. Under physiological culture conditions, expression of cytoPrP slightly increased the number of apoptotic cells, whereas expression of the other PrP mutants did not result in caspase-3 activation above control conditions, i.e., expression of wild-type PrP<sup>C</sup> or cytosolic EYFP (Figure 3C, -MG132). The cytotoxic effect of cytoPrP was significantly enhanced in cells transiently exposed to the proteasomal inhibitor MG132. Importantly, transient treatment with MG132 neither induced apoptosis in cells expressing PrP<sup>C</sup> or cytosolic EYFP nor in cells harboring misfolded PrP in the mitochondria, the nucleus, or the ER (Figure 3, B and C, +MG132). The enhanced toxicity of cytoPrP in MG132-treated cells correlated with the increased amount of cytoPrP in these cells (Figure 3A, +MG132). However, it is important to note that the increased level of cytoPrP is not sufficient to explain its cytotoxic effect, because the relative amount of cytoPrP never exceeded that of PrP<sup>ΔGPI</sup>, mtPrP, or nucPrP (Figure 3A and unpublished data). In this context it is interesting to note that a small fraction of mtPrP contained an uncleaved signal peptide, but did not induce apoptosis. It is possible that this precursor, although localized in the cytosol, is already associated with the mitochondria import machinery or bound to cytosolic proteins, like Hsp70, which are involved in targeting to and import into mitochondria.

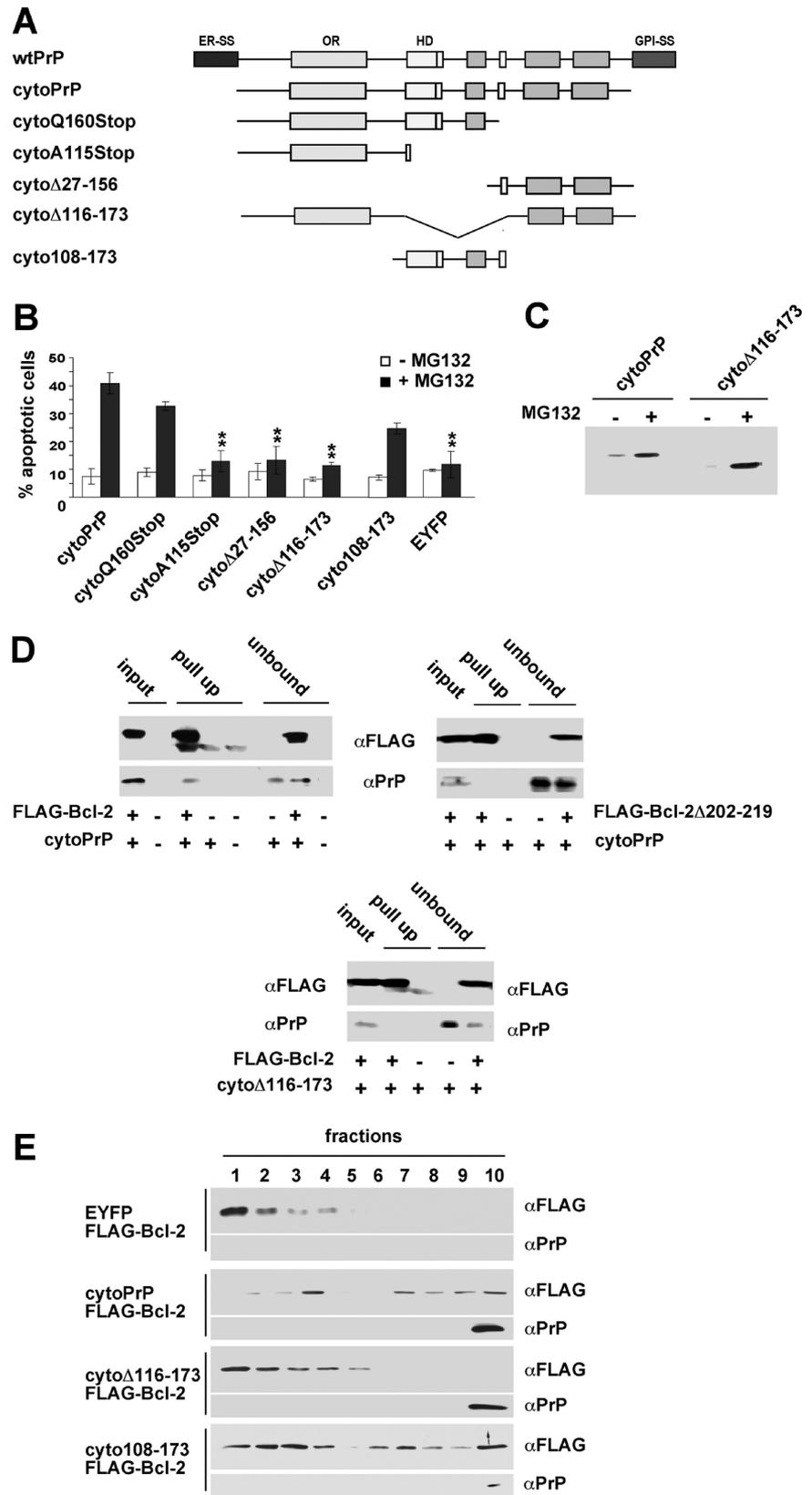
Thus, a toxic potential of misfolded PrP was specifically linked to its cytosolic localization. Cellular viability was not affected by misfolded PrP present in other cellular

compartments, be it the ER, the mitochondria, or the nucleus.

#### *Pathogenic Mutations Linked to Inherited Prion Diseases in Humans Are Mistargeted to the Cytosol and Induce Apoptosis*

The above experiments demonstrated that mistargeting of PrP to the cytosol can effectively induce apoptosis. The question remained whether such a mistargeting could play a role in the pathogenesis of human prion diseases. Previous studies indicated that upon proteasomal degradation wild-type and mutant D177N PrP accumulates in the cytosol (Ma and Lindquist, 2001; Yedidia *et al.*, 2001). Similarly, we and others showed that Q160Stop and W145Stop (Figure 4A), two pathogenic PrP mutants characterized by large C-terminal deletions, are partially present in the cytosol and are subjected to proteasomal degradation (Zanusso *et al.*, 1999; Heske *et al.*, 2004). This phenomenon is illustrated by an immunoprecipitation analysis of transiently transfected SH-SY5Y cells cultivated for 3 h in the presence of MG132 before the sample preparation (Figure 4B, +MG132). In addition, an indirect immunofluorescence analysis indicated a significant increase of cytosolically localized Q160Stop and W145Stop after transient proteasomal inhibition (Figure 4C). Two scenarios are conceivable to explain this phenomenon. Either the C-terminal deletion mutants are subjected to ER-associated protein degradation (ERAD) or their import into the ER is partially compromised.

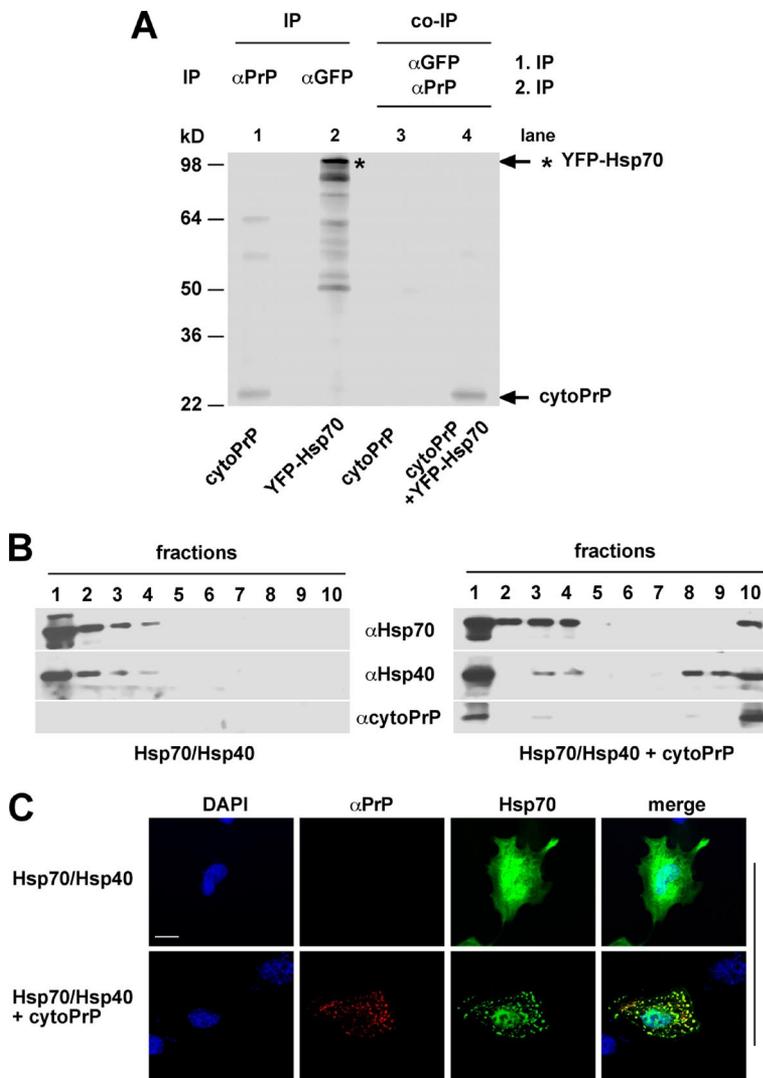
Consequently, we tested whether these pathogenic mutants can interfere with cellular viability. Indeed, expression of Q160Stop and W145Stop induced apoptosis similarly to cytoPrP (Figure 4D). To specifically analyze the cytosolic fraction of these mutants, we generated cytosolic versions of these mutants, which lack the N-terminal ER signal sequence and thus are exclusively targeted to the cytosol (Figure 4A). Apoptosis was significantly increased after the expression of cytoQ160Stop and cytoW145Stop, indicating that the cytosolic fractions seem to be responsible for the toxic effects of Q160Stop and W145Stop (Figure 4D).



**Figure 7.** The toxic potential of cytoPrP resides within the proximal part of the C-terminal domain. (A) Schematic representation of cytosolic PrP deletion mutants. (B) SH-SY5Y cells were cotransfected with EYFP and the PrP mutants as indicated. Twenty-four hours after transfection, the cells were cultivated for additional 3 h in the presence or absence of the proteasome inhibitor MG132 (30  $\mu$ M). Apoptotic cells were identified by indirect immunofluorescence using the anti-ACTIVE caspase-3 pAb. One thousand transfected cells were counted in at least three independent experiments. Shown is the percentage of apoptotic cells among the transfected cells. \*\*\**p* < 0.001 compared with cytoPrP-expressing cells. (C) Transiently transfected SH-SY5Y cells expressing the PrP mutants were cultivated 3 h in the presence or absence of the proteasome inhibitor MG132. Cells were lysed in cold buffer A and fractionated by centrifugation. PrP was analyzed by Western blotting using the mAb 3F4. (D) SH-SY5Y cells were transfected with FLAG-Bcl-2/cytoPrP, FLAG-Bcl-2Δ202-219/cytoPrP, and FLAG-Bcl-2/cytoΔ116-173 as indicated. Cells were lysed in low-detergent buffer and incubated with anti-FLAG M2 mAb. The cell lysate was subjected to pull up experiments using magnetic beads coupled with anti-mouse IgG. Bound immunocomplexes (pull up) and unbound material (unbound) were analyzed for cytoPrP by immunoblotting using the 3F4 mAb. (E) Cells were cotransfected with FLAG-tagged Bcl-2 and PrP constructs as indicated. Total cell lysates were prepared in gradient buffer, loaded on a 30–40% sucrose step gradient, and centrifuged at 200,000  $\times$  *g* for 90 min at 4°C. Ten fractions were collected from the top of the gradient, proteins were precipitated by TCA, and immunoblotted for FLAG-Bcl-2 and PrP.

These findings revealed that two pathogenic PrP mutants, linked to inherited prion diseases in humans, are missorted to the cytosol and induce apoptosis. In addition, these ex-

periments indicated that the distal region of the globular C-terminal domain (aa 146–231) is dispensable for the toxic effect of cytosolic PrP.



**Figure 8.** Cytosolic chaperones interact with cytoPrP. (A) The cytosolic chaperone Hsp70 interacts with cytoPrP in SH-SY5Y cells. For coimmunoprecipitations, SH-SY5Y cells were cotransfected with cytoPrP and YFP-Hsp70 (lane 4) or with cytoPrP only (lane 3). Cells were metabolically labeled for 45 min in the presence of MG132 (30  $\mu$ M) and lysed in low-detergent buffer. After an immunoprecipitation of YFP-Hsp70 under native conditions with the anti-GFP antibody (1. IP,  $\alpha$ GFP) proteins in the immunopellet were subjected to a second immunoprecipitation under nonnative conditions using the anti-PrP mAb 3F4 (2. IP,  $\alpha$ PrP). As a control, expression of PrP and YFP-Hsp70 was analyzed by immunoprecipitation under nonnative conditions (lanes 1 and 2). (B and C) The cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp40 coaggregate with cytoPrP. Cells were cotransfected with YFP-Hsp70/Hsp40 or YFP-Hsp70/Hsp40/cytoPrP. (B) Total cell lysates were prepared in gradient buffer, loaded on a 30–40% sucrose step gradient and centrifuged at 200,000  $\times$  g for 90 min at 4°C. Ten fractions were collected from the top of the gradient, proteins were precipitated by TCA and immunoblotted for YFP-Hsp70, Hsp40, and PrP, respectively. (C) Confocal images of SH-SY5Y cells coexpressing Hsp70/Hsp40 and cytoPrP. Indirect immunofluorescence was performed using the anti-PrP mAb 3F4. YFP-Hsp70 is shown in green, and nuclei are stained with DAPI. Bars, 15  $\mu$ m.

**Cytosolic PrP Binds to and Coaggregates with Bcl-2**

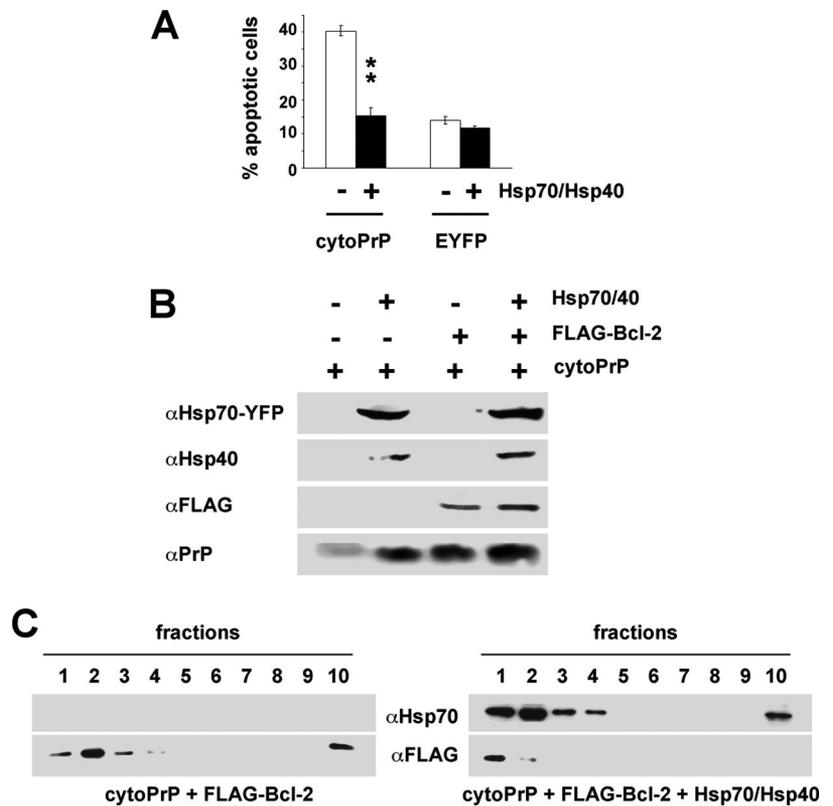
Previous in vitro studies showed that PrP can interact with the anti-apoptotic protein Bcl-2 and mapped the interaction site to the carboxy terminus of Bcl-2 (aa 200–236; Kurschner and Morgan, 1995, 1996). Consequently, we tested whether an interaction of cytosolic PrP with Bcl-2 occurs in our cell culture model. First, we analyzed a possible interaction of PrP with Bcl-2 by coimmunoprecipitation experiments. Transiently transfected cells expressing both cytoPrP and FLAG-tagged Bcl-2 were metabolically labeled with [<sup>35</sup>S]methionine. The cells were then lysed in low-detergent buffer, and PrP was immunoprecipitated with the mAb 3B5 under native conditions. Proteins bound to the immunopellet were subsequently released by boiling in detergent buffer B, and a second immunoprecipitation was performed using the anti-FLAG antibody to isolate FLAG-tagged Bcl-2. Bcl-2 copurified under these conditions, indicating that cytoPrP interacts with Bcl-2 in neuronal cells (Figure 5A, lane 4). Importantly, the same procedure did not purify Bcl-2 from cells that do not express cytoPrP (Figure 5A, lane 3) or from cells expressing wtPrP (unpublished data). Moreover, Bcl-2 $\Delta$ 202–219, a mutant with a deletion in the PrP-interacting domain (Kurschner and Morgan, 1996), did not interact with cytoPrP either (see Figure 7D). In addition, we demonstrated colo-

calization of cytoPrP with Bcl-2 in intact cells by indirect immunofluorescence (Figure 5B).

To analyze whether the interaction of Bcl-2 with PrP has an impact on the biochemical properties of Bcl-2, cells were cotransfected with FLAG-tagged Bcl-2 and either EYFP or cytoPrP or mtPrP. Protein extracts were prepared in gradient buffer and layered on top of a sucrose step gradient. After centrifugation 10 fractions were collected and analyzed by Western blotting. In the absence of cytoPrP, Bcl-2 remained in the top fractions (Figure 5C, EYFP). In cells coexpressing cytoPrP, however, Bcl-2 cosedimented with cytoPrP and was also found in the bottom fraction (Figure 5C, cytoPrP). Notably, no sedimentation of Bcl-2 was observed in the presence of mitochondrial PrP (Figure 5C, mtPrP). Similarly, FLAG-Bcl-2 $\Delta$ 202–219 was not recruited into cytoPrP aggregates (Figure 5C, FLAG-Bcl-2 $\Delta$ 202–219). Coaggregation was not restricted to overexpressed FLAG-Bcl-2 as cytoPrP also induced aggregation of endogenous Bcl-2 (Figure 5D). In this context it is important to note that the cells coexpressing Bcl-2 and cytoPrP were vital and did not undergo apoptosis, due to the overexpression of Bcl-2.

Assuming that the aggregation of Bcl-2 could be of pathophysiological relevance to prion diseases, we analyzed Bcl-2 in brain extracts prepared from terminally scrapie-ill mice.

**Figure 9.** Cytosolic chaperones interfere with cytoPrP-induced apoptosis and aggregation of Bcl-2. (A) Overexpression of Hsp70 and Hsp40 interferes with PrP-induced apoptosis. SH-SY5Y cells were transfected as indicated and treated with MG132 (30  $\mu$ M) for 3 h. Apoptotic cells were identified by indirect immunofluorescence using the anti-ACTIVE caspase-3 pAb. The percentage of apoptotic cells among the transfected cells is shown. \*\* $p < 0.001$  compared with cytoPrP-expressing cells. (B) Coexpression of Bcl-2 or Hsp70/40/Bcl-2 does not interfere with the expression of cytoPrP. To keep the amount of transfected cytoPrP constant, a plasmid expressing EYFP under the same promoter was added to a total of 2  $\mu$ g DNA. Cells were lysed in cold buffer A and analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies. (C) Overexpression of Hsp70 and Hsp40 interferes with PrP-induced aggregation of Bcl-2. SH-SY5Y cells were transiently cotransfected with cytoPrP/Bcl-2 and cytoPrP/Bcl-2/YFP-Hsp70/Hsp40, respectively. Whole cell lysates were analyzed on a 30–40% sucrose step gradient. Fractions were collected and immunoblotted against YFP-Hsp70 and FLAG-Bcl-2.



In contrast to the uninfected control, Bcl-2 was predominantly detergent-insoluble in the scrapie-diseased brain (Figure 5E, sc). Of note, infection of the brain with scrapie-prions did not cause protein aggregation in general. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a cytosolic protein, was found in the detergent-soluble fraction in both the control and scrapie-infected brain samples (Figure 5E).

If the interaction of PrP with Bcl-2 correlates with the toxic potential of cytoPrP, coexpression of Bcl-2 should alleviate the apoptotic effects of cytoPrP. To test this possibility, apoptosis was analyzed in cells expressing both Bcl-2 and cytoPrP. Indeed, the coexpression of both Bcl-2 and Bcl-2 $\Delta$ 202–219 interfered with cytoPrP-induced apoptosis (Figure 5F).

In response to apoptotic signals, the release of mitochondrial factors such as cytochrome c leads to the activation of caspase-9 and further on to that of caspase-3. XIAP, a known inhibitor of caspase-9 and -3, suppressed cytoPrP-induced apoptosis when overexpressed in cultured cells. Nonetheless, cytoPrP neither interacted with XIAP in coimmunoprecipitation experiments, nor did it induce the aggregation of XIAP (Figure 6, A and B). This further indicates that cytoPrP does not randomly coaggregate with anti-apoptotic proteins. Notably, the relative levels of cytoPrP were not decreased by the coexpression of Bcl-2 or XIAP (Figure 6C).

#### *The Toxic Potential of cytoPrP Resides within the Proximal Part of the Globular Domain, including the Hydrophobic Domain and Helix 1*

To investigate whether the cytotoxic potential of cytoPrP is linked to a specific domain, we created several deletion mutants of cytoPrP (Figure 7A). Interestingly, all mutants devoid of the proximal part of the C-terminal globular domain (aa 116–156), comprising the hydrophobic domain and

helix 1, did not induce apoptosis. Furthermore, expression of the internal domain, cyto108–173, induced apoptosis, although less efficiently than cytoPrP (Figure 7B). Importantly, differences in the apoptotic potential of the PrP mutants were not due to differences in the expression levels, because the relative amount of the nontoxic mutant cyto $\Delta$ 116–173 was comparable to that of cytoPrP (Figure 7C). To provide experimental evidence for a direct association of aggregated Bcl-2 with misfolded PrP, pullup experiments were performed. In this approach Bcl-2 was immunopurified similarly to coimmunoprecipitation described above; however, to avoid centrifugation, magnetic anti-mouse IgG-DYNA-beads were used. The immunocomplexes were pulled up by a magnetic field and analyzed by Western blotting. Again, cyto-PrP copurified under these conditions. However, neither was the nontoxic mutant cyto $\Delta$ 116–173 pulled up by Bcl-2 nor was cytoPrP bound by Bcl-2 $\Delta$ 202–219 (Figure 7D). Further support for the assumption that the formation of Bcl-2/cytoPrP aggregates is linked to apoptosis would be provided if the expression of the nontoxic mutant cyto $\Delta$ 116–173 does not lead to the aggregation of Bcl-2. Indeed, the sucrose gradient analysis revealed that in contrast to cytoPrP or cyto108–173, cyto $\Delta$ 116–173 did not induce aggregation of Bcl-2. Notably, the internal deletion did not restore folding of cyto $\Delta$ 116–173 because the mutant was still found in the bottom fractions of the sucrose gradient (Figure 7E).

