

Aus dem Institut für Neuropathologie und Prionenforschung der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Hans Kretzschmar

**Identifizierung potentieller molekularer Mechanismen der
neuroprotektiven Wirkung des Prionproteins im murinen
Ischämiemodell**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Svenja Nölting

aus

München

Jahr

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hans A. Kretzschmar

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Nils Peters
Prof. Dr. rer. nat. Jörg Tatzelt

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Bjarne Krebs

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2009

Inhaltsverzeichnis:

A. Einleitung.....	6
1. Die Geschichte und Entdeckung des Prionproteins.....	6
2. Das Prionprotein	9
2.1. Das Prionprotein-Gen: Prnp	9
2.2. Synthese des Prionproteins	10
2.3. Struktur des Prionproteins	12
2.4. Zelluläre Lokalisation des Prionproteins	15
2.5. Endocytose des Prionproteins.....	16
2.6. Spaltung des Prionproteins	16
2.7. Das pathogene PrP ^{Sc} im Vergleich zum physiologischen PrP ^C	18
2.8. Mechanismus der Infektiosität.....	19
3. Die Funktion des Prionproteins	20
3.1. Prnp -Knockout-Mäuse	20
3.2. Einfluss auf synaptische Erregungsübertragung und Calciumhomöostase durch das Prionprotein.....	21
3.3. Das Prionprotein und Neuroprotektion	23
3.3.1. Das Prionprotein und oxidativer Stress.....	23
3.3.2. Das Prionprotein und Bax-induzierte Apoptose	24
3.3.3. Der N-Terminus des Prionproteins und Neuroprotektion	28
3.3.4. Zellproliferationsfördernde und neuroprotektive Signalwege, die möglicherweise durch das Prionprotein beeinflusst werden	28
3.3.4.1. Potentielle Interaktionspartner des Prionproteins.....	28
3.3.4.2. Laminin und Lamininrezeptor.....	29
3.3.4.3. Antikörper-vermittelte Quervernetzung des Prionproteins, Clustering, Caveolin-1, Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn, ERK1/2 und N-CAM	30
3.3.4.4. STI-1, c-AMP/Proteinkinase A, PI3-Kinase/Akt	32
3.3.4. Zellproliferationsfördernde und neuroprotektive Signalwege, die möglicherweise durch das Prionprotein beeinflusst werden	28
4. Zielsetzung	34
B. Material und Methodik.....	35
1. Mäuse	35
1.1. Tierzucht.....	35
1.2. Tierhaltung	35
1.3. Murines Infarktmodell	35
1.4. Verwendete Tiere	36
1.4.1. Histologie.....	36
1.4.2. Protein-Microarrays und Westernblots	37
2. Histologische Methoden.....	37
2.1. Material	37
2.2. Methodik	37
2.2.1. Anfertigung von Kryoschnitten	37
2.2.2. Fixierung und Rehydrierung von Kryoschnitten.....	38
2.2.3. Nissl-Färbung	38
2.2.4. PrP ^C -Färbung	39
2.2.5. β-Aktin-Färbung	40
2.2.6. Aufnahme mikroskopischer Bilder und Auswertung.....	40
2.2.7. Volumetrie	41
3. Antikörper(Protein)-Microarrays	41
3.1. Material	41
3.1.1. Komponenten des Kits.....	41
3.1.2. Antikörper auf einem Microarray	42
3.2. Methodik	46
3.2.1. Prinzip.....	46
3.2.2. Probenaufbereitung und Proteinextraktion	48
3.2.3. Proteinkonzentrationsbestimmung: Bradford Protein Messung.....	49