#### *Cytosolic Chaperones Bind to cytoPrP and Interfere with PrP-induced Apoptosis and the Formation of PrP/Bcl-2 Coaggregates*

The biochemical analysis of cytoPrP revealed a nonnative, misfolded conformation that should be recognized by molecular chaperones. Indeed, in an earlier study indirect immunofluorescence experiments revealed colocalization of

cytoPrP with Hsp70 (Ma and Lindquist, 2001). We therefore analyzed a possible interaction of cytoPrP with the cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp40. For coimmunoprecipitation experiments we expressed cytoPrP together with YFP-Hsp70 and Hsp40. Previous experiments established that the chaperone activity of Hsp70 is not compromised by the YFP tag (Kim *et al.*, 2002). After a first immunoprecipitation with an anti-GFP antibody under native conditions, the immunopellet was boiled in detergent buffer B and PrP was immunoprecipitated with the monoclonal anti-PrP antibody 3F4. PrP copurified under these conditions, but only in the presence of Hsp70 (Figure 8A, lane 4). A sucrose step gradient provided further evidence that cytoPrP is bound by the cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp40. In the absence of cytoPrP, Hsp70 as well as Hsp40 were exclusively found in the top fractions. When cytoPrP was coexpressed, the chaperones were found in the bottom fraction together with cytoPrP (Figure 8B). Interestingly, the chaperones obviously affected the biochemical properties of cytoPrP. In cells overexpressing Hsp70 and Hsp40, a portion of cytoPrP was found in the top fraction of the sucrose gradient (Figure 8B, compare to Figure 2C). Finally, we performed an indirect immunofluorescence analysis to visualize colocalization of cytoPrP and EYFP-Hsp70 (Figure 8C).

In a next step we wanted to determine whether the interaction of cytoPrP with Hsp70 and Hsp40 modulates the cytotoxic potential of cytoPrP. Indeed, the caspase-3 assay revealed that the coexpression of Hsp70 and Hsp40 interfered with cytoPrP-induced apoptosis. In the presence of Hsp70 and Hsp40 the number of apoptotic cells were reduced to background levels (Figure 9A). Importantly, the relative amount of cytoPrP was not reduced by the coexpression of Hsp70 and Hsp40 (Figure 9B).

As shown above, Bcl-2 binds to and coaggregates with cytoPrP (Figure 5). To test the possibility that coexpression of chaperones modulates this interaction, we biochemically analyzed Bcl-2 in cells expressing Hsp70 and Hsp40 in addition to cytoPrP. As expected, Bcl-2 aggregation was observed in cells expressing cytoPrP; however, coexpression of Hsp70 and Hsp40 interfered with cytoPrP-induced aggregation of Bcl-2 (Figure 9C).

In summary, these results indicate that misfolded cytoPrP is recognized and bound by Hsp70 and Hsp40. As a consequence, the cytotoxic potential of cytoPrP and the formation of PrP/Bcl2 coaggregates are reduced.

## DISCUSSION

In this study, we analyzed the biochemical properties and cytotoxic potential of PrP targeted to different cellular compartments. Although PrP adopted a misfolded conformation in all compartments analyzed, i.e., the cytosol, nucleus, ER, and mitochondria, apoptosis only occurred when misfolded PrP accumulated in the cytosol. Our study also revealed that the toxic potential of cytosolic PrP (cytoPrP) correlated with its binding to Bcl-2, which is an essential component of the intracellular apoptotic signaling pathways (Danial and Korsmeyer, 2004).

Biogenesis of PrP<sup>C</sup> is characterized by a series of co- and posttranslational modifications (reviewed in Tatzelt and Winklhofer, 2004). Among those, addition of the GPI anchor seems to be of particular importance. Initial experiments in cell culture revealed that a mutant devoid of the C-terminal GPI anchor signal sequence (PrPΔGPI) is imported into the ER but remains mainly unglycosylated, spontaneously adopts a misfolded conformation and is efficiently secreted (Rogers *et al.*, 1993; Blochberger *et al.*, 1997; Winklhofer *et al.*,

2003c). The phenotype of anchorless PrP described in cultured cells was recently confirmed in transgenic mice. Notably, expression of PrPΔGPI did not result in clinical symptoms, at least not during the life span of mice (Chesebro *et al.*, 2005). Biochemically, PrPΔGPI (named GPI(-)PrPsen in the mouse study) is similar to the PrP mutant targeted to the cytosol (cytoPrP): both mutants lack the C-terminal signal sequence, are unglycosylated, and adopt a misfolded conformation. However, transgenic mice expressing cytoPrP acquired severe ataxia with cerebellar degeneration (Ma *et al.*, 2002). Our cell culture model recapitulates the observations in transgenic mice: cytoPrP efficiently induced apoptosis, whereas expression of PrPΔGPI had no obvious effect on cellular viability. How can the obvious difference in the neurotoxic potential of PrPΔGPI and cytoPrP be explained? Possibly, the neurotoxic potential is linked to a specific conformation, and the conformation of PrPΔGPI and cytoPrP may be different. Alternatively, the cellular compartment in which PrP misfolding occurs is crucial. Our study provides experimental evidence that the cellular compartment might play a significant role. PrP mutants targeted to the cytosol, nucleus, ER, or mitochondria showed similar biochemical features, yet apoptosis was exclusively induced by cytosolic PrP.

Although the pathophysiological role of cytoPrP might be restricted to a subset of prion diseases, there are several ways to generate of cytoPrP *in vivo*. It was recently shown that the signal sequence of PrP is insufficient for complete protein translocation into the ER, giving rise to a nontranslocated PrP fraction in the cytosol (Rane *et al.*, 2004). In line with these results, the pathogenic mutants Q160Stop and W145Stop are partially mislocalized in the cytosol (Zanusso *et al.*, 1999; Heske *et al.*, 2004), and we could show that the toxic potential is indeed linked to the cytosolic fraction of these mutants. Alternatively, access to the cytosol is possible via retrograde translocation of PrP out of the ER; this route has been demonstrated for wild-type PrP and another pathogenic PrP mutant, D177N (Ma and Lindquist, 2001; Yedidia *et al.*, 2001). Finally, the generation of transmembrane forms of PrP, which is favored by some pathogenic mutations, leads to the partial exposure of PrP to the cytosol (reviewed in Hegde *et al.*, 1999). Notably, a quantitative study of the ultrastructural localization of PrP in mouse brain revealed that PrP is present in the cytosol in subpopulations of neurons (Mironov *et al.*, 2003).

What might be the mechanism underlying the toxic potential of cytoPrP? Recruitment of anti-apoptotic Bcl-2 to misfolded PrP provides a plausible explanation for the observed effects. An interaction of PrP and Bcl-2 was described previously for recombinantly expressed proteins (Kurschner and Morgan, 1995, 1996). We now show for the first time that such an interaction can occur in neuronal cells and seems to be of pathophysiological relevance. First, only PrP mutants with a toxic potential induced aggregation of Bcl-2. Bcl-2 did not aggregate in cells expressing mitochondrially localized PrP or the nontoxic cytosolic PrP mutant cytoPrPΔ116–173. Second, overexpression of Bcl-2 interfered with cytotoxicity induced by cytoPrP. Third, Bcl-2Δ202–219, a functionally active mutant with a deletion in the PrP-interacting domain, did not coaggregate with cytoPrP, but did interfere with cytoPrP-induced apoptosis. Fourth, the protective effect of Hsp70/Hsp40 in cytoPrP-induced toxicity correlated with their potential to interfere with the recruitment of Bcl-2 into cytoPrP aggregates. Finally, Bcl-2 adopted a detergent-insoluble conformation in scrapie-diseased mouse brain. This interesting observation might provide a link between prion propagation and intracellular apoptotic signaling pathways.

Support for the possibility that PrP<sup>Sc</sup> itself could induce apoptosis through caspase activation was provided previously in a cell culture model (Hetz *et al.*, 2003). In addition, aggresome formation in scrapie-infected cells was shown to induce caspase-3 activation and apoptosis (Kristiansen *et al.*, 2005). In this context it is also interesting to note that an interaction of PrP with NRAGE, another protein involved in neuronal apoptosis, was reported recently (Bragason and Palsdottir, 2005).

The exact mechanism by which Bcl-2 exerts its anti-apoptotic function is not fully understood, but binding to proapoptotic members of the Bcl-2 family seems to be crucial. Regarding the role of Bcl-2 in cytoPrP-mediated toxicity, two scenarios are conceivable. Bcl-2 may be inactivated by its sequestration into cytoPrP aggregates. In support of this possibility, a recent study revealed that aggregation of Bcl-2 can be of pathophysiological relevance for another neurodegenerative disease. It was shown that the amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-associated SOD1 mutant proteins bind to and aggregate with Bcl-2 (Pasinelli *et al.*, 2004). Alternatively, binding of Bcl-2 to cytoPrP may induce a conformational change of Bcl-2, converting it to a proapoptotic protein. Evidence for opposing phenotypes of Bcl-2 was provided by Lin *et al.* (2004), who showed that the interaction with Nur77 converts Bcl-2 from a protector to a killer protein.

Our study clearly revealed that PrP-induced toxicity can be modulated by various cellular factors. Obviously, proteasomal degradation and chaperone activity have a major impact on the formation of toxic PrP conformers. To disclose the cytotoxic potential of cytoPrP, it was necessary to transiently inhibit the proteasome. In untreated cells cytoPrP was hardly detectable by Western blotting, suggesting that the main effect of MG132 was to elevate the amount of cytoPrP. However, it is also conceivable that cells stressed by proteasomal impairment are sensitized to cytoPrP. Similarly, the relative level of Bcl-2 determines whether or not apoptosis is induced by cytoPrP. Efficiency of the ubiquitin-proteasome system as well as chaperone activity decrease with aging, supporting the notion that aged neurons are particularly vulnerable to the accumulation of misfolded proteins. In this context, inefficiencies in the signal-sequence-mediated translocation of PrP into the ER might further promote the generation and accumulation of cytosolically localized PrP conformers. This multifaceted influence on the formation and clearance of cytoPrP, which is highly dependent on the cellular homeostasis, also provides a plausible explanation for the discrepancy between different reports on the toxic potential of cytosolic PrP (Ma *et al.*, 2002; Roucou *et al.*, 2003; Rane *et al.*, 2004; Fioriti *et al.*, 2005).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank F. Ulrich Hartl for his support. We are grateful to Richard I. Morimoto for the EYFP-Hsp70 plasmid and to William J. Welch for the Hsp40 plasmid. We also thank Shrukry J. Habib for experimental help with the mitochondrial import assays; Christian Pohl, Christian Schuberth, and Stefan Hümmer for helpful discussions; and Lindsay A. Smale for critical reading the manuscript. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (WI 2111/1 and SFB 596), from the Bayerische Staatsminister für Wissenschaft, Forschung, und Kunst (forPrion, MPI3), and from the Max-Planck-Society.

## REFERENCES

Aguzzi, A., and Polymenidou, M. (2004). Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* 116, 313–327.

Bartke, T., Pohl, C., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2004). Dual role of BRUCE as an antiapoptotic IAP and a chimeric E2/E3 ubiquitin ligase. *Mol. Cell* 14, 801–811.

Blochberger, T. C., Cooper, C., Peretz, D., Tatzelt, J., Griffith, O. H., Baldwin, M. A., and Prusiner, S. B. (1997). Prion protein expression in Chinese hamster ovary cells using a glutamine synthetase selection and amplification system. *Protein Eng.* 10, 1465–1473.

Bragason, B. T., and Palsdottir, A. (2005). Interaction of PrP with NRAGE, a protein involved in neuronal apoptosis. *Mol. Cell. Neurosci.* 29, 232–244.

Chesebro, B. (2003). Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. *Br. Med. Bull.* 66, 1–20.

Chesebro, B. *et al.* (2005). Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* 308, 1435–1439.

Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 519–550.

Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205–219.

Fioriti, L., Dossena, S., Stewart, L. R., Stewart, R. S., Harris, D. A., Forloni, G., and Chiesa, R. (2005). Cytosolic prion protein (PrP) is not toxic in N2a cells and primary neurons expressing pathogenic PrP mutations. *J. Biol. Chem.* 280, 11320–11328.

Hegde, R. S., Mastrrianni, J. A., Scott, M. R., DeFea, K. A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Lingappa, V. R. (1998). A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* 279, 827–834.

Hegde, R. S., Tremblay, P., Groth, D., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Lingappa, V. R. (1999). Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration [see comments]. *Nature* 402, 822–826.

Heller, U., Winklhofer, K. F., Hesse, J., Reintjes, A., and Tatzelt, J. (2003). Post-translational import of the prion protein into the endoplasmic reticulum interferes with cell viability: a critical role for the putative transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* 278, 36139–36147.

Henn, I. H., Gostner, J. M., Tatzelt, J., and Winklhofer, K. F. (2005). Pathogenic mutations inactivate parkin by distinct mechanisms. *J. Neurochem.* 92, 114–122.

Hesse, J., Heller, U., Winklhofer, K. F., and Tatzelt, J. (2004). The C-terminal domain of the prion protein is necessary and sufficient for import into the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 279, 5435–5443.

Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Maundrell, K., Castilla, J., and Soto, C. (2003). Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J.* 22, 5435–5445.

Kacsak, R. J., Rubenstein, R., Merz, P. A., Tonna-DeMasi, M., Fersko, R., Carp, R. I., Wisniewski, H. M., and Diringer, H. (1987). Mouse polyclonal and mAb to scrapie-associated fibril proteins. *J. Virol.* 61, 3688–3693.

Kim, S., Nollen, E. A., Kitagawa, K., Bindokas, V. P., and Morimoto, R. I. (2002). Polyglutamine protein aggregates are dynamic. *Nat. Cell. Biol.* 4, 826–831.

Krasemann, S., Groschup, M. H., Harmeyer, S., Hunsmann, G., and Bodemer, W. (1996). Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP0/0 mice. *Mol. Med.* 2, 725–734.

Kristiansen, M., Messenger, M. J., Klohn, P. C., Brandner, S., Wadsworth, J. D., Collinge, J., and Tabrizi, S. J. (2005). Disease-related prion protein forms aggresomes in neuronal cells leading to caspase-activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* Sep 12; *Epub ahead of print.*

Kurschner, C., and Morgan, J. I. (1995). The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 30, 165–168.

Kurschner, C., and Morgan, J. I. (1996). Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 37, 249–258.

Lin, B., Kolluri, S. K., Lin, F., Liu, W., Han, Y. H., Cao, X., Dawson, M. I., Reed, J. C., and Zhang, X. K. (2004). Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* 116, 527–540.

Ma, J., and Lindquist, S. (2001). Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 14955–14960.

Ma, J., Wollmann, R., and Lindquist, S. (2002). Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* 298, 1781–1785.

Mironov, A. J., Latawiec, D., Wille, H., Bouzamondo-Bernstein, E., Legname, G., Williamson, R. A., Burton, D., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Peters, P. J. (2003). Cytosolic prion protein in neurons. *J. Neurosci.* 23, 7183–7193.

Pasinelli, P., Belford, M. E., Lennon, N., Bacskai, B. J., Hyman, B. T., Trotter, I. D., and Brown, R. H. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1

- mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* 43, 19–30.
- Prusiner, S. B., Scott, M. R., DeArmond, S. J., and Cohen, F. E. (1998). Prion protein biology. *Cell* 93, 337–348.
- Rane, N. S., Yonkovich, J. L., and Hegde, R. S. (2004). Protection from cytosolic prion protein toxicity by modulation of protein translocation. *EMBO J.* 23, 4550–4559.
- Rogers, M., Yehiely, F., Scott, M., and Prusiner, S. B. (1993). Conversion of truncated and elongated prion proteins into the scrapie isoform in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3182–3186.
- Roucou, X., Guo, Q., Zhang, Y., Goodyer, C. G., and LeBlanc, A. C. (2003). Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *J. Biol. Chem.* 278, 40877–40881.
- Schultz, J., Schwarz, A., Neidhold, S., Burwinkel, M., Riemer, C., Simon, D., Kopf, M., Otto, M., and Baier, M. (2004). Role of interleukin-1 in prion disease-associated astrocyte activation. *Am. J. Pathol.* 165, 671–678.
- Stan, T., Brix, J., Schneider-Mergener, J., Pfanner, N., Neupert, W., and Rapaport, D. (2003). Mitochondrial protein import: recognition of internal import signals of BCS1 by the TOM complex. *Mol. Biol. Cell.* 23, 2239–2250.
- Stewart, R. S., Piccardo, P., Ghetti, B., and Harris, D. A. (2005). Neurodegenerative illness in transgenic mice expressing a transmembrane form of the prion protein. *J. Neurosci.* 25, 3469–3477.
- Tatzelt, J., Prusiner, S. B., and Welch, W. J. (1996). Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J.* 15, 6363–6373.
- Tatzelt, J., and Winklhofer, K. F. (2004). Folding and misfolding of the prion protein in the secretory pathway. *Amyloid* 11, 162–172.
- Weissmann, C., Fischer, M., Raeber, A., Büeler, H., Sailer, A., Shmerling, D., Rüllicke, T., Brandner, S., and Aguzzi, A. (1996). The role of PrP in pathogenesis of experimental scrapie. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 61, 511–522.
- Winklhofer, K. F., Heller, U., Reintjes, A., and Tatzelt, J. (2003a). Inhibition of complex glycosylation increases formation of PrP<sup>Sc</sup>. *Traffic* 4, 313–322.
- Winklhofer, K. F., Henn, I. H., Kay-Jackson, P., Heller, U., and Tatzelt, J. (2003b). Inactivation of parkin by oxidative stress and C-terminal truncations; a protective role of molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 278, 47199–47208.
- Winklhofer, K. F., Heske, J., Heller, U., Reintjes, A., Muranji, W., Moarefi, I., and Tatzelt, J. (2003c). Determinants of the in vivo-folding of the prion protein: a bipartite function of helix 1 in folding and aggregation. *J. Biol. Chem.* 278, 14961–14970.
- Winklhofer, K. F., and Tatzelt, J. (2000). Cationic lipopolyamines induce degradation of PrP<sup>Sc</sup> in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *Biol. Chem.* 381, 463–469.
- Winklhofer, K. F., and Tatzelt, J. (2006). The role of chaperones in Parkinson's disease and prion diseases. In: *Molecular Chaperones in Health and Diseases*, Vol. 172, ed. M. Gaestel, New York: Springer-Verlag, 221–258.
- Yedidia, Y., Horonchik, L., Tzaban, S., Yanai, A., and Taraboulos, A. (2001). Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *EMBO J.* 20, 5383–5391.
- Yost, C. S., Lopez, C. D., Prusiner, S. B., Myers, R. M., and Lingappa, V. R. (1990). Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein. *Nature* 343, 669–672.
- Zanusso, G., Petersen, R. B., Jin, T., Jing, Y., Kanoush, R., Ferrari, S., Gambetti, P., and Singh, N. (1999). Proteasomal degradation and N-terminal protease resistance of the codon 145 mutant prion protein. *J. Biol. Chem.* 274, 23396–23404.

# Stress-protective signalling of prion protein is corrupted by scrapie prions

Angelika S Rambold<sup>1</sup>, Veronika Müller<sup>1</sup>,  
Uri Ron<sup>2</sup>, Nir Ben-Tal<sup>2</sup>, Konstanze  
F Winklhofer<sup>1,3</sup> and Jörg Tatzelt<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Neurobiochemistry, Ludwig-Maximilians-University Munich, München, Germany and <sup>2</sup>Department of Biochemistry, George S Wise Faculty of Life Sciences, Tel Aviv University, Ramat Aviv, Israel

Studies in transgenic mice revealed that neurodegeneration induced by scrapie prion (PrP<sup>Sc</sup>) propagation is dependent on neuronal expression of the cellular prion protein PrP<sup>C</sup>. On the other hand, there is evidence that PrP<sup>C</sup> itself has a stress-protective activity. Here, we show that the toxic activity of PrP<sup>Sc</sup> and the protective activity of PrP<sup>C</sup> are interconnected. With a novel co-cultivation assay, we demonstrate that PrP<sup>Sc</sup> can induce apoptotic signalling in PrP<sup>C</sup>-expressing cells. However, cells expressing PrP mutants with an impaired stress-protective activity were resistant to PrP<sup>Sc</sup>-induced toxicity. We also show that the internal hydrophobic domain promotes dimer formation of PrP and that dimerization of PrP is linked to its stress-protective activity. PrP mutants defective in dimer formation did not confer enhanced stress tolerance. Moreover, in chronically scrapie-infected neuroblastoma cells the amount of PrP<sup>C</sup> dimers inversely correlated with the amount of PrP<sup>Sc</sup> and the resistance of the cells to various stress conditions. Our results provide new insight into the mechanism of PrP<sup>C</sup>-mediated neuroprotection and indicate that pathological PrP conformers abuse PrP<sup>C</sup>-dependent pathways for apoptotic signalling.

The EMBO Journal (2008) 27, 1974–1984. doi:10.1038/emboj.2008.122; Published online 19 June 2008

Subject Categories: signal transduction; molecular biology of disease

Keywords: apoptosis; dimer; prion; scrapie; stress-protective

## Introduction

Prion diseases in humans and other mammals are neurodegenerative diseases characterized by the accumulation of an abnormally folded prion protein, designated PrP<sup>Sc</sup>, which is the essential constituent of infectious prions. PrP<sup>Sc</sup> is a self-propagating isoform of the cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) with distinct biochemical and biophysical properties, such as a high content in  $\beta$ -sheet structures, insolubility in detergent

buffers and increased resistance to proteolytic digestion (reviewed in Weissmann *et al*, 1996; Prusiner *et al*, 1998; Collinge, 2001; Chesebro, 2003; Aguzzi and Polymenidou, 2004). PrP<sup>C</sup> is essential for the pathogenesis of prion diseases. Mice with a targeted disruption of the PrP gene (PRNP) are resistant to prion diseases and to the propagation of infectious prions (Büeler *et al*, 1993). Moreover, neuronal expression of PrP<sup>C</sup> seems to be required to mediate neurotoxic effects of scrapie prion propagation. The first indication for such a role of PrP<sup>C</sup> emerged from elegant grafting experiments (Brandner *et al*, 1996), a finding later supported by a conditional cell-type-specific PrP knockout mouse model (Mallucci *et al*, 2003) and transgenic mice expressing PrP $\Delta$ GPI, an anchorless PrP mutant (Chesebro *et al*, 2005). Moreover, different mouse models revealed that PrP can acquire a neurotoxic potential in the absence of PrP<sup>Sc</sup>/prion propagation (reviewed in Winklhofer *et al*, 2008). One class of such toxic PrP mutants is characterized by a deleted internal hydrophobic domain (HD) (Shmerling *et al*, 1998; Baumann *et al*, 2007; Li *et al*, 2007). PrP $\Delta$ HD is complex glycosylated and linked to the plasma membrane through a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (Winklhofer *et al*, 2003b), indicating that this neurotoxic mutant is at the same cellular locale as PrP<sup>C</sup>. Indeed, results from different mouse models were interpreted in such a way that neurotoxicity of PrP $\Delta$ HD is linked to a PrP<sup>C</sup>-dependent signalling pathway (Shmerling *et al*, 1998; Baumann *et al*, 2007; Li *et al*, 2007).