3.2.4. Prozessierung des Arrays	51
3.2.5. Antikörperposition auf dem Microarray	53
3.2.6. Auswertung.....	53
4. Westernblot	54
4.1. Material	54
4.2. Methodik	54
4.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
4.2.2. Herstellung von Polyacrylamid-Gelen	55
4.2.3. Probenaufbereitung und Elektrophorese	56
4.2.4. Immunoblot (Westernblot).....	57
4.2.5. Auswertung.....	58
C. Ergebnisse	59
1. Histologie	59
1.1. Größe des Infarkts in Prnp ^{+/+} - und Prnp ^{-/-} -Mäusen	59
1.2. Regionales Verteilungsmuster des Infarkts in Prnp ^{+/+} - und Prnp ^{-/-} -Mäusen	61
2. Protein-Microarrays	64
2.1. Signalwege aus dem Bereich der Apoptose.....	66
2.1.1. Caspasen	66
2.1.2. Weitere pro-apoptotische Proteine.....	77
2.1.2.1. SMAC/Diablo	78
2.1.2.2. ARTS	79
2.1.2.3. PAR4 (Prostate Apoptosis Response 4)	80
2.1.2.4. Apoptosis Inducing Factor (AIF)	81
2.1.2.6. p53 (siehe C. Ergebnisse, 3.2.4. Proteine, die sowohl antiproliferativ als auch pro-apoptotisch wirken: p53).....	82
2.1.3. Anti-apoptotische Proteine.....	82
2.1.3.1. Bcl-x und Bcl-x _L	83
2.1.3.2. DAPK (Klon DAPK 55)	85
2.1.3.3. Cystatin A	86
2.1.4. Proteine mit pro- und anti-apoptotischer Wirkung	87
2.1.4.1. DAXX	88
2.1.4.2. Bcl-10.....	89
2.2. Zellzyklus-assoziierte Proteine	90
2.2.1. Zellproliferative Proteine	90
2.2.2. Antiproliferative Proteine	97
2.2.3. Proteine, die sowohl proliferativ als auch antiproliferativ wirken: C-Abl	102
2.2.4. Proteine, die antiproliferativ und pro-apoptotisch wirken: p53	103
2.3. Spezielle Proteine der neuronalen Signaltransduktion.....	105
2.3.1. NMDAR 2A.....	105
2.3.2. Glutaminsäuredecarboxylase	106
2.3.3. α1-Syntrophin.....	107
2.3.4. Synuclein-α	109
2.4. Proteine des Zytoskeletts	110
2.4.1. α-Tubulin.....	110
2.4.2. MAP1 und MAP1b	111
2.4.3. OP18/Stathmin.....	113
2.4.4. Neurofilament 200	114
2.4.5. P120CTN	115
2.4.6. Connexin 32.....	116
2.5. Proteine der Signaltransduktion.....	117
2.5.1. Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin	117
2.5.2. PKC	120
2.5.3. ERK1/2	123
2.5.4. NF-κB und IκB	126
2.5.5. Östrogenrezeptor.....	128
2.5.6. PKB/Akt	129
2.5.7. JNK	133
2.5.8. Proteinphosphatasen	136

3. Westernblots	139
3.1. Bcl-x	139
3.2. NMDAR 2A	141
D. Diskussion	143
1. Diskussion der Methodik	143
2. Histologie: Größe und Verteilungsmuster des Infarkts in Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäusen ...	147
3. Protein-Microarrays	148
3.1. Signalwege aus dem Bereich der Apoptose.....	148
3.1.1. Pro-apoptotische Proteine	151
3.1.2. Anti-apoptotische Proteine.....	153
3.1.3. Interpretation und Ausblick: Apoptose-assoziierte Proteine.....	156
3.2. Zellzyklus-assoziierte Proteine	158
3.2.1. Zellproliferationsfördernde Proteine.....	158
3.2.2. Antiproliferative Proteine	159
3.2.3. Proteine, die sowohl proliferativ als auch antiproliferativ wirken: C-Abl	159
3.2.4. Proteine, die sowohl antiproliferativ als auch pro-apoptotisch wirken: p53	160
3.3. Spezielle Proteine der neuronalen Signaltransduktion.....	160
3.3.1. NMDA-Rezeptor	160
3.3.2. α 1-Syntrophin.....	165
3.3.3. Synuclein- α	165
3.4. Proteine des Zytoskeletts	165
3.4.1. Mikrotubulidynamik-assoziierte Proteine	166
3.4.2. Neurofilament 200	166
3.4.3. Connexin 32.....	166
3.5. Proteine der Signaltransduktion.....	167
3.5.1. Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin	167
3.5.2. PKC β/γ	167
3.5.3. ERK1/2	168
3.5.4. NF- κ B und I κ B.....	169
3.5.5. Östrogenrezeptor.....	169
3.5.6. PKB/Akt	170
3.5.7. JNK.....	171
3.5.8. Proteinphosphatasen	171
3.6. Interpretation und Schlussfolgerung.....	172
E. Zusammenfassung	176
F. Referenzen	178
G. Anhang	203
1. Verwendete Materialien und Lösungen	203
1.1. Histologie: Lösungen.....	203
1.2. Protein-Microarrays.....	203
1.2.1. Lösungen.....	203
1.2.2. Antikörperposition auf dem Microarray	204
1.3. Westernblot.....	205
1.3.1. Lösungen.....	205
1.3.2. Trenn- und Sammelgel: Zusammensetzung.....	206
2. Schneideprotokoll Maushirn für histologische Untersuchungen	207
3. Vollständig normierte Werte aller im Microarray untersuchten Proteine	211
3.1. Prnp ^{+/+} -Shammäuse	211
3.2. Prnp ^{-/-} -Shammäuse.....	213
3.3. Prnp ^{+/+} -Ischämiemäuse	216
3.4. Prnp ^{-/-} -Ischämiemäuse	219
3. Abkürzungsverzeichnis	222

4. Danksagung	225
5. Lebenslauf.....	226
7. Ehrenwörtliche Erklärung.....	228

A. Einleitung

Überblick

Das Prionprotein ist ein in der Evolution hoch konserviertes zellmembranständiges Glycoprotein, welches durch das Prionprotein-Gen (Prnp) kodiert wird.

Es findet sich bei Säugetieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen in fast jedem Entwicklungsstadium und fast jedem Zelltyp (Bendheim et al., 1992; Gabriel et al., 1992; Schatzl et al., 1995; Simonic et al., 2000; Suzuki et al., 2002; Windl et al., 1995; Strumbo et al., 2001). Am stärksten wird es im Bereich neuronaler Synapsen im Zentralnervensystem sowie im Lymphgewebe exprimiert (Cashman et al., 1990; Herms et al., 1999; Kretzschmar et al., 1986). Seine physiologische Funktion ist noch nicht vollständig geklärt. Seine Entdeckung und seinen Namen („**proteinacious infectious agent**“) verdankt das Prionprotein seiner pathogenen Isoform, die als Erreger der spongiformen Enzephalopathien gilt. Für das Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge der Prionerkrankungen und der Bedeutung des ubiquitär vorkommenden physiologischen Prionproteins ist die Erforschung seiner Funktion von großem Stellenwert. Es gibt Anhalt für eine neuroprotektive Wirkung des physiologischen Prionproteins, mit der sich diese Arbeit näher befassen wird.

1. Die Geschichte und Entdeckung des Prionproteins

Die Geschichte des Prionproteins ist untrennbar mit den Prionerkrankungen verbunden: Das Prionprotein wurde auf der Suche nach dem Krankheitserreger der Spongiformen Enzephalopathien entdeckt.

Zu den Spongiformen Enzephalopathien (synonym: Prionerkrankungen; engl.: Transmissible Spongiform Encephalopathies; TSEs) zählt man eine Gruppe von chronisch progredient verlaufenden und stets tödlich endenden neurodegenerativen Erkrankungen des Zentralnervensystems, die bei einer Vielzahl verschiedener Spezies beschrieben worden sind. Bei Tieren wie Rindern und Schafen besteht die Leitsymptomatik in Gangataxie und Koordinationsstörungen (Wells et al., 1987). Beim Menschen manifestieren sich die TSEs vorrangig als rasch progressive Demenzen, seltener in Form von zerebellärer Ataxie.

Prionerkrankungen können sporadisch auftreten sowie hereditärer oder infektiöser Genese sein (Kretzschmar and Feiden, 2002).

Neuropathologisch kennzeichnend für die spongiformen Enzephalopathien sind eine löchrige, schwammartige Auflockerung des Hirngewebes durch Vakuolisierung des Neuropils (spongiforme Degeneration), Verlust der Neurone, Demyelinisierung sowie eine reaktive

Gliazellvermehrung der Astrozyten (astrozytäre Gliose) (Kretzschmar and Feiden, 2002; Hafiz and Brown, 2000; Jeffrey et al., 2000).

Die Erstbeschreibung eines durch Prionen verursachten Krankheitsbildes geht auf das Jahr 1732 zurück (McGowan, 1922). Hierbei handelte es sich um die primär bei Schafen und Ziegen aufgetretene Traberkrankheit Scrapie. Weitere Prionerkrankungen bei Tieren sind die übertragbare Enzephalopathie des Nerzes („Transmissible Mink-Encephalopathy“, TME) (Hartsough and Burger, 1965), die chronisch zehrende Erkrankung aus der Gruppe der Hirsche („Chronic Wasting Disease“, CWD) (Williams and Young, 1980), die spongiforme Enzephalopathie der Rinder („Bovine Spongiforme Encephalopathy“, BSE) (Wells et al., 1987), die sich durch kontaminierte Tiermehle nach Lockerung der Herstellungsvorschriften seuchenartig in Großbritannien verbreitet hatte und der über 200.000 Rinder zum Opfer fielen (Anderson et al., 1996; Wilesmith et al., 1991), sowie die spongiforme Enzephalopathie der Feliden (Katzen), die möglicherweise mit der Fütterung von kontaminiertem Rindfleisch in Zusammenhang steht („Feline Spongiforme Encephalopathy“, FSE) (Wyatt et al., 1991).

Zu den humanen Prionerkrankungen gehören die von Hans Gerhard Creutzfeldt 1920 (Creutzfeldt, 1920) und von Alfons Jakob 1921 (Jakob, 1921) erstmals beschriebene Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (CJD), das 1936 entdeckte Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) (Gerstmann et al., 1936) und die seit 1957 bekannte Kuru-Krankheit (Kuru bedeutet in der Sprache der Eingeborenen „schüttelfrostartiges Zittern“), die sich durch rituellen Kannibalismus unter Eingeborenen in Papua-Neuguinea verbreitet hatte (Gajdusek and Zigas, 1957). Ferner zählen zu den humanen Prionerkrankungen die 1986 beschriebene tödliche sporadische und familiäre Insomnie („fatal familial insomnia“, FFI) (Lugaresi et al., 1986) und die 1995 in Großbritannien erstmals aufgetretene neue Variante von CJD (vCJD), die nach aktuellem Kenntnisstand durch BSE verseuchtes Rindfleisch auf den Menschen übertragen wurde und sich durch ein jüngeres durchschnittliches Erkrankungsalter von 30 Jahren, längere Krankheitsdauer und psychiatrische Symptomatik wie Depressionen von der herkömmlichen CJD unterscheidet (Kretzschmar and Feiden, 2002; Will et al., 1996).