In contrast to the toxic activity of pathological PrP conformers appears to be the physiological function of PrP<sup>C</sup>. First hints about the activity of PrP<sup>C</sup> to confer enhanced tolerance to stress emerged from experiments with primary neurons (Kuwahara *et al*, 1999). Using stroke models in rats and mice, it was then demonstrated that PrP<sup>C</sup> has a neuroprotective activity after an ischaemic insult (McLennan *et al*, 2004; Shyu *et al*, 2005; Spudich *et al*, 2005; Weise *et al*, 2006; Mitteregger *et al*, 2007). These findings in transgenic animals were complemented and corroborated by several studies in cultured cells supporting the idea that PrP<sup>C</sup> can modulate signalling cascades, in particular stress-protective pathways (Westergard *et al*, 2007).

We now show that stress-protective signalling of PrP<sup>C</sup> is dependent on the internal HD and the C-terminal GPI anchor. Furthermore, our data provide evidence for a switch from antiapoptotic to pro-apoptotic signalling of PrP<sup>C</sup> induced by neurotoxic PrP mutations and scrapie prions.

## Results

### The stress-protective activity of PrP<sup>C</sup> is dependent on the GPI anchor and the internal HD

From previous studies in transgenic mice and cultured cells, it emerged that expression of PrP<sup>C</sup> can confer enhanced stress tolerance. As a cell culture system to analyse this activity, we employed transiently transfected SH-SY5Y cells, which are characterized by extremely low levels of endogenous PrP<sup>C</sup>

\*Corresponding author. Department of Biochemistry, Neurobiochemistry, Ludwig-Maximilians-University Munich, Schillerstrasse 44, Munich D-80336, Germany. Tel.: +49 89 2180 74442; Fax: +49 89 2180 75415; E-mail: Joerg.Tatzelt@med.uni-muenchen.de  
<sup>3</sup>Senior authors

Received: 29 April 2008; accepted: 30 May 2008; published online: 19 June 2008

(Rambold *et al*, 2006). Cells were exposed to the excitotoxin kainate and apoptotic cell death was determined by the detection of activated caspase-3. Ectopic expression of wild-type (wt) PrP, but not PrP $\Delta$ N, significantly enhanced survival of cells exposed to kainate (Figure 1B), corroborating results obtained in mice models (Mitteregger *et al*, 2007).

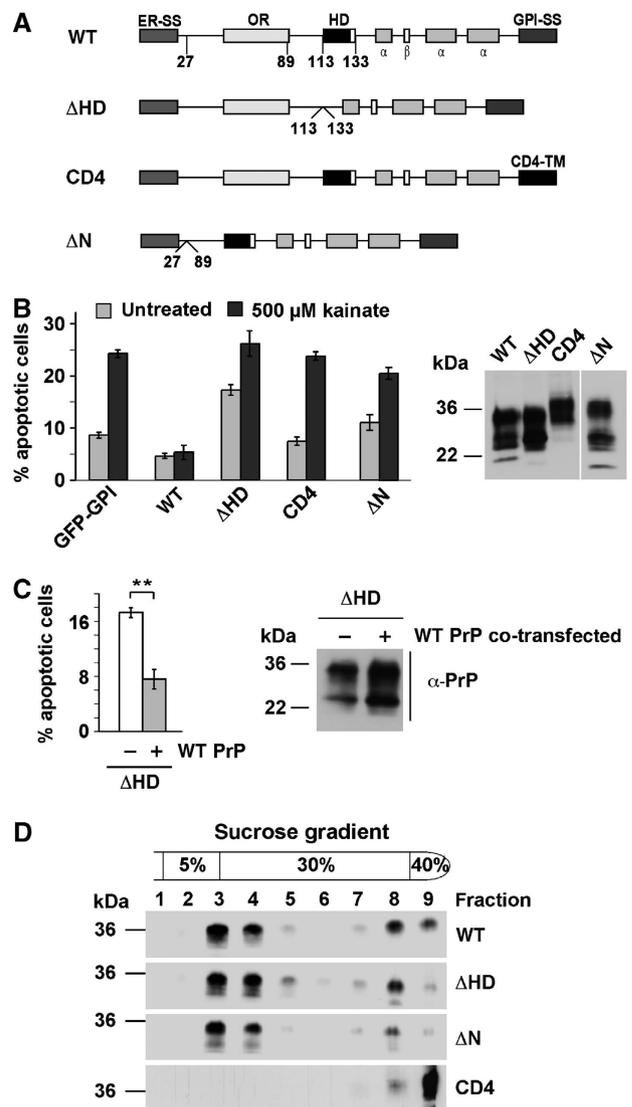
To identify additional domains of PrP<sup>C</sup> essential for the stress-protective activity, a variety of PrP mutants were analysed (Figure 1A). It turned out that PrP needs to be attached to the plasma membrane through a GPI anchor: PrP-CD4, which contains a heterologous C-terminal transmembrane domain instead of the GPI anchor (Taraboulos *et al*, 1995; Winklhofer *et al*, 2003b), showed no antiapoptotic activity (Figure 1B). The stress-protective activity was also lost when the short internal HD (amino acids 113–133) was deleted (Figure 1B). Moreover, deletion of the HD induces a switch from antiapoptotic to pro-apoptotic signalling. Apoptotic cell death was significantly increased in cells expressing PrP $\Delta$ HD (Figure 1B and C). In line with the protective activity of PrP<sup>C</sup> against PrP $\Delta$ HD-induced toxicity in transgenic animals, co-expression of wt PrP alleviated the pro-apoptotic activity of PrP $\Delta$ HD in SH-SY5Y cells (Figure 1C).

Notably, deletion of the HD or the N terminus seems not to interfere with maturation and cellular trafficking of PrP. Similarly to wt PrP, PrP $\Delta$ HD and PrP $\Delta$ N are complex glycosylated and targeted to detergent-insoluble microdomains at the plasma membrane (Figure 1D) (Winklhofer *et al*, 2003b). PrP-CD4 is also complex glycosylated and present at the plasma membrane, but does not localize to detergent-insoluble microdomains (Figure 1D).

### The HD mediates dimer formation of PrP<sup>C</sup>

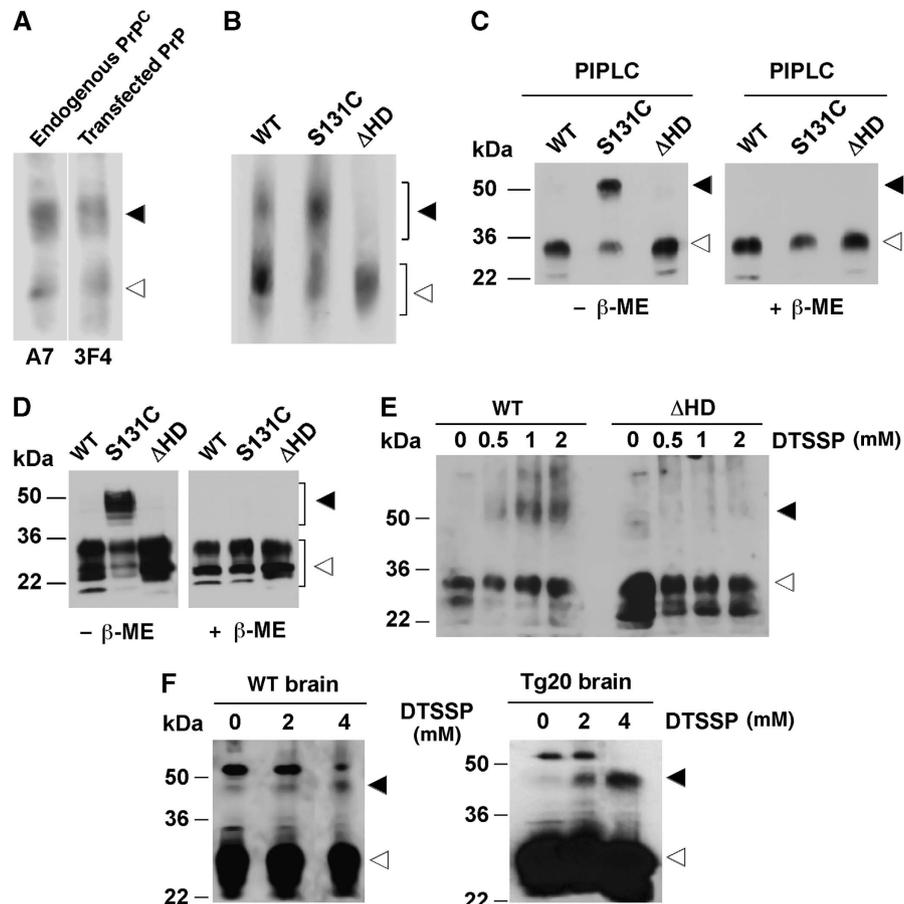
After having shown that the HD is required for the stress-protective activity of PrP<sup>C</sup>, we sought to analyse the role of the HD in mediating this effect. Signalling by cell surface proteins is often linked to dimer formation, and PrP dimers were reported in previous publications (Priola *et al*, 1995; Meyer *et al*, 2000), with the HD as a putative dimerization domain (Warwicker, 2000).

To examine dimer formation of endogenous PrP<sup>C</sup> in N2a cells, we released PrP<sup>C</sup> from the plasma membrane through digestion with phosphatidylinositol phospholipase C (PIPLC). The cell culture supernatant was collected and separated by native PAGE. Western blotting revealed two separate bands of endogenous PrP<sup>C</sup> (Figure 2A, endogenous PrP<sup>C</sup>). Ectopically expressed wt PrP showed a migration pattern similar to that of endogenous PrP<sup>C</sup> (Figure 2A, transfected PrP). To provide more evidence that the slower migrating PrP<sup>C</sup> species might be a dimer, we replaced serine 131 by cysteine (PrP-S131C). If HD is part of the dimer interface, C131 could form an intermolecular disulphide bond, which would be stable under non-reducing conditions. First, we analysed ectopically expressed wt PrP, PrP-S131C and PrP $\Delta$ HD by native PAGE. This analysis provided a first clue that the HD is necessary for PrP dimerization; in PrP $\Delta$ HD-expressing cells only the faster migrating band was detectable, whereas PrP-S131C seemed to stabilize dimer formation (Figure 2B). Next, the supernatants of PIPLC-treated transfected cells were analysed by SDS-PAGE. Under non-reducing conditions, an additional slower migrating band was detectable for PrP-S131C, which disappeared under reducing conditions (Figure 2C). These approaches revealed that (i) endogenous PrP<sup>C</sup> can form a



**Figure 1** The internal hydrophobic domain and the GPI anchor are necessary for the protective activity of PrP<sup>C</sup>. (A) Schematic presentation of the PrP mutants analysed. ER-SS: ER signal sequence; OR: octarepeat; HD: hydrophobic domain;  $\alpha$ :  $\alpha$ -helical region;  $\beta$ :  $\beta$ -strand; GPI-SS: GPI signal sequence; CD4-TM: transmembrane domain of CD4. (B) wt PrP<sup>C</sup> protects against stress-induced apoptosis. SH-SY5Y cells expressing the constructs indicated were stressed with kainic acid (500  $\mu$ M) at 37°C for 3 h, fixed, permeabilized, and activation of caspase-3 was analysed by indirect immunofluorescence. In total, 300 transfected cells in at least three independent experiments were counted. The percentage of apoptotic cells among transfected cells is shown. Expression levels were analysed by immunoblotting (right panel). Lane  $\Delta$ N was positioned to the right side of the gel, all lanes originate from one gel. (C) Expression of wt PrP interferes with toxic effects of PrP $\Delta$ HD. SH-SY5Y cells were transiently transfected with PrP $\Delta$ HD or PrP $\Delta$ HD and wt PrP. Apoptotic cell death was determined as described under (B). Expression levels were analysed by immunoblotting (right panel). (D) Wt PrP, PrP $\Delta$ HD,  $\Delta$ N and CD4 localize to detergent-insoluble microdomains. N2a cells were transiently transfected with the constructs indicated, lysed in ice-cold buffer C and fractionated by a discontinuous sucrose gradient. PrP was detected by immunoblotting using the mAb 3F4. **\*\*** $P < 0.005$ .

dimer, (ii) the HD is part of the dimer interface and (iii) the PrP dimer is present at the plasma membrane. Disulphide-linked dimers of PrP-S131C could also be detected in total cell lysates (Figure 2D) and in detergent-resistant membranes



**Figure 2** The internal hydrophobic domain promotes homo-dimerization of PrP. (A) PrP<sup>C</sup> forms dimers. Live N2a cells either untransfected or transiently expressing wt PrP were incubated for 2 h with PIPLC in PBS at 37°C. Proteins present in the cell culture supernatant were analysed by native PAGE using the anti-PrP antiserum A7 (endogenous PrP<sup>C</sup>) or the mAb 3F4 (transfected). Western blot membrane was divided for treatment with the specific antibodies indicated, as indicated by a white line. All samples originate from one gel. (B–F) Dimerization of PrP is dependent on the HD. (B, C) Transiently transfected SH-SY5Y cells were incubated for 2 h with PIPLC in PBS at 37°C and proteins in the cell culture supernatant were analysed by (B) native PAGE or (C) SDS-PAGE under reducing (+β-ME) or non-reducing (–β-ME) conditions. PrP was detected by western blotting using the mAb 3F4. (D) Total cell lysates of transiently transfected SH-SY5Y cells were analysed as described under (C). (E, F) Crude membranes from SH-SY5Y cells, Tg20 or wt mouse brains were incubated for 1 h at 4°C with increasing concentrations of the chemical crosslinker DTSSP. PrP was detected by immunoblotting using the mAb 3F4. Closed arrowheads indicate dimeric forms of PrP, open arrowheads indicate PrP monomers.

(Supplementary Figure 1). As a third approach to analyse dimer formation, we performed crosslinking experiments. Indeed, a PrP crosslink at a size indicative of a PrP dimer was observed for wt PrP in cultured cells and mouse brain, whereas crosslinking of PrP $\Delta$ HD did not result in such a higher molecular weight species (Figure 2E and F).

To provide further support for the assumption that dimer formation is linked to the stress-protective activity of PrP, we introduced the S131C substitution in those PrP mutants that did not confer enhanced stress tolerance, namely PrP $\Delta$ HD, PrP $\Delta$ N and PrP-CD4. Please note that for the construction of  $\Delta$ HD-S131C the HD deletion was limited to amino acids 112–128.  $\Delta$ HD-S131C and CD4-S131C showed significantly reduced dimer formation in comparison to PrP-S131C (Figure 3A and B). Interestingly,  $\Delta$ N showed dimer formation but no neuroprotective activity, suggesting that dimer formation might be necessary but not sufficient for the neuroprotective activity of PrP. Supporting the notion that dimerization of PrP might be linked to its stress-protective activity, dimerization of PrP-S131C was increased after stress treatment (Figure 3C).

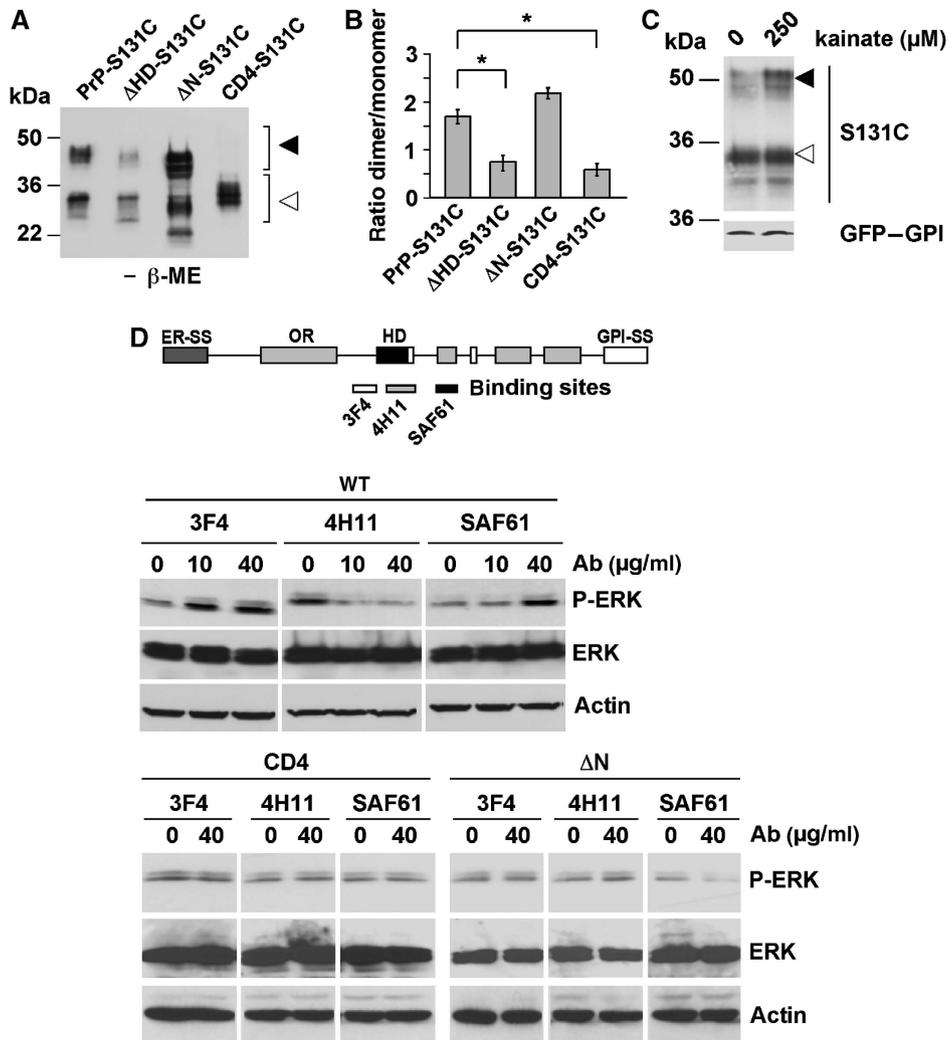
To follow up the question whether PrP dimer formation is associated with stress-protective signalling of PrP<sup>C</sup>, we used

different anti-PrP antibodies to induce PrP dimerization at the plasma membrane. Treatment of cell expressing wt PrP with the antibodies 3F4 and SAF61, which bind adjacent to the HD, induced phosphorylation of ERK, whereas 4H11, which binds directly to the HD, did not (Figure 3D). Moreover, antibody treatment did not induce ERK signalling in cells expressing PrP $\Delta$ N or PrP-CD4, mutants devoid of a stress-protective activity (Figure 1).

In summary, our data revealed that dimers of PrP<sup>C</sup> are present at the plasma membrane of neuronal cells. Dimer formation as well as the stress-protective activity of PrP<sup>C</sup> is dependent on the internal HD and the C-terminal GPI anchor.

#### **Scrapie-infected cells are more sensitive to stress and are impaired in PrP<sup>C</sup> dimerization**

ScN2a cells are chronically scrapie-infected N2a cells that propagate PrP<sup>Sc</sup> and infectious prions (Butler *et al*, 1988; Caughey and Raymond, 1991; Borchelt *et al*, 1992). In contrast to the uninfected N2a cells, ScN2a cells accumulate significant amounts of detergent-insoluble and protease K-resistant PrP<sup>Sc</sup> (Figure 4A). When we compared the proliferation rates of ScN2a cells with that of uninfected



**Figure 3** Dimerization of PrP induces intracellular signalling and is dependent on the hydrophobic domain and the GPI anchor. (A) Dimerization of PrP is dependent on the hydrophobic domain and the GPI anchor. Wt PrP-S131C, ΔHD-S131C, ΔN-S131C or CD4-S131C was expressed in SH-SY5Y cells and PrP dimers present in total cell lysates were analysed by SDS-PAGE/western blotting under non-reducing conditions. (B) Quantification of PrP dimer formation. The ratio of dimeric to monomeric PrP, analysed in at least three independent experiments, is shown. (C) Stress-induced dimerization of PrP. SH-SY5Y cells were transfected with S131C or GFP-GPI, incubated with kainate (250 μM) for 2 h at 37°C. PrP and GFP-GPI was detected by western blotting using the mAb 3F4 and the anti-GFP antibody, respectively. (D) Antibody-induced signalling of PrP is dependent on the N terminus, the HD and the GPI anchor. SH-SY5Y cells were transfected with wt PrP, PrPAN or PrPCD4 as indicated. Cells were incubated for 10 min with increasing concentrations of the antibodies 3F4, 4H11 or SAF61, as indicated. P-ERK and ERK were visualized by immunoblotting. Loading was controlled by re-probing the blots for actin. \**P* < 0.05.