Bereits früh wurde vermutet, dass es sich um eine Infektionskrankheit handeln könnte. 1939 wurde erstmalig die Infektiosität von Scrapie experimentell gezeigt (Cuille and Chelle, 1939). 1959 erkannte William Hadlow die Parallele zwischen Scrapie und Kuru (Hadlow, 1959) und Igor Klatzo stellte einen Zusammenhang zwischen Kuru und CJD her (Klatzo et al., 1959). Es wurde von einem gemeinsamen Pathomechanismus der spongiformen Enzephalopathien

ausgegangen. 1961 gelang schließlich die speziesübergreifende Übertragung von Scrapie vom Schaf auf die Maus (Chandler, 1961).

Eine Infektiosität humaner Prionerkrankungen ist aufgrund der experimentellen Übertragbarkeit von Kuru (Gajdusek et al., 1966), CJD (Gibbs, Jr. et al., 1968) und GSS (Masters et al., 1981) auf Schimpansen anzunehmen. Tatsächlich kam es 1974 zu einer iatrogenen Übertragung von CJD von Mensch zu Mensch durch ein verseuchtes Hornhautimplantat (Duffy et al., 1974).

Zunächst glaubte man, dass es sich bei dem infektiösen Agens um einen „slow virus“ (Sigurdsson, 1954; Cho, 1976) handele. Das Adjektiv „slow“ bezog sich hierbei auf die ungewöhnlich lange, sich über Jahre bis Jahrzehnte erstreckende Inkubationszeit der spongiformen Enzephalopathien. Weitere Forschungsarbeiten legten jedoch nahe, dass sich der neuartige Erreger grundlegend von Viren und anderen konventionellen Erregern unterschied. Im Gegensatz zu Viren zeigte der TSE-Erreger ungewöhnlich hohe Resistenz gegenüber Nukleinsäure inaktivierenden Verfahren wie hoher Temperatur (Stamp, 1962), Formalin (Pattison, 1965), ionisierender Strahlung und ultraviolettem Licht (Alper et al., 1966). Protein-denaturierende Agenzien wie Harnstoff und Natronlauge hingegen führten zum Verlust der Infektiosität (Alper et al., 1967). Auch untypisch für herkömmliche Viren war, dass dieser außergewöhnliche Erregertyp nicht zu entzündlichen Gewebsinfiltraten führte, kein Fieber und keine humorale Immunantwort hervorrief (Aguzzi, 2003). Schließlich wurde 1967 von J.S. Griffith erstmals die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei dem neuartigen Erreger um ein „einfaches“ Protein handeln könnte, welches sich selbst im Körper ohne Nukleinsäuren replizieren könne (Griffith, 1967). Damit wurde die Basis für die so genannte „Protein-only“-Hypothese geschaffen. 1980 gelang der Arbeitsgruppe um Stanley Prusiner durch differentielle Zentrifugation von Scrapie-infiziertem Hamsterhirnhomogenat die partielle Aufreinigung eines infektiösen Agens, welches stark hydrophob war und eine hohe Resistenz gegenüber dem enzymatischen Verdau durch Proteinase K oder durch Nukleasen aufwies (Prusiner et al., 1980). Durch Protein-denaturierende Detergentien allerdings ließ sich die Infektiosität des Erregers deutlich reduzieren (Prusiner et al., 1980). In Anlehnung an diese Erkenntnisse nahm Stanley Prusiner 1982 die „Protein-only“-Hypothese wieder auf und nannte den neuartigen Erreger „Prion“, was sich herleitete von „**p**roteinaceous infectious agent“ (Prusiner et al., 1982). Noch im selben Jahr konnte das pathogene Prionprotein durch Fraktionierung aus infiziertem Hamsterhirn isoliert und durch SDS-Gelelektrophorese selektiv dargestellt werden (Bolton et al., 1982; Prusiner et al., 1982). Da

das Protein nach Proteinase K-Verdau ein Molekulargewicht von 27-30 kDa aufwies, wurde es PrP 27-30 genannt. Zwei Jahre später gelang es, die N-terminale Aminosäuresequenz des pathogenen Prionproteins zu entschlüsseln (Prusiner et al., 1984). Daraufhin konnte das Gen, welches für das Prionprotein kodiert, mittels einer c-DNA-Sonde identifiziert und kloniert werden (Chesebro et al., 1985; Oesch et al., 1985). Wider Erwarten wurde aber auch in nicht infiziertem Gewebe die Prionprotein-spezifische mRNA in gleichen Mengen wie in infiziertem Gewebe gefunden (Oesch et al., 1985; Chesebro et al., 1985). Dies impliziert, dass das Prionprotein physiologischerweise in Säugetierzellen exprimiert wird (Meyer et al., 1986). Tatsächlich konnte wissenschaftlich belegt werden, dass das pathogene Protein PrP^{Sc} (Scrapie) sowie seine physiologische Isoform PrP^C (cellular) vom selben Gen kodiert werden (Basler et al., 1986) und sich die infektiöse und die physiologische Form in ihrer Aminosäuresequenz (Primärstruktur) nicht unterscheiden. Auf die strukturspezifischen Unterschiede wird in 2.7. Das pathogene PrP^{Sc} im Vergleich zum physiologischen PrP^C eingegangen.

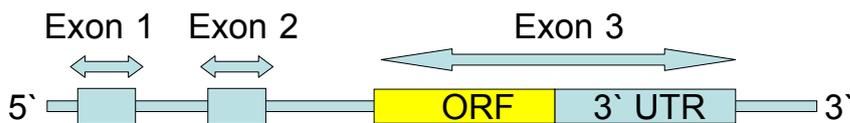
2. Das Prionprotein

Das zelluläre Prionprotein ist ein hoch konserviertes Protein, welches bei Säugetieren (Schatzl et al., 1995; Windl et al., 1995), Vögeln (Gabriel et al., 1992), Reptilien (Simonic et al., 2000), Amphibien (Strumbo et al., 2001) und Fischen (Suzuki et al., 2002) nachgewiesen wurde. Die Aminosäure-Homologien der Säugetiere untereinander sind hoch (Wopfner et al., 1999). Sie liegen bei den bisher untersuchten Säugern zwischen 84,7 % und 99,6 %. Die Aminosäure-Homologien zwischen Vögeln und Säugetieren allerdings sind relativ gering (Wopfner et al., 1999).

2.1. Das Prionprotein-Gen: Prnp

Das zelluläre Prionprotein wird bei allen bekannten Tierarten durch ein einzelnes Gen kodiert (Basler et al., 1986; Borchelt et al., 1990). Das Transkriptionsprodukt ist eine 2,1 kb m-RNA (Borchelt et al., 1990). Beim Menschen befindet sich dieses Gen auf dem kurzen Arm des Chromosom 20 und bei der Maus an der homologen Stelle auf Chromosom 2 (Sparkes et al., 1986). Je nach Tierart umfasst das Prionproteingen zwei oder drei Exons, die durch Introns getrennt sind. Der gesamte Leserahmen (ORF) befindet sich stets auf dem letzten Exon (Basler et al., 1986; Saeki et al., 1996; Westaway et al., 1994). Das Prionproteingen des Menschen umfasst wie das Gen des Hamsters zwei Exons (Basler et al., 1986; Puckett et al., 1991), das der Maus besteht aus drei Exons (Abbildung 1). Das letzte Exon beinhaltet neben der ORF-Region außerdem einen untranslatierten 3'-Bereich (3'-UTR) (Saeki et al., 1996).

Die Promotorregion weist einen hohen Gehalt an den Basen Guanin und Cytosin auf, beinhaltet Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Ap-1 und Sp-1 und besitzt keine TATA-Box. Diese Eigenschaften kennzeichnen das Prionproteinengen als so genanntes „Housekeeping-Gen“ (Saeki et al., 1996), das bedeutet als ein proteinkodierendes Gen, welches in jedem Entwicklungsstadium (Manson et al., 1992) und fast jedem Zelltyp exprimiert wird (Tichopad et al., 2003; Bendheim et al., 1992). Die höchsten Expressionslevel finden sich jedoch in Nervenzellen des Gehirns und Rückenmarks (Kretzschmar et al., 1986). Besonders konzentriert kommt das Prionprotein im Bereich neuronaler Synapsen vor (Herms et al., 1999). Bemerkenswert ist außerdem die Expression in lymphatischem Gewebe (Cashman et al., 1990).



ORF = **O**pen **R**eadin**G** **F**rame

3` UTR = **U**ntranslatierte **3`-R**egion

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Prionproteinengens der Maus

2.2. Synthese des Prionproteins

Das Prionprotein ist ein Membranprotein und setzt sich vor sämtlichen Modifizierungsprozessen aus 253 Aminosäuren (beim Menschen) beziehungsweise 254 Aminosäuren (bei der Maus) zusammen. Es besitzt eine N-terminale Signalsequenz von 22 Aminosäuren für die Synthese am Endoplasmatischen Retikulum.

An seinem C-Terminus befindet sich eine hydrophobe Erkennungssequenz für einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (Stahl et al., 1990) (siehe 2.3. Struktur des Prionproteins, Abbildung 3).

Die Biosynthese des Prionproteins ist in Abbildung 2 beispielhaft am murinen Prionprotein systematisch dargestellt: Als Plasmamembranprotein erfährt das Prionprotein auf seinem

sekretorischen Syntheseweg durch das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche mehrere ko- und posttranslationale Modifikationen.