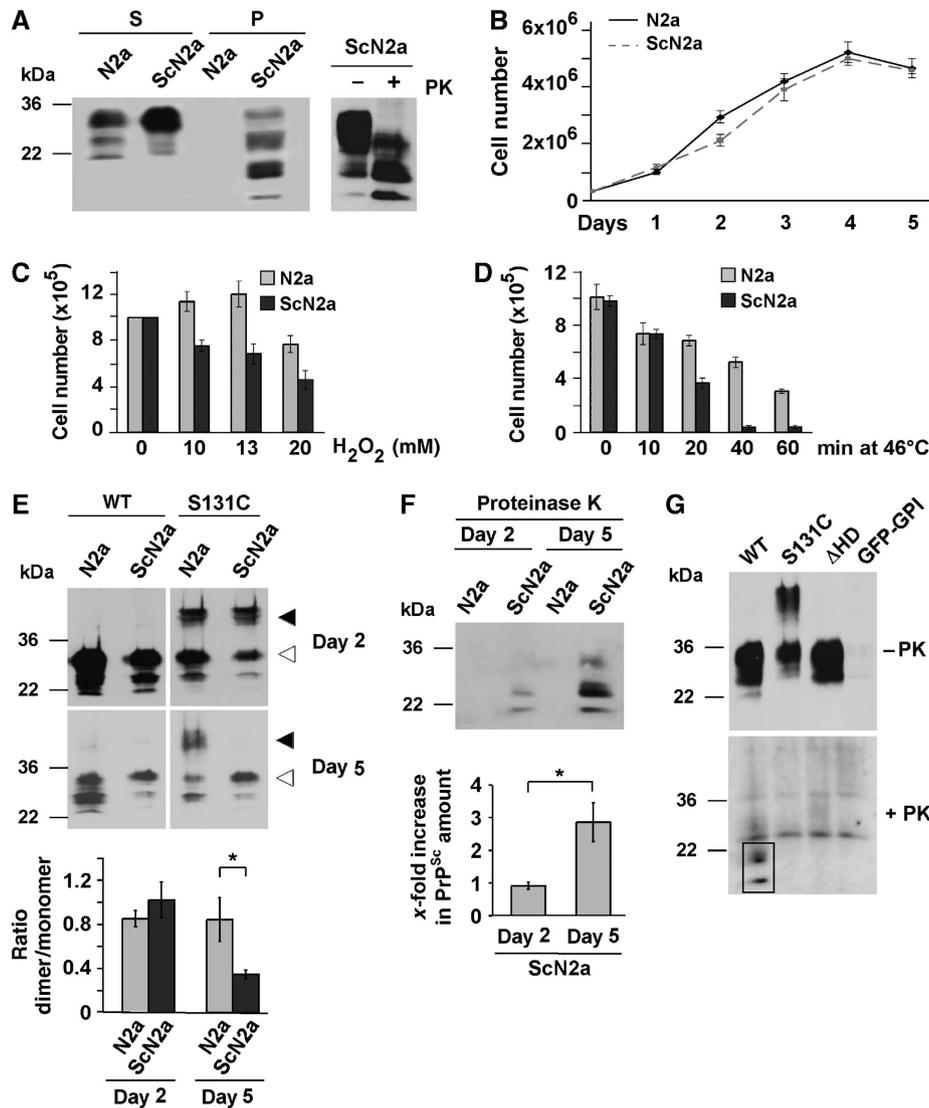
N2a cells, it appeared that PrP<sup>Sc</sup> propagation does not significantly interfere with cell viability (Figure 4B), corroborating earlier results (Bosque and Prusiner, 2000). This picture completely changed, when we analysed cell viability after stress. We subjected N2a and ScN2a cells to heat or oxidative stress and determined cell survival after 24 h. In both stress paradigms, ScN2a cells were significantly more sensitive (Figure 4C and D). In ScN2a cells, the steady-state level of PrP<sup>C</sup>, present in the detergent-soluble fraction, was at least as high as in N2a cells, suggesting that reduced level of PrP<sup>C</sup> does not account for the differences in vulnerability to stress (Figure 4A). Next, we analysed PrP-S131C dimer formation in N2a and ScN2a cells at day 2 and 5 after plating. The rationale behind this strategy was the observation that the relative amount of PrP<sup>Sc</sup> increases over time (Figure 4F). Transfection efficiency was decreased in 5-day-old cells; however, the monomer to dimer ratio was unchanged in N2a cells. In contrast, the relative amount of PrP-S131C dimers nega-

tively correlated with the PrP<sup>Sc</sup> load: ScN2a cells harbouring less PrP<sup>Sc</sup> had more dimers compared with cells that had accumulated larger amounts of PrP<sup>Sc</sup> (Figure 4E and F). To test whether dimeric PrP is a substrate for the formation of PrP<sup>Sc</sup>, we transfected ScN2a cells and analysed the conversion of the constructs into proteinase K (PK)-resistant PrP. PrPΔHD was not converted, corroborating earlier results (Holscher *et al*, 1998). Interestingly, PrP-S131C was also less efficiently converted into PrP<sup>Sc</sup>, suggesting that a PrP<sup>C</sup> dimer is not an optimal substrate for PrP<sup>Sc</sup> propagation (Figure 4G).

In summary, our experiments revealed that scrapie-infected N2a cells are significantly more vulnerable to stress and that the accumulation of PrP<sup>Sc</sup> interferes with PrP dimer formation.

#### Pro-apoptotic signalling of scrapie prions through PrP<sup>C</sup>

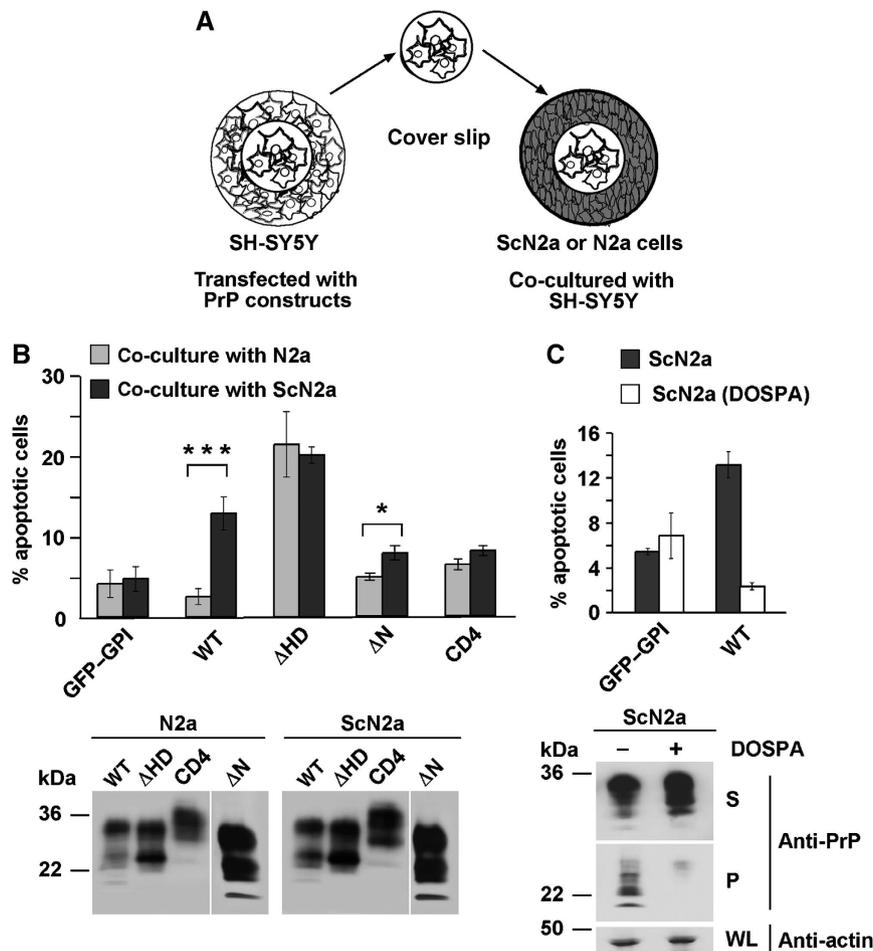
A major question in prion diseases and other neurodegenerative disorders is how misfolded protein conformers induce



**Figure 4** Scrapie prion propagating N2a cells are more susceptible to stress and contain reduced levels of PrP<sup>C</sup> dimers. (A) ScN2a cells accumulate detergent-insoluble and proteinase K (PK)-resistant PrP. N2a and ScN2a cells were grown for 5 days until confluency. Cells were lysed and PrP present in the detergent-soluble (S) and -insoluble (P) fraction or after a limited PK digest (right panel) was detected by western blotting using the anti-PrP antiserum A7. (B–D) Impaired viability of ScN2a cells after stress. (B) Equal number of cells was seeded onto cell culture dishes and cell numbers were determined by counting on 5 consecutive days. (C, D) N2a and ScN2a cells were grown for 4 days and treated with (C) increasing concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min or (D) subjected to a heat shock at 46°C for the times indicated. After 24 h cells were counted. Cell death was visualized using Trypan blue. (E, F) Increased PrP<sup>Sc</sup> load is paralleled by a decrease in PrP dimerization. N2a and ScN2a cells were transfected with wt PrP or PrP-S131C 1 or 4 days after plating. After additional 24 h (days 2 and 5, respectively) cells were scraped off the plate and lysed. (E) Lysates were analysed *in toto* by SDS-PAGE under non-reducing conditions. PrP was detected using the mAb 3F4. The ratio of dimeric/monomeric PrP was quantified from at least three independent experiments (lower graph). Closed arrowheads indicate dimeric forms of PrP, open arrowheads indicate PrP monomers. (F) Mock-transfected dishes of ScN2a cells (2 and 5 day old) were lysed and treated with PK prior to western blotting. The relative amount of PK-resistant PrP<sup>Sc</sup> was quantified from at least three independent experiments (lower graph). (G) Dimeric PrP cannot be converted to PrP<sup>Sc</sup>. ScN2a cells were transfected with wt PrP, S131C, PrPΔHD or GFP-GPI and grown for 4 days. Cell lysates were treated with PK and remaining PrP was detected by western blot using the mAb 3F4. PK resistance is highlighted by a black frame. \**P* < 0.05.

neuronal cell death. In prion diseases, neurodegeneration is dependent on the expression of GPI-anchored PrP<sup>C</sup> in neuronal cells (Brandner *et al*, 1996; Mallucci *et al*, 2003; Chesebro *et al*, 2005). One possible explanation for this phenomenon is that PrP<sup>C</sup>-dependent pathways mediate toxic signalling of PrP<sup>Sc</sup> or prions. To analyse this possibility in more detail, we developed a novel assay based on the co-cultivation of uninfected cells with persistently infected ScN2a cells. The rationale of this approach was the observation that PrP<sup>Sc</sup> is actively released into the extracellular environment by PrP-expressing cells (Fevrier *et al*, 2004; Vella *et al*, 2007).

SH-SY5Y cells grown on cover slips were transiently transfected with wt PrP, or mutants lacking a stress-protective activity. A cover slip was then placed into a cell culture dish with N2a or ScN2a cells and apoptosis of SH-SY5Y cells was analysed after 16 h in co-culture (Figure 5A). Control-transfected SH-SY5Y cells expressing GPI-anchored GFP could be co-cultivated with N2a or ScN2a cells without adverse effects on cell viability (Figure 5B; GFP-GPI). Similarly, SH-SY5Y cells expressing wt PrP did not undergo apoptosis when co-cultured with uninfected N2a cells. However, a significant increase in apoptotic cell death was observed when SH-SY5Y



**Figure 5** Scrapie prions induce apoptosis in PrP<sup>C</sup>-expressing cells. (A) Schematic model of the co-cultivation assay. SH-SY5Y cells were grown on cover slips and transfected. At 3 h after transfection, cover slips were transferred to a cell culture dish with N2a or ScN2a cells and co-cultivated for 16 h. (B) Scrapie-infected cells induce apoptosis in wt PrP-expressing cells. SH-SY5Y cells were transiently transfected with the constructs indicated and co-cultivated with N2a or ScN2a cells for 16 h. Cells were fixed and stained for activated caspase-3. Apoptotic cells among the transfected were counted in at least three independent experiments. The percentage of apoptotic cells is shown. \*\*\**P*<0.0005; \**P*<0.05. Expression of PrP in the SH-SY5Y cells co-cultivated with N2a or ScN2a cells was analysed by immunoblotting using the mAb 3F4. Lower panel: SH-SY5Y cells were transiently transfected with GFP-GPI or wt PrP and co-cultivated with ScN2a or DOSPA-treated ScN2a cells. Apoptotic cell death in the SH-SY5Y cells was determined as described under (B). The western blot image was re-arranged by positioning lane ΔN to the right end of the blot, as indicated by a white line. All samples originate from one gel. (C) Parallel dishes of ScN2a and DOSPA-treated ScN2a cells were lysed and PrP present in the detergent-soluble (S) and -insoluble (P) fractions was analysed by western blotting using the anti-PrP antiserum A7 (lower panel). Actin analysed in whole lysates (WL).

cells expressing wt PrP were co-cultivated with ScN2a cells (Figure 5B; wt). As described above, expression of PrP<sup>ΔHD</sup> was toxic to SH-SY5Y cells; however, co-cultivation with ScN2a cells did not increase apoptotic cell death in PrP<sup>ΔHD</sup>-expressing SH-SY5Y cells (Figure 5B; ΔHD). Moreover, PrP-CD4, a mutant defective in stress-protective signalling and dimerization, did not sensitize SH-SY5Y cells to PrP<sup>Sc</sup>-induced apoptosis (Figure 5B; CD4).

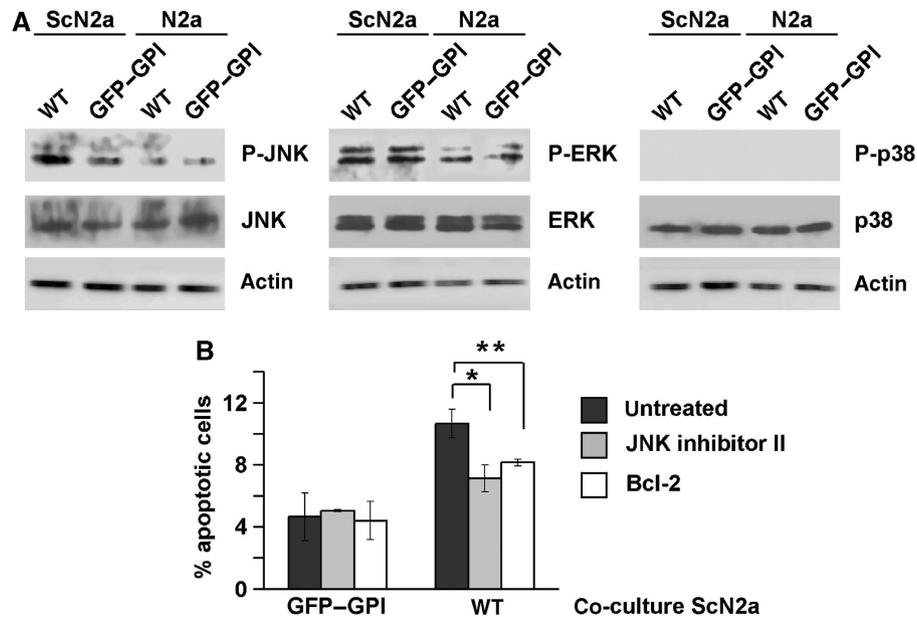
To provide support for the assumption that the inducer of toxicity is PrP<sup>Sc</sup>, we co-cultivated wt PrP-expressing SH-SY5Y cells with ScN2a cells 'cured' of PrP<sup>Sc</sup>. We have previously shown that incubation with DOSPA, a cationic lipopolyamine, efficiently reduced the levels of PrP<sup>Sc</sup> in ScN2a cells (Winklhofer and Tatzelt, 2000). In contrast to untreated ScN2a cells, DOSPA-treated ScN2a cells, which are characterized by a significantly reduced amount of PrP<sup>Sc</sup>, did not induce apoptosis in PrP-expressing SH-SY5Y cells (Figure 5C).

Thus, our cell culture co-cultivation assay revealed that scrapie-infected cells can induce apoptotic cell death in trans.

This toxic signalling was dependent on the propagation of PrP<sup>Sc</sup> in ScN2a cells and the expression of GPI-anchored wt PrP in co-cultured cells.

**Scrapie-induced apoptosis in PrP<sup>C</sup>-expressing cells is linked to the activation of the Jun N-terminal kinase and can be blocked by Jun N-terminal kinase inhibitors**

The experiments described above provided evidence for an apoptotic process in wt PrP-expressing SH-SY5Y cells when co-cultivated with ScN2a cells. To get insight into the intracellular pathways involved, we analysed key components of apoptotic signalling cascades. We observed phosphorylation of Jun N-terminal kinase (JNK) specifically in wt PrP-expressing SH-SY5Y cells upon co-cultivation with ScN2a cells (Figure 6A, left panel). We did not see consistent activation of ERK or p38 under these conditions, although ERK seems to become slightly activated when co-cultured with ScN2a cells (Figure 6A, middle and right panels). To test whether activation of JNK is linked to the apoptotic cell death of PrP-expressing SH-SY5Y cells, the JNK inhibitor II was added.



**Figure 6** Scrapie prions activate JNK only in wt PrP-expressing cells. (A) Co-cultivation with ScN2a cells activates JNK in wt PrP-expressing cells. SH-SY5Y cells were transfected with wt PrP or GFP-GPI and co-cultivated for 16 h with N2a or ScN2a cells. Cells were lysed, and phosphorylated and non-phosphorylated forms of JNK, ERK and p38 were analysed by western blotting. Blots were re-probed for actin to control for equal loading. (B) JNK inhibitors interfere with scrapie prion-induced apoptosis. Cells were transfected with GFP-GPI or wt PrP and incubated with the JNK inhibitor II (for 16 h, 1  $\mu$ M) or co-transfected with Bcl-2. Cells were co-cultivated for 16 h with ScN2a cells, fixed and stained for activated caspase-3. Apoptotic cells were counted and the percentage of apoptotic to transfected cells was evaluated, \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.005.

Indeed, cell death in PrP-expressing SH-SY5Y co-cultured with ScN2a cells was significantly reduced in the presence of the JNK inhibitor (Figure 6B). A similar reduction in apoptotic cell death was achieved by co-expressing the anti-apoptotic protein Bcl-2. The functionality of the JNK inhibitor was verified in cells exposed to anisomycin (data not shown).

## Discussion

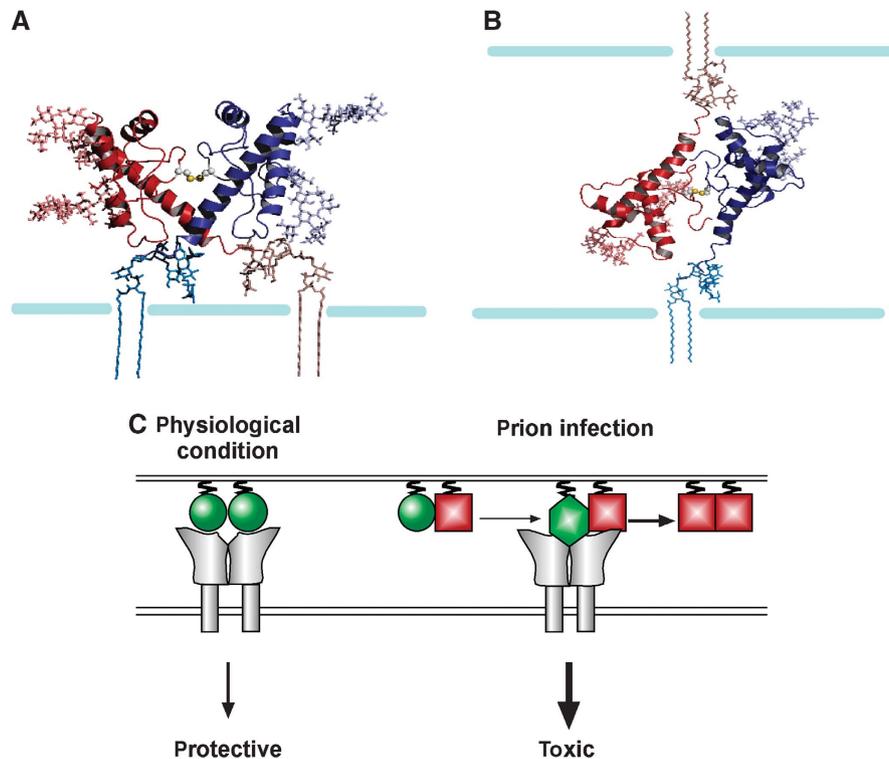
### Stress-protective signalling of PrP: a prominent role for the internal HD

In our study, we analysed various PrP mutants to define determinants of the neuroprotective activity of PrP<sup>C</sup>. First, we showed that expression of wt PrP conferred enhanced stress tolerance to cells, whereas deletion of the unstructured N terminus abolished this activity, corroborating previous findings in mice. Next, we identified two novel domains linked to the stress-protective activity of PrP: the internal HD and the C-terminal GPI anchor. PrP-CD4, a mutant with a transmembrane domain instead of a GPI anchor, is complex glycosylated and present at the outer leaflet of the plasma membrane; however, PrPCD4 is not targeted to detergent-insoluble microdomains. Possibly, PrP-CD4 cannot interact with a, yet unidentified, transmembrane protein necessary to induce signal transduction. The GPI anchor might provide a higher degree of structural flexibility favouring intermolecular interactions at the plasma membrane, or targeting of PrP to detergent-insoluble microdomains is a prerequisite for such an interaction.

Our study reinforces the prominent role of the internal HD in stress-protective signalling of PrP. Expression of PrP $\Delta$ HD can lead to apoptotic cell death and co-expression of wt PrP<sup>C</sup> interferes with pro-apoptotic signalling of PrP $\Delta$ HD. Our functional characterization of the HD allows the conclusion that

the stress-protective signalling of wt PrP<sup>C</sup> is linked to dimer formation with the HD as part of the dimer interface. The analysis of PrP<sup>C</sup> in cultured cells and mouse brain by native PAGE and crosslinking approaches provided experimental evidence that wt PrP can form homo-dimers and that deletion of the HD interferes with dimer formation. Further evidence was obtained by introducing a cysteine into the HD (PrP-S131C). Such an approach was successfully used to identify the dimerization domain of the transmembrane receptor ErbB-2/Her2 (Cao *et al*, 1992) and the amyloid precursor protein (Munter *et al*, 2007). Similarly to wt PrP, the PrP-S131C dimer was complex glycosylated, present at the plasma membrane in detergent-insoluble microdomains (rafts) and could be liberated by PIPLC digestion. Previous *in vitro* studies indicated that native PrP<sup>C</sup> purified from bovine brain exists as a monomer-dimer equilibrium, but not recombinant PrP, suggesting that post-translational modifications might be implicated in dimer formation (Meyer *et al*, 2000). This is in line with our observation that the GPI anchor is necessary for dimer formation. The formation of PrP dimers upon overexpression of hamster PrP in mouse cells was previously described (Priola *et al*, 1995), which seem to be different from the PrP dimers we describe in our study. Notably, the dimers we describe rapidly dissociate in the presence of SDS, are formed in a post-Golgi compartment and are complex glycosylated (Supplementary Figure 1).

On the basis of our data presented above and available NMR analysis (Riek *et al*, 1998; Liu *et al*, 1999), we built models of a PrP<sup>C</sup> dimer present at the cell surface (Figure 7). The dimer models were created by docking two identical PrP monomers with cysteines introduced at position 131, and looking for docking configurations, where the two opposing cysteines were positioned at a disulphide bridge distance. Figure 7 depicts two configurations, one, where both



**Figure 7** Putative model structures of a PrP<sup>C</sup> dimer. (A) Both monomers attached to the same cell. (B) 'Trans' dimer: monomers attached to neighbouring cells. The PrP dimers appear in cartoon representation, with the side chains of the cysteine residues in sphere representation; the Asn181 and Asn197-linked N-glycans and the GPI anchors appear in stick representations, whereas the membrane is a schematic drawing. Colouring scheme: the two monomers are in red and blue; the glycans and GPI anchor attached to the red monomer are coloured in red shades, and the ones attached to the blue monomer appear in blue shades, respectively. (C) A model for the stress-protective signalling of PrP<sup>C</sup> under physiological conditions and pro-apoptotic signalling induced by PrP<sup>Sc</sup>. PrP<sup>C</sup>: green circle; PrP<sup>Sc</sup>: red square; putative PrP receptor: grey. The model suggests the following scenario: (1) PrP<sup>C</sup> dimerizes and can induce protective signalling through a putative transmembrane receptor (either in trans or in cis). (2) Interaction of PrP<sup>C</sup> with PrP<sup>Sc</sup> is leading to a pathogenic PrP complex, which is still able to interact with the putative PrP<sup>C</sup> receptor; however, the interaction leads to an aberrant, toxic signalling.

monomers were attached to the same cell (Figure 7A), and the other configuration where the monomers were attached to adjacent cells (Figure 7B).

Different lines of evidence support the scenario that dimer formation of PrP<sup>C</sup> is essential for its neuroprotective activity. First, two PrP mutants impaired in dimer formation, PrP $\Delta$ H<sub>179-181</sub> and PrP-CD4, did not protect cells from stress-induced cell death. Second, stress treatment induced PrP dimerization. Third, scrapie prions interfere with dimer formation and the stress-protective activity of PrP<sup>C</sup>. However, dimer formation of PrP<sup>C</sup> seems to be required but not sufficient for its stress-protective activity: a PrP mutant lacking the unstructured N-terminal domain does not confer enhanced stress tolerance to cells. Cellular targeting and dimerization of PrP $\Delta$ N is not impaired, but the N-terminal domain might be required for a productive interaction of PrP with its putative co-receptor or for endocytosis of the signalling complex.

### Toxic signalling of scrapie prions in PrP<sup>C</sup>-expressing cells

Grafting experiments provided the first evidence that PrP<sup>Sc</sup> is not toxic to neurons devoid of PrP<sup>C</sup> (Brandner *et al*, 1996), which was corroborated by additional studies (Mallucci *et al*, 2003; Chesebro *et al*, 2005). On the basis of these animal models, two plausible scenarios for the toxic effects of PrP<sup>Sc</sup> can be envisaged. Either, neurotoxicity of PrP<sup>Sc</sup> is linked to its propagation in neuronal cells, which is dependent on the

expression of PrP<sup>C</sup>, or PrP<sup>Sc</sup> elicits a deadly signal through a PrP<sup>C</sup>-dependent signalling pathway. Please note that we are using PrP<sup>Sc</sup> as provisional term for a pathological conformer of PrP with neurotoxic activity. Whether this is a PK-resistant intermediate generated during the conversion process or an oligomer or fibril is unclear at the moment. Similarly, it might well be that the neurotoxic and the infectious PrP conformers are distinct species. Indeed, the existence of discrete conformers would explain the phenomenon of subclinical prion infection (Hill *et al*, 2000).

We developed a new co-cultivation assay based on the fact that PrP<sup>Sc</sup> is actively released into the extracellular environment through exosomes from scrapie-infected cells (Fevrier *et al*, 2004; Vella *et al*, 2007). This allowed us to study the toxic effects of prion replication mechanistically. Co-cultivation with ScN2a cells induced apoptosis in SH-SY5Y cells, but only when the latter transiently expressed wt PrP. N2a or ScN2a cells cured of PrP<sup>Sc</sup> did not induce apoptosis, indicating that the apoptotic effect was dependent on the presence of PrP<sup>Sc</sup>. Scrapie prion-induced cell death was paralleled by the activation of JNK in SH-SY5Y cells, and the addition of a JNK inhibitor to the co-cultivation medium significantly reduced apoptotic cell death in SH-SY5Y cells, providing a causal link between JNK activation and PrP<sup>Sc</sup>-induced apoptosis. This is in line with the observation that JNK is activated in the brains of scrapie-infected mice and hamsters (Carimalo *et al*, 2005; Lee *et al*, 2005).

**Table I** Characteristic features of the PrP constructs used in this study

PrP	Cell surface	DRM	Stress protective	Toxic	PrP <sup>Sc</sup> mediated	Conversion into PrP <sup>Sc</sup>
WT	+	+	+	–	++	++
S131C	+	+	+	–	+ <sup>a</sup>	–
ΔN	+	+	–	–	+	+ <sup>b</sup>
ΔHD	+	+	–	+	–	–
CD4	+	–	–	–	–	– <sup>b</sup>

DRM: detergent-resistant membranes.

<sup>a</sup>Data not shown.

<sup>b</sup>From previous publications.

Remarkably, our co-cultivation approach revealed that neurotoxic signalling induced by scrapie prions was dependent on a physiologically active PrP<sup>C</sup> (Table I). Expression of PrP mutants impaired in their stress-protective potential, such as PrP<sup>ΔN</sup> or PrP<sup>CD4</sup>, did not sensitize SH-SY5Y cells to PrP<sup>Sc</sup>-induced toxicity. In line with this observation, PrP<sup>ΔHD</sup> expression was toxic *per se*; however, PrP<sup>Sc</sup> did not increase the toxicity of PrP<sup>ΔHD</sup>. How can our data be brought together to explain the PrP<sup>C</sup>-dependent effects of PrP<sup>Sc</sup>? PrP<sup>Sc</sup> could modulate the interaction of PrP<sup>C</sup> with its putative co-receptor, possibly due to the formation of a PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>Sc</sup> complex. As a consequence, there is a switch from a stress-protective to a pro-apoptotic signalling, possibly due to over-stimulation of the receptor (Figure 7C). Indeed, pro-apoptotic signalling by PrP<sup>C</sup> can be induced *in vivo* by antibody-induced crosslinking (Solforosi *et al*, 2004). Compatible with the model of a common receptor for both apoptotic and antiapoptotic signalling is the toxic potential of PrP<sup>ΔHD</sup>. As suggested previously (Baumann *et al*, 2007; Li *et al*, 2007), deletion of the HD might alter the conformation of PrP and thereby the interaction with the PrP<sup>C</sup> co-receptor, resulting in toxic signalling.

We have now to await the identification of the signalling complex(es) to provide further experimental evidence for such pathways. A better understanding of the auxiliary components implicated in the physiological activity of PrP<sup>C</sup> and neurotoxic signalling of pathogenic PrP mutants will not only enhance our understanding of stress-induced signalling cascades in neuronal cells but might also allow to develop novel strategies for the treatment of prion diseases.

## Materials and methods

### Antibodies and reagents

The following antibodies were used: anti-PrP 3F4 monoclonal antibody (mAb; Kascsak *et al*, 1987), anti-PrP antiserum A7 (Winklhofer *et al*, 2003a), anti-active caspase-3 polyclonal antibody (Promega), anti-FLAG M2 mouse mAb (Sigma), Cy3-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Dianova), anti-phospho-SAPK/JNK, anti-phospho-p38, anti-phospho-p42/44, anti-JNK, anti-p38 and anti-ERK (Cell Signaling). The following reagents were used: kainic acid (Calbiochem), JNK inhibitor II (Calbiochem), endoglycosidase H (endoH; Calbiochem), peptide N-glycosidase F (PNGaseF; Calbiochem), proteinase-K (PK; Sigma), Brefeldin A (Sigma), 3,3'-dithiobis[sulphosuccinimidylpropionate] (DTSSP; Pierce). The mounting medium Mowiol (Calbiochem) was supplemented with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma).

### Plasmids

The following constructs were described previously: wt PrP, PrP-CD4, T183A (Winklhofer *et al*, 2003b; Kiachopoulos *et al*, 2005) and FLAG-Bcl-2 (Rambold *et al*, 2006). All amino-acid numbers refer to

the mouse PrP sequence (GenBank<sup>TM</sup> accession number NP 035300) or to human Bcl-2 sequence (GenBank<sup>TM</sup> accession number AAA51813). In PrP<sup>ΔHD</sup>, the amino acids 113–133 were deleted. For the generation of PrP-S131C a serine at position 131 was exchanged to a cysteine. In PrP<sup>ΔHD</sup>-S131C, the amino acids 112–128 were deleted. As transfection marker the EYFP-C1 vector (Clontech) was used.

### Cell culture, co-cultivation and curing experiments

Cells were cultivated and transfected as described earlier (Winklhofer and Tatzelt, 2000; Winklhofer *et al*, 2003b). For co-cultivation experiments, SH-SY5Y cells were grown on glass cover slips and transfected with LipofectAMINE Plus reagent. At 3 h after transfection, cover slips were transferred into dishes containing a 90% confluent cell layer of either N2a or ScN2a cells. After 16 h in co-culture, apoptotic cell death in SH-SY5Y cells was analysed (see below). ScN2a cells were cured of PrP<sup>Sc</sup> by treatment with DOSPA (Winklhofer and Tatzelt, 2000).

### Cell lysis, detergent solubility assay, western blotting and sucrose step gradient

As described earlier (Tatzelt *et al*, 1996), cells were washed twice with cold PBS, scraped off the plate and lysed in cold buffer A (0.5% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate in PBS). The lysates were either analysed directly or centrifuged to generate detergent-soluble (S) and -insoluble (P) fractions. SDS-PAGE and western blotting was described earlier (Winklhofer and Tatzelt, 2000). For the detection of phosphorylated proteins, cells were lysed in cold buffer B (20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and 1 μg/ml leupeptin), centrifuged for 10 min at 13 000 r.p.m. and the postnuclear supernatant was analysed by western blotting according to the manufacturer's instruction. For the sucrose step, gradient cells were harvested and resuspended in 200 μl buffer C (25 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6.5) containing 1% Triton X-100 and homogenized by passing 15 times through a Luer 21-gauge needle. After centrifugation at 500 g for 5 min, the supernatant was made up to 40% sucrose by adding an equal volume of 80% sucrose in buffer C. The sample was placed beneath a discontinuous gradient of sucrose consisting of 3 ml of 30% sucrose and 1 ml of 5% sucrose, both in buffer C. The samples were then centrifuged at 140 000 g in a SW-55 rotor (Beckman Coulter) for 18 h at 4°C. The sucrose gradient was harvested in 0.5 ml fractions from the top of the gradient, precipitated by TCA and analysed by western blotting.

### Chemical crosslinking

Transfected N2a, SH-SY5Y cells or total mouse brain were lysed by addition of 150 μl or 1 ml of crosslinking buffer (250 mM sucrose, 5 mM Hepes (pH 7.4), 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 10 mM KCl), respectively, and passing 15 times through a Luer 21-gauge needle. After centrifugation for 20 min at 800 g, the supernatant was incubated with the chemical crosslinker DTSSP for 1 h at 4°C as specified by the manufacturer, at the concentrations indicated. Proteins were precipitated by TCA and analysed by western blotting.

### Conversion assay

ScN2a cells were transfected with 2 μg DNA and grown for 4 days until total confluency. Cells were lysed in cold buffer A and centrifuged for 1 min at 1000 g. The supernatant was incubated with 10 μg/ml PK for 40 min at 22°C and the reaction was quenched by

addition of 2 mM PMSF. Residual proteins were precipitated by TCA and transfected PrP was detected by western blotting using the mAb 3F4.

#### **Stress induction, phospholipase C and JNK inhibitor treatment**

Kainic acid was dissolved in water and added to the cell culture medium. JNK inhibitor II was dissolved in water and cells were incubated with 1  $\mu$ M for 16 h at 37°C during co-cultivation. Phospholipase C treatment was described earlier (Winklhofer *et al*, 2003b). Briefly, cells were washed twice with ice-cold PBS and PIPLC in PBS was added to the cells for 3 h at 37°C. Cell culture supernatants were collected and proteins were precipitated by TCA.

#### **Native PAGE**

PrP-transfected SH-SY5Y cells were treated with PIPLC and proteins in the cell culture supernatant were collected and concentrated by centrifugation at 1000 g for 15 min at 4°C in Vivaspinn tubes (excision size: 30 000 MW; Vivascience). Sample buffer (6  $\times$ ; 360 mM Tris-HCl (pH 6.8), 60% glycerol, 0.4% Coomassie blue brilliant servablue) was added to the concentrated samples and the samples were loaded on native gels. Native gels consisted of stacking gel (4% acrylamid, 150 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% TEMED, 0.1% APS) and resolving gel (8% acrylamid, 375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% TEMED, 0.1% APS). Gel running was performed in gel running buffer (25 mM Tris and 189 mM glycine) for 4 h with increasing working voltage (80–180 V). The proteins were transferred to a PVDF membrane (Millipore Immobilon) in blotting buffer (20 mM Tris, 150 mM glycine and 20% methanol) for 60 min at 80 V. The membrane was dried and extensively washed in isopropanol, neutralized in H<sub>2</sub>O for 1 min, washed with PBST for 10 min and blocked with 5% milk in PBST.

#### **Proliferation and cell survival measurements**

Equal cell numbers of N2a and ScN2a cells were seeded. The proliferation rate of both cell lines was determined by counting trypsinated cells daily over a period of 5 days using a Neubauer-counting chamber. For cell survival measurements, cells were stressed 4 days after seeding with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min, or subjected to a 46°C heat shock. At 24 h after stress treatment, cells were trypsinated and the number of live cells was determined by Trypan blue exclusion assay.

#### **Apoptosis assay**

As described before (Rambold *et al*, 2006), SH-SY5Y cells were grown on glass cover slips, fixed with 3% PFA for 20 min and permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 10 min at room temperature. The primary antibody anti-active caspase-3 was

incubated for 45 min at 37°C in 1% BSA. After extensive washing with cold PBS, incubation with the Cy3-conjugated secondary antibody followed at 20°C for 90 min. Cells were mounted onto glass slides and examined by fluorescence microscopy using a Zeiss Axiovert 200 M microscope (Carl Zeiss). The number of activated caspase-3-positive cells out of 300 transfected cells was determined. All quantifications were based on triplicates of at least three independent experiments.

#### **Generation of the PrP dimer model**

The PrP dimer was built by docking two copies of the known structure of a PrP monomer to each other. The monomer structure used was the NMR structure of the mouse prion protein domain mPrP (amino acids 121–231) solved by Wutrich's group (pdb file: 1XYX) (Riek *et al*, 1998). A cysteine residue was introduced by inserting a S131C substitution using the NEST homology modeling package (Petrey *et al*, 2003), with default parameters. To create the S-S-bonded dimer, two identical monomers were docked, using the ZDOCK software (<http://zlab.bu.edu/zdock>) (Mintseris *et al*, 2005); ZDOCK is a rigid-body docking software that searches for possible binding configurations of the proteins, and evaluates them based on shape complementarity, desolvation energy and electrostatics. ZDOCK provides a series of putative docking configurations. Docking was limited to configurations in which the contact between the monomers involved the cysteines and their surroundings. The resulting predicted structures were then filtered for configurations in which the cysteines were at a distance of 6 Å or less. Thereafter, the cysteines were bonded using the PyMol.

#### **Statistical analysis**

Data were expressed as means  $\pm$  s.e. All experiments were performed in triplicates and repeated at least three times. Statistical analysis among groups was performed using student's *t*-test. *P*-values are as follows: \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.005 and \*\*\**P* < 0.0005.

#### **Supplementary data**

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (<http://www.embojournal.org>).

## **Acknowledgements**

We are grateful to Christian Haass for continuous support and stimulating discussions. We thank Margit Miesbauer for critically reading the paper and for helpful discussions. This study was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 596), the Max Planck Society and the BMBF (BioDisc, DIP5.1).

## **References**

- Aguzzi A, Polymenidou M (2004) Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* **116**: 313–327
- Baumann F, Tolnay M, Brabeck C, Pahnke J, Kloz U, Niemann HH, Heikenwalder M, Rulicke T, Burkle A, Aguzzi A (2007) Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *EMBO J* **26**: 538–547
- Borchelt DR, Taraboulos A, Prusiner SB (1992) Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem* **267**: 16188–16199
- Bosque PJ, Prusiner SB (2000) Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection. *J Virol* **74**: 4377–4386
- Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, Marino S, Weissmann C, Aguzzi A (1996) Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* **379**: 339–343
- Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner R-A, Autenried P, Aguet M, Weissmann C (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**: 1339–1347
- Butler DA, Scott MRD, Bockman JM, Borchelt DR, Taraboulos A, Hsiao KK, Kingsbury DT, Prusiner SB (1988) Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J Virol* **62**: 1558–1564
- Cao H, Bangalore L, Dompe C, Bormann BJ, Stern DF (1992) An extra cysteine proximal to the transmembrane domain induces differential cross-linking of p185neu and p185neu. *J Biol Chem* **267**: 20489–20492
- Carimalo J, Cronier S, Petit G, Peyrin JM, Boukhtouche F, Arbez N, Lemaigre-Dubreuil Y, Brugg B, Miquel MC (2005) Activation of the JNK-c-Jun pathway during the early phase of neuronal apoptosis induced by PrP106-126 and prion infection. *Eur J Neurosci* **21**: 2311–2319
- Caughey B, Raymond GJ (1991) The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* **266**: 18217–18223
- Chesebro B (2003) Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. *Br Med Bull* **66**: 1–20
- Chesebro B, Trifilo M, Race R, Meade-White K, Teng C, LaCasse R, Raymond L, Favara C, Baron G, Priola S, Caughey B, Masliah E, Oldstone M (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* **308**: 1435–1439
- Collinge J (2001) Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* **24**: 519–550
- Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 9683–9688
- Hill AF, Joiner S, Linehan J, Desbruslais M, Lantos PL, Collinge J (2000) Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 10248–10253

- Holscher C, Delius H, Burkle A (1998) Overexpression of nonconvertible PrPc delta114-121 in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells leads to trans-dominant inhibition of wild-type PrP(Sc) accumulation. *J Virol* **72**: 1153-1159
- Kacsak RJ, Rubenstein R, Merz PA, Tonna-DeMasi M, Fersko R, Carp RI, Wisniewski HM, Diringer H (1987) Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J Virol* **61**: 3688-3693
- Kiachopoulos S, Bracher A, Winklhofer KF, Tatzelt J (2005) Pathogenic mutations located in the hydrophobic core of the prion protein interfere with folding and attachment of the glycosylphosphatidylinositol anchor. *J Biol Chem* **280**: 9320-9329
- Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T (1999) Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* **400**: 225-226
- Lee HP, Jun YC, Choi JK, Kim JI, Carp RI, Kim YS (2005) Activation of mitogen-activated protein kinases in hamster brains infected with 263K scrapie agent. *J Neurochem* **95**: 584-593
- Li A, Christensen HM, Stewart LR, Roth KA, Chiesa R, Harris DA (2007) Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105-125. *EMBO J* **26**: 548-558
- Liu H, Farr-Jones S, Ulyanov NB, Llinas M, Marqusee S, Groth D, Cohen FE, Prusiner SB, James TL (1999) Solution structure of Syrian hamster prion protein rPrP(90-231). *Biochemistry* **38**: 5362-5377
- Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klohn PC, Brandner S, Collinge J (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* **302**: 871-874
- McLennan NF, Brennan PM, McNeill A, Davies I, Fotheringham A, Rennison KA, Ritchie D, Brannan F, Head MW, Ironside JW, Williams A, Bell JE (2004) Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *Am J Pathol* **165**: 227-235
- Meyer RK, Lustig A, Oesch B, Fatzer R, Zurbriggen A, Vandevelde M (2000) A monomer-dimer equilibrium of a cellular prion protein (PrPc) not observed with recombinant PrP. *J Biol Chem* **275**: 38081-38087
- Mintseris J, Wiehe K, Pierce B, Anderson R, Chen R, Janin J, Weng Z (2005) Protein-protein docking benchmark 2.0: an update. *Proteins* **60**: 214-216
- Mitteregger G, Vosko M, Krebs B, Xiang W, Kohlmannsperger V, Nolting S, Hamann GF, Kretzschmar HA (2007) The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein. *Brain Pathol* **17**: 174-183
- Munter LM, Voigt P, Harmeier A, Kaden D, Gottschalk KE, Weise C, Pipkorn R, Schaefer M, Langosch D, Multhaup G (2007) GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *EMBO J* **26**: 1702-1712
- Petrey D, Xiang Z, Tang CL, Xie L, Gimpelev M, Mitros T, Soto CS, Goldsmith-Fischman S, Kernytsky A, Schlessinger A, Koh IY, Alexov E, Honig B (2003) Using multiple structure alignments, fast model building, and energetic analysis in fold recognition and homology modeling. *Proteins* **53** (Suppl 6): 430-435
- Priola SA, Caughey B, Wehrly K, Chesebro B (1995) A 60-kDa prion protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP. *J Biol Chem* **270**: 3299-3305
- Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE (1998) Prion protein biology. *Cell* **93**: 337-348
- Rambold AS, Miesbauer M, Rapaport D, Bartke T, Baier M, Winklhofer KF, Tatzelt J (2006) Association of Bcl-2 with misfolded prion protein is linked to the toxic potential of cytosolic PrP. *Mol Biol Cell* **17**: 3356-3368
- Riek R, Wider G, Billeter M, Hornemann S, Glockshuber R, Wuthrich K (1998) Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11667-11672
- Shmerling D, Hegyi I, Fischer M, Blättler T, Brandner S, Götz J, Rüllicke T, Flechsig E, Cozzio A, von Mehning C, Hangartner C, Aguzzi A, Weissmann C (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* **93**: 203-214
- Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Ding DC, Li KW, Chen SF, Yang HL, Li H (2005) Overexpression of PrPc by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model. *J Neurosci* **25**: 8967-8977
- Solforosi L, Criado JR, McGavern DB, Wirz S, Sanchez-Alavez M, Sugama S, DeGiorgio LA, Volpe BT, Wiseman E, Abalos G, Masliah E, Gilden D, Oldstone MB, Conti B, Williamson RA (2004) Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis *in vivo*. *Science* **303**: 1514-1516
- Spudich A, Frigg R, Kilic E, Kilic U, Oesch B, Raeber A, Bassetti CL, Hermann DM (2005) Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1. *Neurobiol Dis* **20**: 442-449
- Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Laszlo L, Prusiner SB (1995) Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol* **129**: 121-132
- Tatzelt J, Prusiner SB, Welch WJ (1996) Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J* **15**: 6363-6373
- Vella LJ, Sharples RA, Lawson VA, Masters CL, Cappai R, Hill AF (2007) Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol* **211**: 582-590
- Warwicker J (2000) Modeling a prion protein dimer: predictions for fibril formation. *Biochem Biophys Res Commun* **278**: 646-652
- Weise J, Sandau R, Schwarting S, Crome O, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Bahr M (2006) Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* **37**: 1296-1300
- Weissmann C, Fischer M, Raeber A, Büeler H, Sailer A, Shmerling D, Rüllicke T, Brandner S, Aguzzi A (1996) The role of PrP in pathogenesis of experimental scrapie. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **61**: 511-522
- Westergard L, Christensen HM, Harris DA (2007) The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**: 629-644
- Winklhofer KF, Heller U, Reintjes A, Tatzelt J (2003a) Inhibition of complex glycosylation increases formation of PrPSc. *Traffic* **4**: 313-322
- Winklhofer KF, Hesse J, Heller U, Reintjes A, Muranji W, Moarefi I, Tatzelt J (2003b) Determinants of the *in vivo*-folding of the prion protein: a bipartite function of helix 1 in folding and aggregation. *J Biol Chem* **278**: 14961-14970
- Winklhofer KF, Tatzelt J (2000) Cationic lipopolyamines induce degradation of PrPSc in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *Biol Chem* **381**: 463-469
- Winklhofer KF, Tatzelt J, Haass C (2008) The two faces of protein misfolding: gain and loss of function in neurodegenerative diseases. *EMBO J* **27**: 336-349

## Green tea extracts interfere with the stress-protective activity of PrP<sup>C</sup> and the formation of PrP<sup>Sc</sup>

Angelika S. Rambold,<sup>\*,1</sup> Margit Miesbauer,<sup>\*,1</sup> Diana Olschewski,<sup>†</sup> Ralf Seidel,<sup>†</sup> Constanze Riemer,<sup>‡</sup> Lindsay Smale,<sup>\*</sup> Lisa Brumm,<sup>\*</sup> Michal Levy,<sup>§</sup> Ehud Gazit,<sup>§</sup> Dieter Oesterhelt,<sup>¶</sup> Michael Baier,<sup>‡</sup> Christian F. W. Becker,<sup>†,2</sup> Martin Engelhard,<sup>†</sup> Konstanze F. Winklhofer<sup>\*,3</sup> and Jörg Tatzelt<sup>\*,3</sup>

<sup>\*</sup>Department of Biochemistry, Neurobiochemistry, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Germany

<sup>†</sup>Department of Physical Biochemistry, Max-Planck-Institute of Molecular Physiology, Dortmund, Germany

<sup>‡</sup>Robert-Koch-Institut, Berlin, Germany

<sup>§</sup>Department of Molecular Microbiology and Biotechnology, George S. Wise Faculty of Life Sciences, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel

<sup>¶</sup>Department of Membrane Biochemistry, Max-Planck-Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany

### Abstract

A hallmark in prion diseases is the conformational transition of the cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) into a pathogenic conformation, designated scrapie prion protein (PrP<sup>Sc</sup>), which is the essential constituent of infectious prions. Here, we show that epigallocatechin gallate (EGCG) and gallic acid, the main polyphenols in green tea, induce the transition of mature PrP<sup>C</sup> into a detergent-insoluble conformation distinct from PrP<sup>Sc</sup>. The PrP conformer induced by EGCG was rapidly internalized from the plasma membrane and degraded in lysosomal compartments. Isothermal titration calorimetry studies revealed that EGCG directly interacts with PrP leading to the destabilizing of the native conformation and the formation of random coil

structures. This activity was dependent on the gallate side chain and the three hydroxyl groups of the trihydroxyphenyl side chain. In scrapie-infected cells EGCG treatment was beneficial; formation of PrP<sup>Sc</sup> ceased. However, in uninfected cells EGCG interfered with the stress-protective activity of PrP<sup>C</sup>. As a consequence, EGCG-treated cells showed enhanced vulnerability to stress conditions. Our study emphasizes the important role of PrP<sup>C</sup> to protect cells from stress and indicate efficient intracellular pathways to degrade non-native conformations of PrP<sup>C</sup>. **Keywords:** epigallocatechin, green tea, neurodegeneration, prion, scrapie, stress-protection.