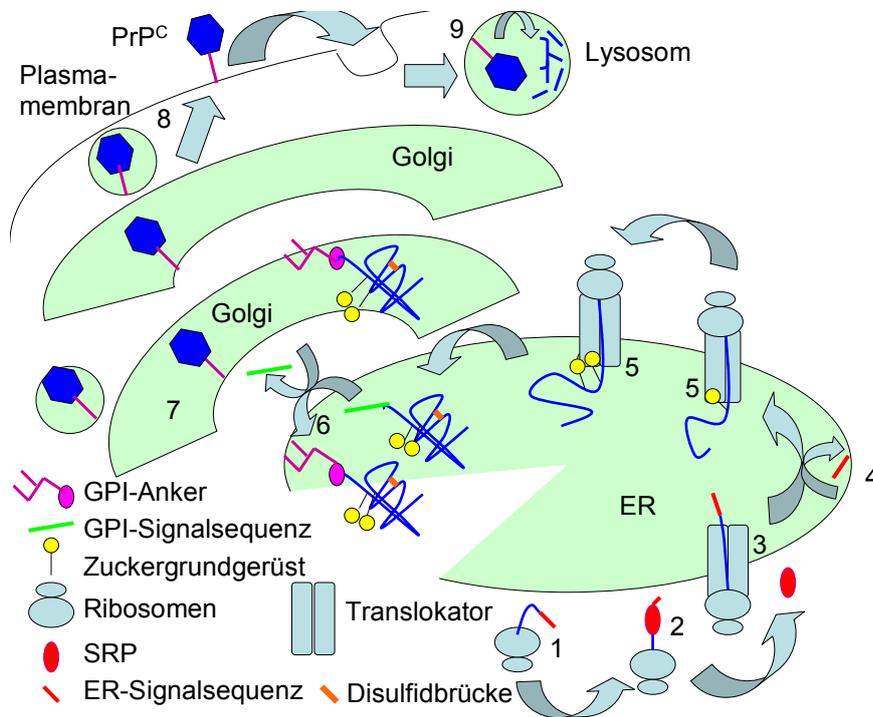


Abbildung 2: Biosynthese des Prionproteins (Erklärung im Text)

Wie für Membranproteine typisch, beginnt die Synthese des Prionproteins an freien Ribosomen im Cytosol mit der Synthese einer N-terminalen Signalsequenz (1). Sobald die N-terminale Signalsequenz aus dem Ribosom herausragt, wird sie von einem RNA-Protein-Komplex, dem Signalerkennungspartikel (signal recognition particle, SRP), erkannt und gebunden (2). SRP stoppt die Proteinsynthese vorübergehend und lenkt das Prionprotein samt Ribosom an das raue Endoplasmatische Retikulum (ER) (3). Kotranslational wird die N-terminale Signalsequenz abgespalten (4). Fakultativ werden die Asparaginreste in den Aminosäure-Positionen 180 und 196 an ihren Stickstoffatomen mit Mannose-Zuckergrundgerüsten versehen (5) (Stimson et al., 1999; Manuelidis et al., 1985; Bolton et al., 1985). Schließlich wird die C-terminale Erkennungssequenz für den Glycosylphosphatidylinositolanker (GPI-Anker) abgespalten und durch einen GPI-Anker ersetzt (6), der im Ganzen an Serin 231 angeheftet wird. Die Cysteinreste in den Positionen 178 und 213 werden zu einer Disulfidbrücke verknüpft (Hope et al., 1986; Turk et al., 1988). Vom Endoplasmatischen Retikulum gelangt das Protein in den Golgiapparat (7), wo die Modifikation der beiden Mannose-reichen Zuckergrundgerüste zu komplexeren hybriden Glykanen erfolgt (Caughey et al., 1989; Shyng et al., 1993). Zudem finden dort Sialisierungen sowohl der N-Glycosylierungen als auch des GPI-Ankers statt (Bolton et al., 1985; Safar et

al., 1990; Stahl et al., 1992). Vom Golgi-Apparat aus wird das Prionprotein in Vesikel verpackt und an die Zelloberfläche geschleust (8). An der Zelloberfläche angekommen, wird das fertige Prionprotein mithilfe seines GPI-Ankers in der Plasmamembran auf der extrazytoplasmatischen Seite verankert (Caughey et al., 1989) (8).

Vom Beginn seiner Synthese bis zum Erreichen der Zelloberfläche benötigt das Prionprotein etwa eine Stunde (Caughey et al., 1989; Shyng et al., 1993). Seine Halbwertszeit an der Oberfläche der Zelle beträgt 3 bis 6 Stunden (Caughey et al., 1989).

Von der Zelloberfläche aus kann das Prionprotein wieder internalisiert werden (9) (Shyng et al., 1993).

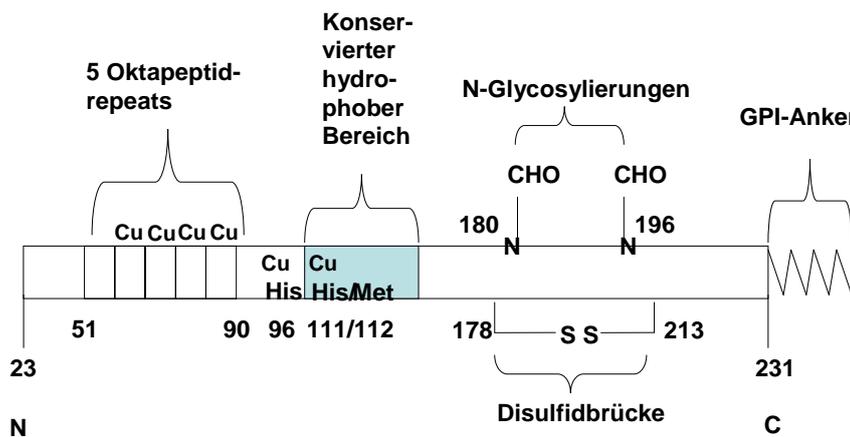
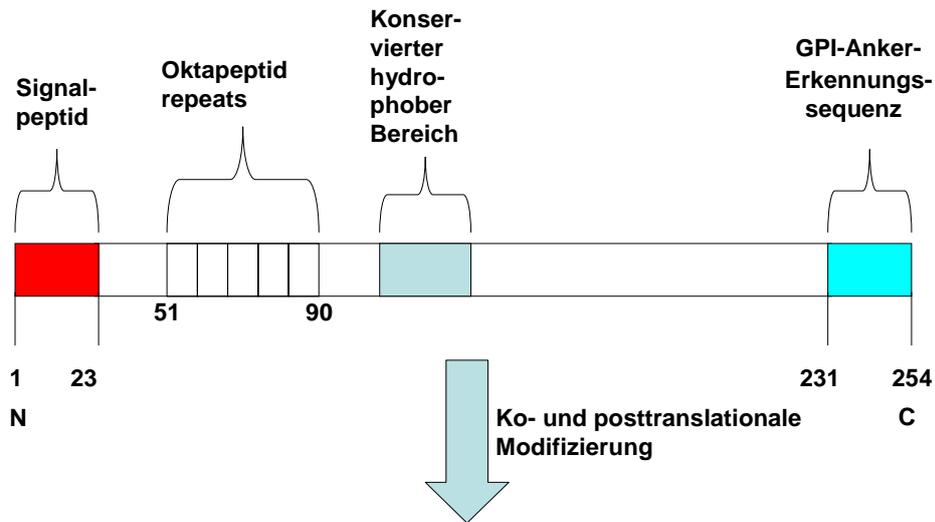
Für den Endozytosevorgang des Prionproteins werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die im Einzelnen unter 2.5. Endocytose des Prionproteins erläutert werden.

Anschließend kann das Prionprotein entweder durch Verschmelzung der Endosomen mit Lysosomen vollständig abgebaut werden oder recycelt und per Exocytose an die Zelloberfläche zurück transportiert werden (Shyng et al., 1993; Magalhaes et al., 2002).

2.3. Struktur des Prionproteins

Neben einem N-terminalen Signalpeptid und einer GPI-Erkennungssequenz besitzt das Prionprotein eine zentrale hydrophobe Region, welche bei allen Prionprotein-Spezies vollständig konserviert ist. Sein N-Terminus weist zudem eine Oktapeptidrepeat-Region mit 4 (beim Menschen) beziehungsweise 5 (bei der Maus) Wiederholungen (engl.: repeats) des Aminosäuremotivs (Oktapeptids) Prolin-Histidin-Glycin-Glycin-Glycin-Tryptophan-Glycin-Glutamin auf.

Abbildung 3 zeigt beispielhaft am **murinen** Prionprotein die Primärstruktur vor und nach posttranslationaler Modifizierung (N-Glycosylierungen und Disulfidbrücke). Abbildung 4 stellt ergänzend die posttranslational modifizierte Primärstruktur des **humanen** Prionproteins dar.



Cu Kupfer
His Histidinrest
Met Methioninrest

Abbildung 3: Die Primärstruktur des murinen Prionproteins, seine posttranslationalen Modifikationen und seine potentiellen Bindungsstellen für Kupfer

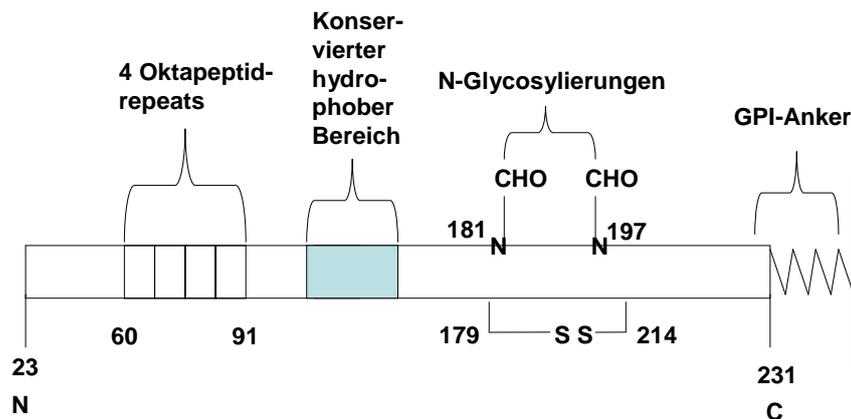


Abbildung 4: Die posttranslational modifizierte Primärstruktur des humanen Prionoproteins

Die Tertiärstruktur des Prionoproteins konnte durch NMR-Spektroskopie größtenteils aufgeklärt werden (Lopez et al., 2000; Riek et al., 1996; Riek et al., 1997; Zahn et al., 2000) (Abbildung 5): Die erste kleine α -Helix (violett) wird durch zwei kleine antiparallele β -Faltblätter (grün) eingeschlossen. Daran schließen sich zwei weitere α -Helices (violett) an, welche durch die Disulfidbrücke stabilisiert werden. Der N-Terminus ist unstrukturiert, nicht gefaltet und beweglich.