*J. Neurochem.* (2008) **107**, 218–229.

The cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) is a highly conserved glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein, mainly present at the plasma membrane of neuronal and lymphatic cells. In prion diseases of humans and mammals PrP<sup>C</sup> is converted into a detergent-insoluble and partially proteinase K (PK)-resistant isoform, designated scrapie PrP (PrP<sup>Sc</sup>), which is the main component of infectious prions (reviewed in Collinge 2001; Prusiner *et al.* 1998; Weissmann *et al.* 1996; Chesebro 2003). The mechanism of PrP<sup>Sc</sup> formation is still enigmatic but the conversion is thought to occur after PrP<sup>C</sup> has reached the plasma membrane or is re-internalized for degradation (Caughey and Raymond 1991; Caughey *et al.* 1991; Borchelt *et al.* 1992). In the majority of prion diseases, neurodegeneration is tightly linked to the formation of infectious prions; however, studies in transgenic animals indicated that misfolding or mistargeting of PrP can induce neuronal cell death even in the absence of prion propagation

Received March 31, 2008; revised manuscript received July 22, 2008; accepted July 23, 2008.

Address correspondence and reprint requests to Jörg Tatzelt, Department of Biochemistry, Neurobiochemistry, Ludwig-Maximilians-Universität München, Schillerstrasse 44, München D-80336, Germany. E-mail: Joerg.Tatzelt@med.uni-muenchen.de

<sup>1</sup>Both these authors contributed equally to this study.

<sup>2</sup>The present address of Christian F. W. Becker is Department of Chemistry, Technische Universität München, Lichtenbergstr. 4, Garching 85747, and Center of Integrated Protein Science, Munich, Germany.

<sup>3</sup>Senior authors.

**Abbreviation used:** CD, circular dichroism; ECG, epicatechin gallate; EGCG, epigallocatechin gallate; eq, molar equivalents; GCG, gallic acid; GFP, green fluorescent protein; GPI, glycosylphosphatidylinositol; HD, hydrophobic domain; PBS, phosphate-buffered saline; PK, proteinase K; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PrP<sup>C</sup>, cellular prion protein; PrP<sup>Sc</sup>, scrapie prion protein; rPrP, recombinant mouse prion protein; RT, room temperature; ScN2a, scrapie-infected N2a; SDS/PAGE, sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis.

(reviewed in Winklhofer *et al.* 2008). How PrP<sup>Sc</sup> or neurotoxic PrP mutants cause neurodegeneration remains elusive (reviewed in Hunter 2006), but different studies indicate that neuronal expression of GPI-anchored PrP<sup>C</sup> is required to mediate neurotoxic effects of prion propagation (Brandner *et al.* 1996; Mallucci *et al.* 2003; Chesebro *et al.* 2005). On the other hand, PrP<sup>C</sup> expression can alleviate the toxic effects of PrP<sup>ΔHD</sup>, a PrP mutant devoid of the internal hydrophobic domain (HD) (Shmerling *et al.* 1998; Baumann *et al.* 2007; Li *et al.* 2007). This activity of PrP<sup>C</sup> could be related to its physiological function. Employing stroke models in mice and rats it was demonstrated that wt PrP<sup>C</sup> has a neuroprotective activity after an ischemic insult (McLennan *et al.* 2004; Shyu *et al.* 2005; Spudich *et al.* 2005; Weise *et al.* 2006; Mitteregger *et al.* 2007). This stress-protective activity was dependent on the octarepeat region located in the unstructured N-terminal domain of PrP<sup>C</sup> (Mitteregger *et al.* 2007). Recently, we have identified two novel domains linked to the stress-protective activity of PrP: the internal HD and the C-terminal GPI anchor. Based on a functional characterization of the HD it appeared that the stress-protective signaling of wt PrP<sup>C</sup> is linked to dimer formation with the HD as part of the dimer interface (Rambold *et al.* 2008). Based on these and other studies in cultured cells it seems plausible to assume that PrP<sup>C</sup> can confer enhanced survival under stress (reviewed in Flechsig and Weissmann 2004; Roucou and LeBlanc 2005; Westergard *et al.* 2007).

Mature PrP<sup>C</sup> can be internalized to be degraded in a lysosomal compartment or to recycle to the plasma membrane (Shyng *et al.* 1993). Internalization of PrP<sup>C</sup> is mediated mainly by the unstructured N-terminal domain (Shyng *et al.* 1995; Nunziante *et al.* 2003; Sunyach *et al.* 2003; Kiachopoulos *et al.* 2004); however, the precise mechanism is controversial. Two internalization pathways, via coated pits or caveolae-dependent structures, have been described (Shyng *et al.* 1994; Marella *et al.* 2002; Peters *et al.* 2003; Sunyach *et al.* 2003).

Down-regulation of cell surface localized PrP<sup>C</sup> by stimulating endocytosis could be a strategy to interfere with prion propagation. Experiments in scrapie-infected hamsters indicated that suramin, a polysulfonated naphthylurea derivative which has been used for the treatment of African trypanosomiasis (Dressel and Oesper 1961), can prolong the incubation time (Ladogana *et al.* 1992). Subsequent studies provided a mechanistic explanation for the anti-prion activity of suramin; it induces a conformational transition of PrP<sup>C</sup> into a detergent-insoluble conformation. This conformational transition induces rapid internalization, mediated by the unstructured N-terminal domain, and subsequent intracellular degradation of PrP<sup>C</sup> in a lysosomal compartment (Kiachopoulos *et al.* 2004). As a consequence, PrP<sup>Sc</sup> propagation was inhibited in scrapie-infected mouse neuroblastoma (ScN2a) cells and the onset of prion disease was significantly delayed in scrapie-infected mice (Gilch *et al.* 2001).

Down-regulation of cell surface PrP<sup>C</sup> by stimulating endocytosis was also described for copper (Pauly and Harris 1998; Sumudhu *et al.* 2001). Indeed, it turned out that copper, similarly to suramin, has an impact on the conformation of PrP<sup>C</sup> at the cell surface and interferes with the propagation of PrP<sup>Sc</sup> in scrapie-infected cells (Kiachopoulos *et al.* 2004). What might be the functional relevance of this phenomenon? Internalization of detergent-insoluble conformers of PrP<sup>C</sup> and their subsequent degradation in a lysosomal compartment might function as a cellular quality control mechanism to eliminate non-native, presumably non-functional PrP<sup>C</sup> conformers from the cell surface. The copper-induced conformational transition of PrP<sup>C</sup> might act as a stimulus for the internalization of copper-bound PrP<sup>C</sup>, suggesting a role in copper homeostasis or signal transduction. Thus, the conformational plasticity of PrP<sup>C</sup> might not only confer susceptibility to misfolding and conversion into a pathogenic conformer, it could also be an immanent feature associated with the physiological function of PrP<sup>C</sup>.

In this study, we show that epigallocatechin gallate (EGCG) and gallic acid (GCG), the major polyphenols in green tea, induce rapid transition of PrP<sup>C</sup> into a detergent-insoluble conformation. As a consequence, EGCG- or GCG-treated cells are depleted of mature PrP<sup>C</sup> localized at the cell surface; these cells are protected against PrP<sup>Sc</sup> propagation, however, they are more vulnerable to stress-induced cell death.

## Material and methods

### Reagents, antibodies, and plasmids

Green tea extracts (–)-GCG (G6782), (–)-EGCG (E4143), and (–)-epicatechin gallate (ECG; E3893), black tea extract (T5550) and caffeine (C0750), cupric sulfate (CuSO<sub>4</sub>) as well as NH<sub>4</sub>Cl were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA), MG132, kainate, and bafilomycin A1 from Calbiochem (San Diego, CA, USA). For the incubation of cells, green tea extracts, CuSO<sub>4</sub>, kainate, and NH<sub>4</sub>Cl were dissolved in bidistilled H<sub>2</sub>O, bafilomycin A1, and MG132 in dimethylsulfoxide. The following antibodies were used: anti-PrP 3F4 monoclonal antibody (Kasczak *et al.* 1987), anti-PrP antiserum A7 (Winklhofer *et al.* 2003), anti-heat-shock protein 70 antibody N27 (kindly provided by William J. Welch), anti-β actin antibody (Sigma), and anti-Active Caspase 3 antibody (Promega, Madison, WI, USA). The plasmid [pcDNA3.1Zeo(+); Invitrogen, Carlsbad, CA, USA] encoding for wt PrP contains the 3F4 epitope and was described previously (Gilch *et al.* 2001). Notably, the 3F4 antibody recognizes endogenous human PrP (SH-SY5Y cells) and the 3F4-tagged mouse PrP (wt PrP) used for transfection. Anti-PrP antiserum A7 recognizes human and murine PrP.

### Cell culture and transfection

SH-SY5Y, N2a, and ScN2a cells were cultivated as described earlier (Winklhofer and Tatzelt 2000). Cells were transfected by a liposome-mediated method using Lipofectamine Plus reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

### Detergent solubility assay, proteinase K digestion of cell lysates, and western blot analysis

As described previously (Tatzelt *et al.* 1996), cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), scraped off the plate, pelleted by centrifugation, and lysed in cold detergent buffer (0.5% Triton X-100 and 0.5% sodium deoxycholate in PBS). The lysate was centrifuged at 15 000 *g* for 20 min at 4°C. After boiling in Laemmli sample buffer, proteins present in the supernatant and pellet fraction were subjected to sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE). Following SDS/PAGE, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane and analyzed by immunoblotting as previously described (Tatzelt *et al.* 1996). For PK digestion, PK (20 µg/mL) was added to the supernatant and the resuspended pellet. After 40 min at 25°C, the digestion was terminated by the addition of phenylmethylsulfonyl f (PMSF) and residual PrP detected by western blotting. Quantifications were performed using AIDA quantification software (Raytest, Straubenhardt, Germany) and were based on at least three independent experiments. Data were expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test.

### Indirect immunofluorescence assay

Indirect immunofluorescence assays were performed as described (Rambold *et al.* 2006). In brief, N2a cells were grown on glass coverslips and fixed with 3% para-formaldehyde for 20 min. To detect specifically cell surface PrP, antibody incubation was performed directly after fixation without permeabilization. To detect total PrP, cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min at 25°C prior to antibody incubation. The primary antibody was incubated for 45 min at 37°C in PBS containing 1% bovine serum albumin. After extensive washing with cold PBS, incubation with the Cy3-conjugated secondary antibody followed at 37°C for 30 min. Cells were mounted onto glass slides and examined by fluorescence microscopy (Zeiss LSM 510 Zeiss AxioScope2 plus; Zeiss, Thornwood, NY, USA).

### Apoptosis assay

Activation of caspase 3 was determined as described previously (Rambold *et al.* 2006). Briefly, SH-SY5Y cells were grown on glass coverslips; 24 h after transfection, cells were incubated with kainate (500 µM) for 4 h. N2a cells were cultivated on coverslips for 3 days and treated with copper (500 µM) for 5 h. The cells were then fixed with 3% para-formaldehyde for 20 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min at 25°C, and blocked with 1% bovine serum albumin in PBS for 1 h at 25°C. Fixed cells were incubated with anti-active caspase 3 antibody for 16 h at 4°C, washed, and incubated with Alexa 555-conjugated secondary antibody for 1 h at 25°C. After extensive washing, cells were mounted onto glass slides and examined by fluorescence microscopy using a Zeiss AxioScope 2 plus microscope. To detect cells undergoing apoptosis, the number of activated caspase 3-positive cells out of at least 300 transfected cells was determined. Quantifications were based on at least three independent experiments. Data were expressed as mean ± SEM.

### Expression, purification, and refolding of recombinant PrP(89–232)

N-terminally truncated recombinant mouse prion protein (rPrP) was cloned into the pTXB3 vector and expressed in *Escherichia coli*

BL21(DE3) RIL (Stratagene, La Jolla, CA, USA) as a fusion protein, N-terminally attached to *GyrA* intein from *Mycobacterium Xenopii* and a chitin-binding domain separated by a His tag. Protein expression, purification, and cleavage of the fusion proteins was carried out as described before (Olschewski *et al.* 2007). The denatured protein was diluted to a final concentration of 0.1 mg/mL into a buffer containing 0.6 M L-arginine, 50 mM Tris-HCl, pH 8.6, 5 mM GSH, and 0.5 mM GSSG and kept for 12 h at 4°C. To remove L-arginine and the redox reagent GSSG, the solution was dialyzed against a buffer containing 50 mM Tris-HCl at pH 7.5. The protein solution was concentrated by ultrafiltration to yield solutions with concentrations of rPrP between 27 and 50 µM.

### CD spectroscopy

Far-UV circular dichroism (CD) spectra (200–250 nm) were recorded on a Jasco J-715 spectropolarimeter (Jasco, Easton, MD, USA) in a 0.1 cm cuvette. For measurements, the concentration of rPrP was adjusted to 0.2 mg/mL (12.5 µM) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5).

### In vitro aggregation assay and proteinase K digestion

Folded rPrP (50 µM) was dialyzed against urea-buffer consisting of 3 M urea, 1 M Gdn-HCl, 150 mM NaCl, and 20 mM Na-phosphate buffer at pH 6.8. Samples were incubated at 37°C for 3 days. Aggregation was tested by PK digestion. Digestion was carried out using an rPrP to enzyme ratio of 50 : 1 at 37°C in 100 mM Tris-HCl, pH 7.5. After 1 h, the reaction was stopped by adding PMSF. The efficiency of proteolysis was analyzed by SDS/PAGE and western blotting.

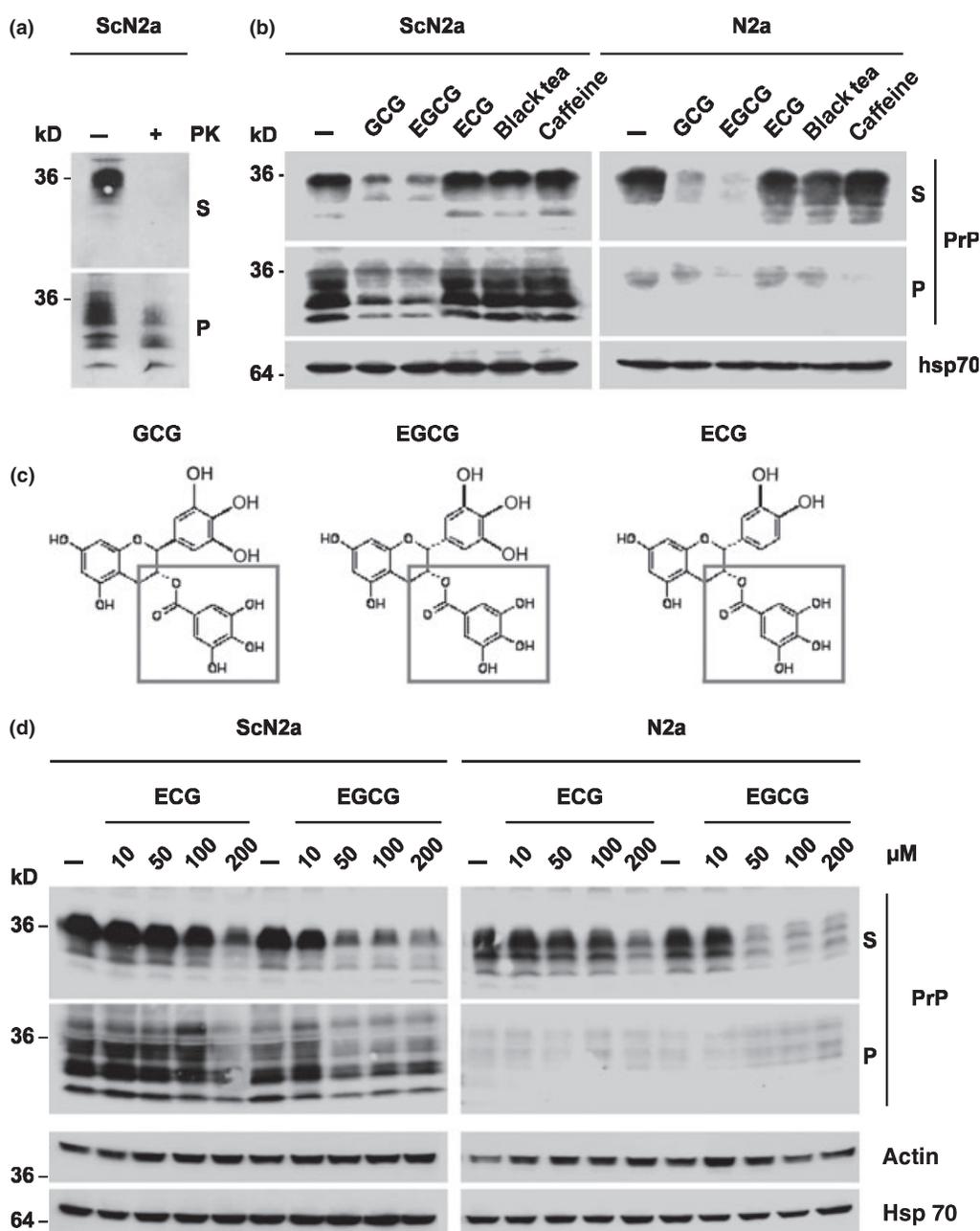
### ITC measurements

Isothermal titration calorimetry was carried out on an automated VP-ITC device (MicroCal, Northampton, MA, USA). The ITC cell was filled with 1.8 mL of a 27 µM rPrP solution and titrated in step of 8 µL with a 0.5 mM solution of inhibitor at various temperatures. The time interval between injections was 1400 s. Control experiments were carried out using 27 µM rPrP in the cell and buffer in the syringe and 0.5 M EGCG in the syringe and buffer in the cell. The data sets were evaluated using the software package Origin-ITC (MicroCal, Northampton, MA, USA).

## Results

### Epigallocatechin gallate depletes cells of PrP<sup>C</sup> and interferes with the formation of PrP<sup>Sc</sup>

The present study was designed to identify new small molecules that would interfere with the propagation of PrP<sup>Sc</sup>. The screen was based on a collection of natural compounds with a documented activity to interfere with amyloid fibril formation *in vitro* (Porat *et al.* 2006). We used scrapie-infected N2a (ScN2a) cells as a model to study propagation of PK-resistant PrP<sup>Sc</sup> and infectious scrapie-prions in rodent cells (Butler *et al.* 1988; Caughey and Raymond 1991). A fast and robust method to determine the relative amount of PrP<sup>Sc</sup> is the detergent solubility assay. It relies on the fact that upon lysis of ScN2a cells in detergent buffer the pathogenic,



**Fig. 1** Epigallocatechin gallate and gallic acid derived from green tea interfere with the formation of PrP<sup>Sc</sup>. (a) PK-resistant PrP partitions in the detergent-insoluble fraction. ScN2a cells were lysed in detergent buffer and fractionated by centrifugation. The fractions were treated with PK (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 40 min, RT) or left untreated (PK -) and PrP present in the detergent-soluble (S) and -insoluble fraction (P) was analyzed by western blotting using the anti-PrP antiserum A7. (b) N2a and ScN2a cells were grown for 3 days. Gallic acid (GCG), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin gallate (ECG), black tea extract, or caffeine (100  $\mu\text{M}$  each) dissolved in water were added to the cell culture medium and cells were cultivated for additional 48 h. Cells were lysed in detergent buffer and fractionated by

centrifugation. PrP present in the detergent soluble (S) and insoluble fraction (P) was analyzed by western blotting using the anti-PrP antiserum A7. As a control, heat-shock protein (HSP70) present in the supernatant was detected by the mAb N27. (c) Molecular structure of the tested components from green tea extract. GCG: (-)-gallic acid, EGCG: (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) and ECG: (-)-epicatechin gallate. The hydroxyl groups (bold) and the gallate side chain (boxed) required for the anti-PrP<sup>Sc</sup> activity are marked. (d) N2a and ScN2a cells were subjected to increasing concentrations of ECG and EGCG, as indicated. PrP was analyzed as described under (b). As a control, HSP70 and actin present in the supernatant were analyzed by western blotting.

partially PK-resistant isoform PrP<sup>Sc</sup> partitions into the detergent-insoluble phase (P), while PrP<sup>C</sup> is found in the detergent-soluble fraction (S) (Fig. 1a) (Tatzelt *et al.* 1996; Winklhofer and Tatzelt 2000). Thus, the relative amount of PrP<sup>Sc</sup> and PrP<sup>C</sup> present in cells can be analyzed in parallel. With this approach we identified EGCG, the main polyphenol in green tea, and its stereoisomer GCG as potent drugs to interfere with the formation of PrP<sup>Sc</sup> in ScN2a cells. Caffeine or black tea extracts had no impact on PrP<sup>Sc</sup> formation. The relative amounts of other cellular proteins such as heat-shock protein 70 were not reduced by EGCG or GCG treatment (Fig. 1b, ScN2a). However, the reduction of PrP<sup>Sc</sup> was paralleled by a decrease in PrP<sup>C</sup> present in the soluble (S) fraction. This result indicates that the anti-PrP<sup>Sc</sup> activity of EGCG and GCG is most likely because of a depletion of PrP<sup>C</sup>, the precursor of PrP<sup>Sc</sup>. To test this possibility, we included uninfected N2a cells in our analysis. Indeed, incubation with EGCG and GCG led to a decrease in the level of endogenous PrP<sup>C</sup> (Fig. 1b, N2a).

#### The activity of EGCG and GCG is dependent on three hydroxyl groups of the trihydroxyphenyl side chain

The initial results indicated a lower activity of ECG, a compound closely related to EGCG and GCG (Fig. 1c). To investigate this phenomenon in more detail, we tested the activity of EGCG and ECG in a concentration-dependent manner. While EGCG interfered with PrP<sup>Sc</sup> accumulation efficiently at 50  $\mu$ M, a comparable effect was seen for ECG only at 200  $\mu$ M (Fig. 1d). These findings indicate that the additional hydroxyl group of the trihydroxyphenyl side chain, and possibly its presence at the meta position, increases the activity of EGCG to induce cellular depletion of PrP<sup>C</sup>. In addition, the gallate side chain (Fig. 1c, boxed) is essential. Epicatechin and galocatechin, which both lack the gallate side chain, did not interfere with PrP<sup>Sc</sup> propagation (data not shown), corroborating previous results (Kocisko *et al.* 2003).

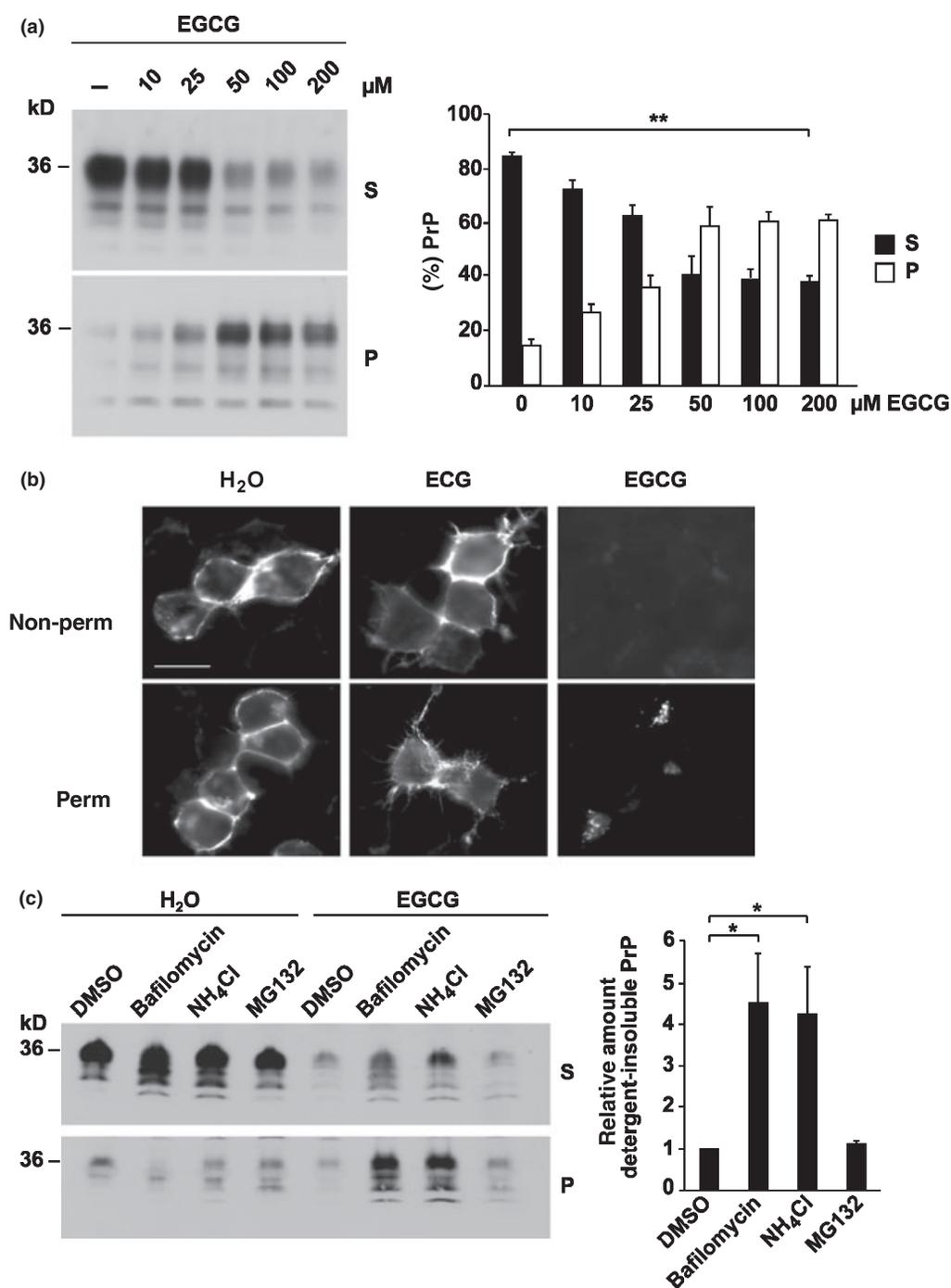
#### EGCG induces a transition of PrP<sup>C</sup> into a detergent-insoluble conformation followed by lysosomal degradation

The apparent decrease in mature PrP<sup>C</sup> indicated that EGCG either interferes with biogenesis of PrP, or induces its degradation. To gain insight into the mechanism, we first analyzed transiently transfected cells over-expressing 3F4-tagged PrP (Gilch *et al.* 2001). Similarly to endogenous PrP<sup>C</sup>, ectopically expressed PrP was depleted from the detergent-soluble fraction upon EGCG treatment. However, the over-expressed PrP now appeared in the detergent-insoluble fraction of EGCG-treated cells (Fig. 2a). Obviously, EGCG induced a conformational transition of PrP into a detergent-insoluble conformation. To identify the cellular localization of the misfolded PrP in EGCG-treated cells, we performed indirect immunofluorescence experiments. In non-permeabilized EGCG-treated cells, PrP was not detectable, indicating that the detergent-insoluble PrP detected in the pellet fraction

by western blotting was present intracellularly. To obtain further experimental evidence, cells were permeabilized prior to antibody incubation; PrP was now found intracellularly in a pattern reminiscent of vesicular staining (Fig. 2b). Based on our previous studies employing different anti-prion compounds, it seemed plausible that intracellular PrP in EGCG-treated cells is present in lysosomal vesicles (Gilch *et al.* 2001; Kiachopoulos *et al.* 2004). We therefore treated untransfected N2a cells with EGCG and the lysosomal inhibitors bafilomycin or NH<sub>4</sub>Cl. Under these conditions, PrP was detectable in the EGCG-treated N2a cells (Fig. 2c, Bafilomycin, NH<sub>4</sub>Cl). A possible explanation for the effect that detergent-insoluble PrP is only detectable in EGCG-treated cells transfected with PrP is that the proteolytic capacity of the lysosomal compartment is overburden by the high over-expression of PrP. Notably, inhibition of the proteasome by MG132 did not stabilize PrP in EGCG-treated cells (Fig. 2c, MG132). These data indicate that EGCG induces a conformational transition of PrP<sup>C</sup> at the plasma membrane followed by internalization and subsequent lysosomal degradation.

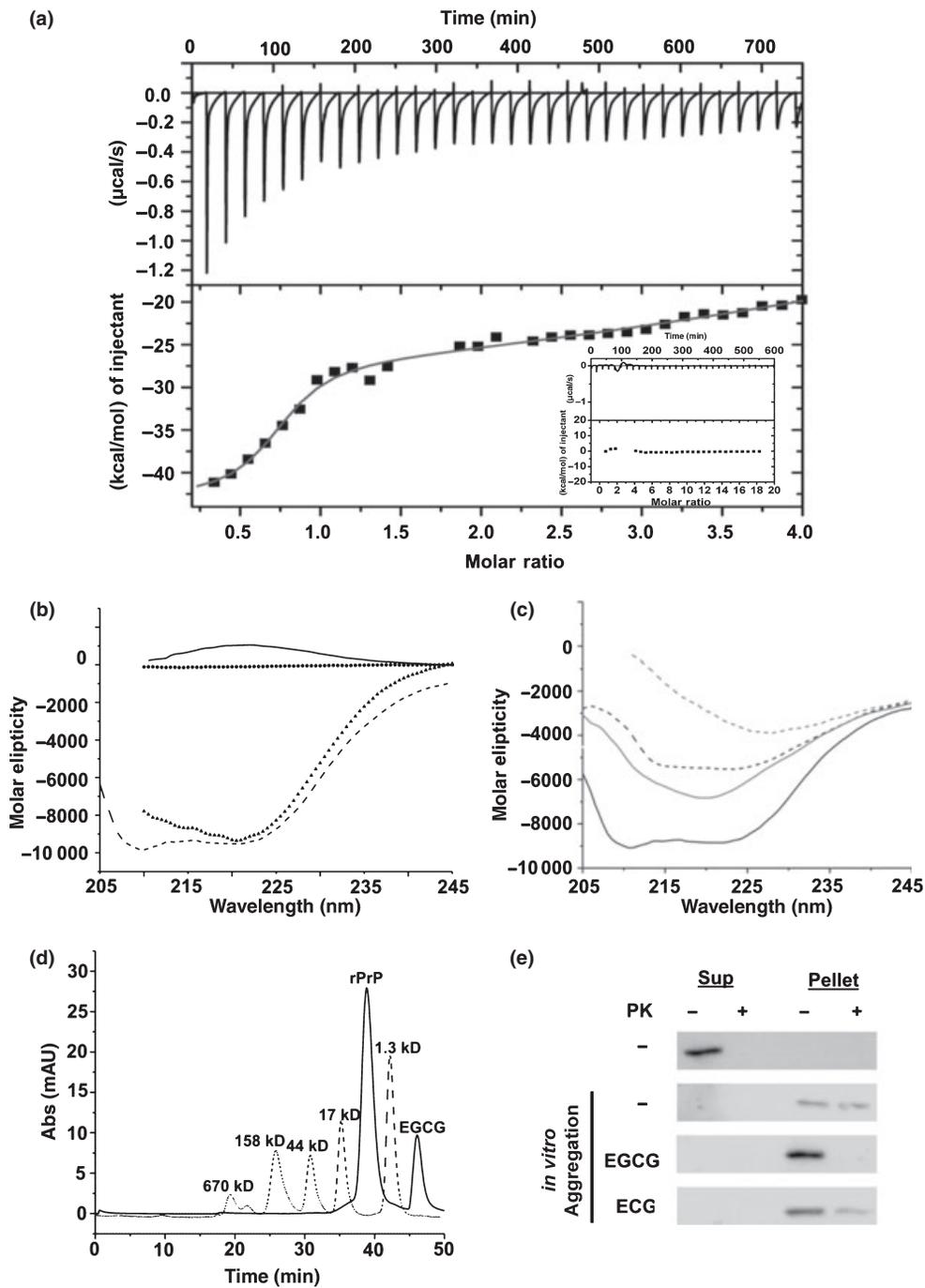
#### EGCG binds to natively folded PrP and induces the formation of random coil structure

To test for a direct interaction of PrP with EGCG, isothermal titration calorimetry experiments were performed using purified PrP (rPrP90–232) expressed in and purified from *E. coli* (Olschewski *et al.* 2007) (Fig. 3a). The long delay of 1400 s between injections was required to achieve full thermodynamic equilibrium of the measured system. Such long equilibration times are characteristic of a binding event associated with concomitantly occurring conformational changes. The binding curve for EGCG to rPrP90–232 can be fitted by assuming a model with two binding sites with different affinities. In the first step one molecule of EGCG binds to one molecule of rPrP with a  $K_D$  of 130 nM and a  $\Delta H$  of  $-43$  kJ (Fig. 3a). The second phase shows a much smaller enthalpy change. The real nature of this biphasic behavior is not clear. It could be either explained by conformational transitions of rPrP triggered by higher concentrations of the inhibitor or by multiple binding sites for EGCG. The analysis of full-length rPrP23–232 did not reveal additional binding sites (see Supporting information). It should be noted that aggregation processes can be excluded. Based on gel filtration analysis only monomeric rPrP90–232 could be detected even at high EGCG concentrations. Enthalpy changes of the latter phase encompass about 1/3 of that of the initial binding event. Contrary to the results obtained for EGCG, no changes in enthalpies for the titration with ECG were observed (Fig 3a, inset). To exclude any interference of heat capacity effects that could prevent the detection of changes in enthalpy, the measurements were also carried out at 25°C and 15°C (data not shown). At all temperatures, no binding of ECG to rPrP90–232 was observed confirming the lack of interaction of ECG with rPrP.



**Fig. 2** EGCG treatment leads to lysosomal degradation of PrP<sup>C</sup>. (a and b) N2a cells were transiently transfected with 3F4-tagged PrP. (a) Cells were treated with increasing concentrations of EGCG and PrP present in the detergent soluble (S) and insoluble (P) fractions was detected by western blotting (left panel) using the mAb 3F4. Quantified data of at least three independent experiments shows the percentage of PrP present in the detergent-soluble (S) and -insoluble (P) fractions (right panel). Plotted is the mean  $\pm$  SEM; \*\* $p < 0.001$ . (b) Cellular localization of PrP after incubation with 100  $\mu\text{M}$  EGCG and ECG for 3 h was visualized by indirect immunofluorescence in permeabilized (perm) and

non-permeabilized (non-perm) cells using the mAb 3F4. Scale bar represents 35  $\mu\text{m}$ . (c) Uninfected N2a cells were grown for 5 days and treated for 16 h with EGCG (100  $\mu\text{M}$ ) or H<sub>2</sub>O (100  $\mu\text{M}$ ) and the inhibitors MG132 (5  $\mu\text{M}$ ), bafilomycin (100 nM), NH<sub>4</sub>Cl (30 mM), or dimethylsulfoxide (DMSO) as control. Endogenous PrP present in the detergent-soluble (S) and -insoluble (P) fractions was detected by western blotting using the anti-PrP pAb A7 (left panel). The relative amount of detergent-insoluble PrP in EGCG-treated cells was quantified from at least three independent experiments (right panel). The amount in DMSO-treated cells was set as 1. Plotted is the mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ .



**Fig. 3** Binding of EGCG to PrP induces unfolding and the formation of PK-sensitive aggregates. (a) ITC curves of rPrP90–232 with GCG and ECG (inset) at 37°C. The concentration in the syringe was 0.5 mM of EGCG and ECG, respectively. The substances were added in 8  $\mu\text{L}$  steps to a 27  $\mu\text{M}$  solution of rPrP. The delay between injections was set to 1400 s to allow full equilibration of the system. (b) Far-UV CD spectra of rPrP90–232 in the absence (dashed line), in presence of 5 eq of EGCG (solid line) or 5 eq ECG (triangles) in 20 mM Tris–HCl, pH 7.5. Far-UV CD spectra of EGCG (135  $\mu\text{M}$ ) in 20 mM Tris–HCl, pH 7.5 (dots). (c) Far-UV CD spectra of rPrP90–232 without EGCG (black line) and after incubation with 5 eq of EGCG for 5 min (red line),

15 min (dashed black line), and 1 h (dashed red line). (d) Analytical size exclusion chromatography of rPrP90–232 after 2 h incubation with 5 molar equivalents of EGCG (solid line). The dashed line shows a molecular weight standard (HMW; Biorad, Hercules, CA, USA). (e) rPrP was incubated in Tris buffer (top panel) or in aggregation buffer (3 M urea and 1 M Gdn-HCl) (*in vitro* aggregation) for 3 days. In parallel samples *in vitro* aggregation was carried out in the presence of EGCG or ECG. The samples were centrifuged and the supernatant (S) and the pellet (P) was treated with PK or left untreated (PK–). Residual PrP was detected by western blotting using the anti-PrP antiserum A7.

The effect of EGCG binding on the secondary structure of rPrP90–232 was analyzed by recording Far-UV CD spectra. Figure 3b displays the CD spectrum of rPrP taken after 2 h incubation in the presence and absence of 5 molar equivalents (eq) EGCG as well as in the presence of 5 eq ECG. In the absence of EGCG the typical CD spectrum of rPrP90–232 showing a mainly  $\alpha$ -helical tertiary structure is observed (Fig. 3b, dashed line) (Nandi *et al.* 2002). However, in the presence of EGCG the recorded CD spectrum displays a curve with a maximum at  $\sim$ 220 nm, which can be interpreted as a random coil structure (Fig. 3b, solid line). The CD spectrum of only EGCG and ECG, respectively did not show a significant signal between 210 and 250 nm at the concentration used here. However, below 210 nm strong absorption of both molecules led to saturation of the detector and prevented measurements in this wavelength range.

To resolve the structural transition in a time-dependent manner CD spectra of rPrP90–232 incubated with EGCG were recorded at different time points. Before addition of EGCG freshly prepared rPrP90–232 (27  $\mu$ M) displays a predominantly  $\alpha$ -helical structure with two characteristic minima at 222 nm and 208 nm identical to published spectra (Fig. 3c). The addition of 5 eq of EGCG leads to an initial increase in  $\beta$ -sheet structures as indicated by the appearance of a minimum at 218 nm after 5 min of incubation. This intermediate undergoes further structural transitions over time, which are characterized by a decrease of the minimum at 218 nm after 15 min and 1 h (Fig. 3c) and the appearance of a maximum at  $\sim$ 220 nm after 2 h (Fig. 3b). These changes can be interpreted as a loss of secondary structure elements. Similar results were observed for rPrP23–232 (Supporting information). Even though a slight change in the CD spectrum of rPrP is also induced by the addition of ECG (Fig. 3b, triangles), a random coil structure is not observed.

The time course of this transition was followed by the change of ellipticity at 222 nm (data not shown). This data indicate that the major conformational change occurs in the first 20 min after addition of EGCG, whereas for ECG almost no changes were observed over time. These observations are in good agreement with the above described measurements after 2 h incubation with EGCG and ECG, respectively. Aggregation and/or oligomerization of rPrP had not occurred at this stage as proven by size exclusion chromatography (Fig. 3d). In this experiment rPrP90–232, which had been incubated for 2 h with EGCG was analyzed by analytical gel filtration using a Sephadex S-200 (Amersham Biosciences, Piscataway, NY, USA) column. The resulting chromatogram clearly showed that EGCG-treated rPrP90–232 remained monomeric with an apparent molecular weight of  $\sim$ 14 kDa (Fig. 3d).

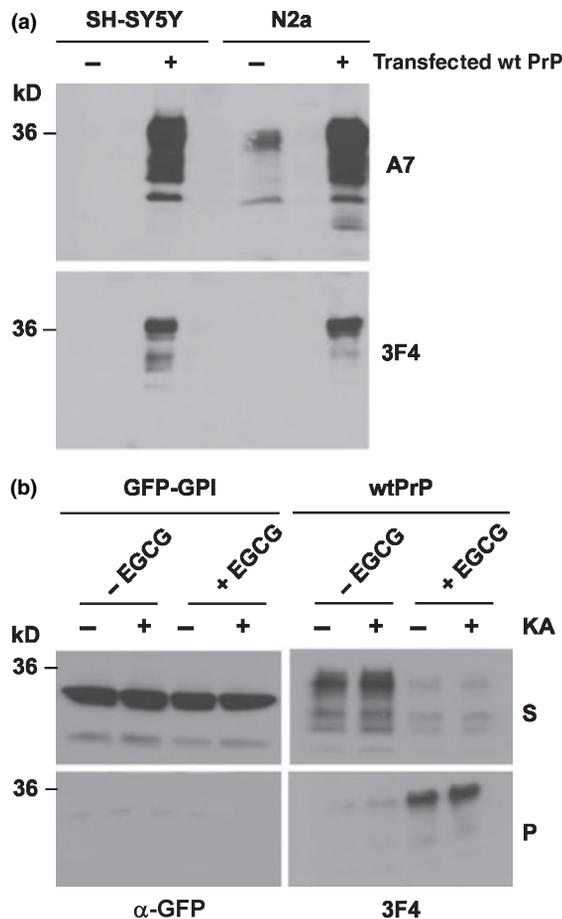
### EGCG interferes with the formation of proteinase K-resistant aggregates

The influence of EGCG and ECG on the *in vitro* aggregation of rPrP was tested with a PK resistance assay. The *in vitro*

aggregation of rPrP90–232 was accelerated by transferring the protein into a buffer containing 3 M urea, 1 M Gdn-HCl, 150 mM NaCl, and 20 mM NaPi at pH 6.8 (Bocharova *et al.* 2005) and was followed by testing the sensitivity of rPrP to PK. To determine the effect of EGCG and ECG on the formation of PK-resistant aggregates 5 eq of each compound were added. All samples were incubated under constant shaking at 600 rpm at 37°C for 3 days. (Fig. 3e). After 3 days all samples were centrifuged and separated into supernatant (S) and pellet (P). PK was added to all fractions for 1 h and the digestion was quenched by addition of 2 mM PMSF prior to western blot analysis (Fig. 3e). With the exception of untreated rPrP (Fig. 3e, top panel), which did not precipitate, in all other samples rPrP90–232 was solely found in the pellet. However, the resistance of these aggregates against a limited proteolytic digestion differed depending on the presence or absence of EGCG. Untreated rPrP90–232 was almost quantitatively converted into PK-resistant material by this procedure (Fig. 3e, second panel). In contrast, the rPrP90–232 aggregates formed in the presence of 5 eq of EGCG were not PK-resistant (Fig. 3e, third panel). The effect of ECG on the formation of PK-sensitive rPrP90–232 aggregates was not as pronounced as for EGCG, even though a reduction in the amount of PK-resistant aggregates could also be observed (Fig. 3e, fourth panel). These results suggest structural differences of rPrP90–232 aggregates formed *in vitro* in the absence or presence of EGCG. Indeed, preliminary results indicate that EGCG interferes with the formation of ordered fibrils; instead amorphous aggregates are formed (data not shown).

### EGCG decreases the stress-protective activity of PrP<sup>C</sup>

Studies in cultured cells, mice and rats revealed that PrP<sup>C</sup> expression confers increased viability to neuronal cells under stress conditions (reviewed in Westergard *et al.* 2007). To monitor the protective activity of PrP<sup>C</sup>, we exposed human neuroblastoma SH-SY5Y cells to the excitotoxin kainate, an established inducer of apoptosis. SH-SY5Y cells have been previously used to monitor apoptotic cell death (Rambold *et al.* 2006, 2008) and express extremely low levels of endogenous PrP<sup>C</sup>. This phenomenon is illustrated in Fig. 4a. First, we established that kainate does not interfere with the EGCG-induced conformational transition of PrP into a detergent-insoluble conformation. As expected, detergent-soluble PrP<sup>C</sup> was depleted from the EGCG-treated cells, instead PrP was now found in the detergent-insoluble fraction. Note that GPI-anchored green fluorescent protein (GFP) (GFP-GPI) remained in the detergent-soluble phase (Fig. 4b). To monitor apoptosis transiently transfected SH-SY5Y cells expressing either wt PrP or GPI-anchored GFP were exposed to kainate for 4 h and apoptotic cell death was analyzed by indirect immunofluorescence using an anti-active caspase 3 antibody (Fig. 5b). Indeed, expression of wt PrP significantly decreased apoptotic cell death induced by



**Fig. 4** (a) SH-SY5Y cells express low levels of endogenous PrP<sup>C</sup>. Post-nuclear supernatants of untransfected or wt PrP transfected SH-SY5Y and N2a cells were analyzed by western blotting using the mAb 3F4 or the pAb A7. A7 detects both endogenous mouse PrP and transfected 3F4-tagged PrP, while mAb 3F4 does not recognize endogenous mouse PrP in untransfected N2a cells. Because of low expression levels the 3F4 or the A7 antibody could not detect endogenous PrP<sup>C</sup> in SH-SY5Y cells. (b) Kainic acid does not interfere with the formation of detergent-insoluble PrP in EGCG-treated cells. SH-SY5Y cells were transiently co-transfected with EYFP and GFP-GPI or wt PrP. 24 h after transfection cells were pre-incubated with EGCG (50 μM, +EGCG) or water (-EGCG) for 1 h prior to exposure to kainic acid (500 μM, 4 h). Cells were lysed in detergent-buffer and GFP-GPI and PrP present in the detergent-soluble (S) and insoluble (P) fraction were analyzed by western blotting.

kainate (Fig. 5a, kainic acid). However, the protective effect of PrP<sup>C</sup> over-expression against kainate-induced apoptosis was significantly reduced in cells exposed to EGCG: over-expressing PrP<sup>C</sup> cells, pre-treated with EGCG, were as sensitive to kainate as transfected cells expressing GFP-GPI (Fig. 5a, kainic acid + EGCG).

To test whether down-regulation of endogenous PrP<sup>C</sup> increases susceptibility to stress we turned to N2a cells, which express high levels of PrP<sup>C</sup>. It has been reported that

PrP<sup>C</sup> protects primary neurons and N2a cells against copper-induced toxicity (Brown *et al.* 1998; Vassallo *et al.* 2005). Thus, we employed copper-induced toxicity as a stress paradigm to monitor if N2a cells exposed to EGCG are more sensitive to stress. Cultivation in the presence of CuSO<sub>4</sub> (500 μM) for 5 h had no adverse effect on the viability of N2a cells (Fig. 5c, left panel, CuSO<sub>4</sub>). However, pre-treatment with EGCG led to a depletion of endogenous PrP<sup>C</sup> (Fig. 5c, right panel) and sensitized N2a cells to copper-induced apoptosis (Fig. 5c, left panel, EGCG + CuSO<sub>4</sub>).

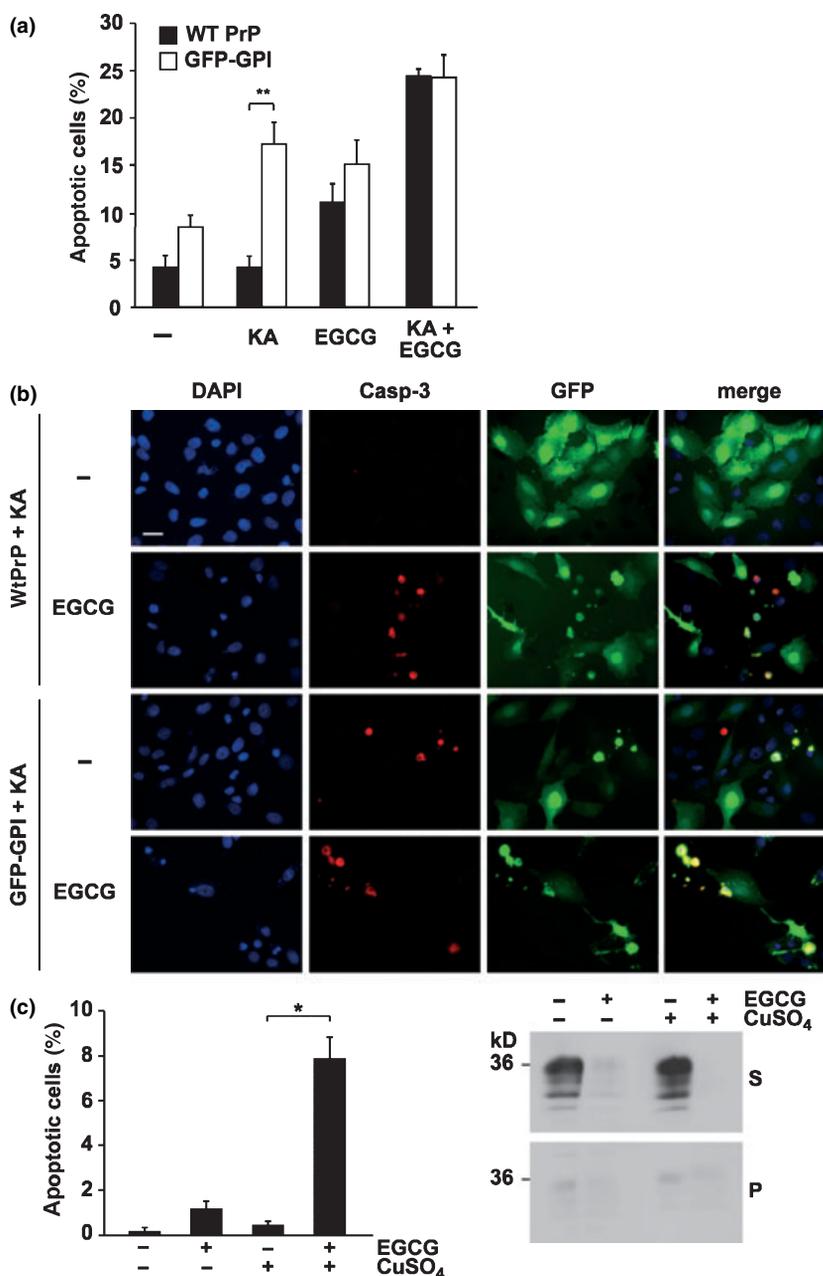
## Discussion

In this study, we show that the major polyphenols of green tea, EGCG and GCG, interfere with cell surface expression of mature PrP<sup>C</sup> by converting natively folded PrP<sup>C</sup> into detergent-insoluble conformers, which are rapidly degraded intracellularly. As a consequence, cells are protected against PrP<sup>Sc</sup> propagation; however, they are more vulnerable to stress-induced apoptosis.

### PrP<sup>C</sup> as a target to interfere with the formation of PrP<sup>Sc</sup>

The most potent way to prevent prion diseases is to ablate PrP<sup>C</sup> (Büeler *et al.* 1993). Our study indicated that the anti-PrP<sup>Sc</sup> activity of EGCG and GCG is based on a similar mechanism. In ScN2a as well as in uninfected N2a cells, the relative amount of mature PrP<sup>C</sup> was observably reduced after incubation with EGCG. The effect occurred fast, 16 h after onset of treatment mature PrP<sup>C</sup> was hardly detectable by western blotting (Fig. 1b). On the other hand, the effect was only transient. As soon as EGCG was omitted from the cell culture medium, mature PrP<sup>C</sup> re-populated the plasma membrane (data not shown). Based on our results with PrP<sup>C</sup>-over-expressing cells and with inhibitors of lysosomal or proteasomal degradation, we would like to propose a model in which EGCG and GCG induce a conformational transition of mature, natively folded PrP<sup>C</sup> into detergent-insoluble conformers, which are rapidly degraded in lysosomal compartments (Fig. 2b and c). This observation further supports the notion that a conformational change of cell surface PrP<sup>C</sup> can result in rapid internalization (Pauly and Harris 1998; Gilch *et al.* 2001; Quaglio *et al.* 2001; Sumudhu *et al.* 2001; Kiachopoulos *et al.* 2004). EGCG-treated cells are depleted from mature PrP<sup>C</sup>, consequently, the precursor for the formation of PrP<sup>Sc</sup> is missing and propagation of PrP<sup>Sc</sup> ceases.

*In vitro* experiments with purified components support our model. We could show that EGCG directly binds to recombinantly expressed and refolded PrP (rPrP). Binding of EGCG destabilized the natively folded rPrP and promoted the formation of random coil structure. The random coil conformers formed in the presence of EGCG were initially monomeric and in a second step formed PK-sensitive aggregates.



**Fig. 5** EGCG interferes with the stress-protective activity of PrP<sup>C</sup>. (a and b) SH-SY5Y cells were transiently co-transfected with EYFP and GFP-GPI or wt PrP; 24 h after transfection cells were pre-incubated with EGCG (10 μM, +EGCG) or water (-EGCG) for 2 h prior to exposure to kainic acid (KA, 500 μM, 3 h). Induction of apoptosis was visualized by indirect immunofluorescence using an anti-active caspase 3 antibody (b) (scale bar represents 50 μm) and the percentage of apoptotic cells was quantified (a). (c) N2a cells were grown for 3 days and treated with EGCG (100 μM for 2 days) or EGCG (100 μM for 2 days) and CuSO<sub>4</sub> (500 μM for 5 h). Apoptosis was analyzed as described in (a). Endogenous PrP was visualized by western blot using the pAb A7 (right panel). Data represent at least three independent experiments. Shown is the mean ± SEM; \**p* < 0.01; \*\**p* < 0.001.

Further studies are now aimed at identifying the domain(s) of PrP that interact with EGCG. Obviously, the unstructured N-terminal domain of PrP is dispensable, because the rPrP used in our study lacks amino acid 23–90. To test for a possible therapeutic value of EGCG, bioassays in scrapie-infected mice or hamsters have to be performed. Fortunately, the low toxicity of EGCG will allow prolonged treatment at relatively high concentrations. In addition, the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of EGCG are promising, in particular as it has been shown to cross the blood–brain barrier (Chow *et al.* 2003; Lin *et al.* 2007). Furthermore, a protective activity of EGCG for other protein misfolding disorders has been demonstrated in animal

models of Alzheimer's and Huntington's disease (Rezai-Zadeh *et al.* 2005; Ehrnhoefer *et al.* 2006).

#### Loss of mature PrP<sup>C</sup> is accompanied by enhanced vulnerability to stress

Based on its inhibitory effect on PrP<sup>Sc</sup> propagation, EGCG seems to be a molecule with beneficial activities. However, our studies also revealed that the effect of EGCG on the conformation of PrP<sup>C</sup> could have adverse effects. This became apparent when we analyzed the viability of cells exposed to stress. Several studies in transgenic mice and cell culture models indicated that PrP<sup>C</sup> protects cells from stress-induced apoptosis (reviewed in Flechsig and Weissmann 2004;

Roucou and LeBlanc 2005; Westergard *et al.* 2007). Using kainate- and copper-induced apoptosis as a stress paradigm, we corroborated these findings and showed that expression of wt PrP<sup>C</sup> decreased apoptotic cell death of SH-SY5Y cells exposed to kainate. This protective effect of PrP<sup>C</sup> expression was significantly reduced by pre-treatment with EGCG, indicating that the detergent-insoluble conformers of PrP found in EGCG-treated cells lack this physiological activity of mature PrP<sup>C</sup>. Similarly, down-regulation of endogenous wt PrP<sup>C</sup> increased cell death of EGCG-treated N2a cells exposed to copper. It will now be interesting to see if the internalization of detergent-insoluble PrP conformers, similarly to those induced by suramin, copper or EGCG, might be implicated in the regulation of the physiological function of PrP<sup>C</sup>.

## Acknowledgements

We thank Veronika Müller for experimental assistance. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 596), from the Bayerische Staatsminister für Wissenschaft, Forschung und Kunst (for Prion, MPI3), the Bundesministerium für Bildung und Forschung (01KO0110, BioDisc, DIP), NeuroPrion and the Max Planck Society.

## Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

**Fig. S1** Binding of EGCG to full-length rPrP.

**Appendix S1** Binding of EGCG to full-length rPrP.

Please note: Blackwell Publishing are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

## References

- Baumann F., Tolnay M., Brabeck C. *et al.* (2007) Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *EMBO J.* **26**, 538–547.
- Bocharova O. V., Breydo L., Parfenov A. S., Salnikov V. V. and Baskakov I. V. (2005) *In vitro* conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP(Sc). *J. Mol. Biol.* **346**, 645–659.
- Borchelt D. R., Taraboulos A. and Prusiner S. B. (1992) Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* **267**, 16188–16199.
- Brandner S., Isenmann S., Raeber A., Fischer M., Sailer A., Kobayashi Y., Marino S., Weissmann C. and Aguzzi A. (1996) Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* **379**, 339–343.
- Brown D. R., Schmidt B. and Kretschmar H. A. (1998) Effects of copper on survival of prion protein knockout neurons and glia. *J. Neurochem.* **70**, 1686–1693.
- Büeler H., Aguzzi A., Sailer A., Greiner R.-A., Autenried P., Aguet M. and Weissmann C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**, 1339–1347.
- Butler D. A., Scott M. R. D., Bockman J. M., Borchelt D. R., Taraboulos A., Hsiao K. K., Kingsbury D. T. and Prusiner S. B. (1988) Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J. Virol.* **62**, 1558–1564.
- Caughey B. and Raymond G. J. (1991) The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem.* **266**, 18217–18223.
- Caughey B., Raymond G. J., Ernst D. and Race R. E. (1991) N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J. Virol.* **65**, 6597–6603.
- Chesebro B. (2003) Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. *Br. Med. Bull.* **66**, 1–20.
- Chesebro B., Trifilo M., Race R. *et al.* (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* **308**, 1435–1439.
- Chow H. H., Cai Y., Hakim I. A., Crowell J. A., Shahi F., Brooks C. A., Dorr R. T., Hara Y. and Alberts D. S. (2003) Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenol E in healthy individuals. *Clin. Cancer Res.* **9**, 3312–3319.
- Collinge J. (2001) Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 519–550.
- Dressel J. and Oesper R. E. (1961) The discovery of Germanin by Oskar Dressel and Richard Kothe. *J. Chem. Educ.* **38**, 620–621.
- Ehrnhoefer D. E., Duenwald M., Markovic P. *et al.* (2006) Green tea (–)epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington's disease models. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2743–2751.
- Flechsigg E. and Weissmann C. (2004) The role of PrP in health and disease. *Curr. Mol. Med.* **4**, 337–353.
- Gilch S., Winklhofer K. F., Nunziante M. *et al.* (2001) Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP<sup>Sc</sup> and delays onset of prion diseases. *EMBO J.* **20**, 3957–3966.
- Hunter P. (2006) Shedding a negative image. Research into their mechanism of infectivity reveals that prions might have important biological roles. *EMBO Rep.* **7**, 1196–1198.
- Kacsak R. J., Rubenstein R., Merz P. A., Tonna-DeMasi M., Fersko R., Carp R. I., Wisniewski H. M. and Dinger H. (1987) Mouse monoclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J. Virol.* **61**, 3688–3693.
- Kiachopoulos S., Heske J., Tatzelt J. and Winklhofer K. F. (2004) Misfolding of the prion protein at the plasma membrane induces endocytosis, intracellular retention and degradation. *Traffic* **5**, 426–436.
- Kocisko D. A., Baron G. S., Rubenstein R., Chen J., Kuizon S. and Caughey B. (2003) New inhibitors of scrapie-associated prion protein formation in a library of 2000 drugs and natural products. *J. Virol.* **77**, 10288–10294.
- Ladogana A., Casaccia P., Ingrassio L., Cibati M., Salvatore M., Xi Y.-G., Masullo C. and Pocchiari M. (1992) Sulphate polyanions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters. *J. Gen. Virol.* **73**, 661–665.
- Li A., Christensen H. M., Stewart L. R., Roth K. A., Chiesa R. and Harris D. A. (2007) Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105–125. *EMBO J.* **26**, 548–558.
- Lin L. C., Wang M. N., Tseng T. Y., Sung J. S. and Tsai T. H. (2007) Pharmacokinetics of (–)epigallocatechin-3-gallate in conscious and freely moving rats and its brain regional distribution. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 1517–1524.
- Mallucci G., Dickinson A., Linehan J., Klohn P. C., Brandner S. and Collinge J. (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* **302**, 871–874.

- Marella M., Lehmann S., Grassi J. and Chabry J. (2002) Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *J. Biol. Chem.* **277**, 25457–25464.
- McLennan N. F., Brennan P. M., McNeill A. *et al.* (2004) Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *Am. J. Pathol.* **165**, 227–235.
- Mitteregger G., Vosko M., Krebs B., Xiang W., Kohlmansperger V., Nolting S., Hamann G. F. and Kretzschmar H. A. (2007) The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein. *Brain Pathol. (Zurich, Switzerland)* **17**, 174–183.
- Nandi P. K., Leclerc E. and Marc D. (2002) Unusual property of prion protein unfolding in neutral salt solution. *Biochemistry* **41**, 11017–11024.
- Nunziante M., Gilch S. and Schätzl H. (2003) Essential role of the prion protein N terminus in subcellular trafficking and half-life of cellular prion protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 3726–3734.
- Olschewski D., Seidel R., Miesbauer M., Rambold A. S., Oesterheld D., Winklhofer K. F., Tatzelt J., Engelhard M. and Becker C. F. W. (2007) Semisynthetic murine Prion protein equipped with a GPI anchor mimic incorporates into cellular membranes. *Chem. Biol.* **14**, 994–1006.
- Pauly P. C. and Harris D. A. (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 33107–33110.
- Peters P. J., Mironov A. J., Peretz D. *et al.* (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J. Cell Biol.* **162**, 703–717.
- Porat Y., Abramowitz A. and Gazit E. (2006) Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem. Biol. Drug Design* **67**, 27–37.
- Prusiner S. B., Scott M. R., DeArmond S. J. and Cohen F. E. (1998) Prion protein biology. *Cell* **93**, 337–348.
- Quaglio E., Chiesa R. and Harris D. A. (2001) Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform. *J. Biol. Chem.* **276**, 11432–11438.
- Rambold A. S., Miesbauer M., Rapaport D., Bartke T., Baier M., Winklhofer K. F. and Tatzelt J. (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., Müller V., Ron U., Ben-Tal N., Winklhofer K. F. and Tatzelt J. (2008) Stress-protective activity of prion protein is corrupted by scrapie-prions. *EMBO J.* **27**, 1974–1984.
- Rezai-Zadeh K., Shytle D., Sun N. *et al.* (2005) Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice. *J. Neurosci.* **25**, 8807–8814.
- Roucou X. and LeBlanc A. C. (2005) Cellular prion protein neuroprotective function: implications in prion diseases. *J. Mol. Med. (Berlin, Germany)* **83**, 3–11.
- Shmerling D., Hegyi I., Fischer M. *et al.* (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* **93**, 203–214.
- Shyng S. L., Huber M. T. and Harris D. A. (1993) A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 15922–15928.
- Shyng S. L., Heuser J. E. and Harris D. A. (1994) A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J. Cell Biol.* **125**, 1239–1250.
- Shyng S. L., Moulder K. L., Lesko A. and Harris D. A. (1995) The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* **270**, 14793–14800.
- Shyu W. C., Lin S. Z., Chiang M. F., Ding D. C., Li K. W., Chen S. F., Yang H. I. and Li H. (2005) Overexpression of PrP<sup>C</sup> by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model. *J. Neurosci.* **25**, 8967–8977.
- Spudich A., Frigg R., Kilic E., Kilic U., Oesch B., Raeber A., Bassetti C. L. and Hermann D. M. (2005) Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1. *Neurobiol. Dis.* **20**, 442–449.
- Sumudhu W., Perera S. and Hooper N. M. (2001) Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr. Biol.* **11**, 519–523.
- Sunyach C., Jen A., Deng J., Fitzgerald K. T., Frobert Y., Grassi J., McCaffrey M. W. and Morris R. (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J.* **22**, 3591–3601.
- Tatzelt J., Prusiner S. B. and Welch W. J. (1996) Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J.* **15**, 6363–6373.
- Vassallo N., Herms J., Behrens C., Krebs B., Saeki K., Onodera T., Windl O. and Kretzschmar H. A. (2005) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by cellular prion protein and its role in cell survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 75–82.
- Weise J., Sandau R., Schwarting S., Crome O., Wrede A., Schulz-Schaeffer W., Zerr I. and Bahr M. (2006) Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* **37**, 1296–1300.
- Weissmann C., Fischer M., Raeber A., Büeler H., Sailer A., Shmerling D., Rüllicke T., Brandner S. and Aguzzi A. (1996) The role of PrP in pathogenesis of experimental scrapie. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **61**, 511–522.
- Westergard L., Christensen H. M. and Harris D. A. (2007) The cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>): its physiological function and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1772**, 629–644.
- Winklhofer K. F. and Tatzelt J. (2000) Cationic lipopolyamines induce degradation of PrP<sup>Sc</sup> in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *Biol. Chem.* **381**, 463–469.
- Winklhofer K. F., Heller U., Reintjes A. and Tatzelt J. (2003) Inhibition of complex glycosylation increases formation of PrP<sup>Sc</sup>. *Traffic* **4**, 313–322.
- Winklhofer K. F., Tatzelt J. and Haass C. (2008) The two faces of protein misfolding: gain and loss of function in neurodegenerative diseases. *EMBO J.* **27**, 336–349.