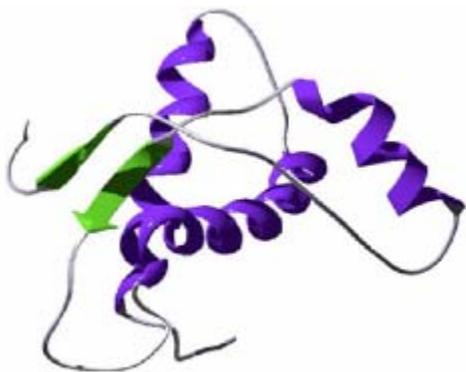


Abbildung 5: Tertiärstruktur des Prionoproteins (Riek et al., 1996)

Zudem ist das Prionprotein in der Lage, an seinem N-Terminus Kupfer-Ionen zu binden (Abbildung 3) (Hornshaw et al., 1995; Kramer et al., 2001; Viles et al., 1999; Aronoff-Spencer et al., 2000; Brown et al., 1997a; Jackson et al., 2001). Es konnten sechs konservierte Histidinreste als potentielle Kupferbindungsstellen identifiziert werden. Vier davon befinden

sich in der N-terminalen Oktapeptidrepeat-Region, die anderen beiden an den Histidinresten in den Positionen 96 und 111 (Jackson et al., 2001).

Der Kupferionen bindende N-Terminus des Prionproteins scheint sowohl am „subcellular trafficking“, der Steuerung des Prionproteins in die entsprechenden subzellulären Kompartimente, als auch an seiner Endocytose (siehe auch 2.5. Endocytose des Prionproteins) maßgeblich beteiligt zu sein (Nunziante et al., 2003; Shyng et al., 1995; Sunyach et al., 2003; Taylor and Hooper, 2006).

2.4. Zelluläre Lokalisation des Prionproteins

Das membranständige Prionprotein findet sich, wie es für GPI-geankerte Proteine der Plasmamembran typisch ist, besonders konzentriert in so genannten Lipid-Raft-Domänen, welche am Prionproteinmetabolismus beteiligt zu sein scheinen (Vey et al., 1996; Harmey et al., 1995; Naslavsky et al., 1997; Taylor and Hooper, 2006; Gorodinsky and Harris, 1995). Lipid-Rafts sind Mikrodomänen der Zellmembran, die unlöslich in kaltem Triton X 100 und reich an Glykolipiden mit ihren Ankerproteinen, Cholesterol, Glycosphingolipiden und Sphingomyelin sind (Ying et al., 1992). Es gibt Proteine, die nur außerhalb von Lipid-Raft-Domänen lokalisiert sind. Daneben existieren Proteine, die sich fast ausschließlich innerhalb von Lipid-Raft-Abschnitten befinden. Des Weiteren gibt es Proteine, die zwischen beiden Standorten hin und her wechseln können. Ein Wechsel aus Nicht-Lipid-Raft-Domänen in Lipid-Rafts kann beispielsweise durch Antikörper vermittelte Quervernetzung induziert werden (Simons and Ehehalt, 2002). Zu den typischen Proteinen in Lipid-Raft-Regionen gehören die GPI-verankerten Proteine, Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinasen (z.B. Fyn und Src), $G\alpha$ -Einheiten heterotrimerer G-Proteine und e-Nos. Durch eine Palmitoylierung können Proteine wie β -Sekretase transmembranös verankert werden (Simons and Ehehalt, 2002). Ein Protein, das seinen Standort je nach Palmitoylierungszustand wechselt, ist die Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase (Zacharias et al., 2002).

Bisherige Forschungsergebnisse legen nahe, dass die Prionproteinlokalisation in Lipid-Raft-Domänen eine Voraussetzung für die Konversion von der zellulären zur pathogenen Prionproteinisoform darstellt (Kaneko et al., 1997; Marella et al., 2002; Naslavsky et al., 1997; Naslavsky et al., 1999; Peters et al., 2003; Taylor and Hooper, 2006; Vey et al., 1996) und für eine mögliche Signaltransduktion durch das Prionprotein von Bedeutung sein könnte (Taylor and Hooper, 2006; Stuermer and Plattner, 2005; Stuermer et al., 2004).

Zudem ist in der Literatur die Assoziation des zellulären Prionproteins mit Caveolen beschrieben (Harmey et al., 1995). Caveolen sind Einstülpungen an der Außenseite der

Zellmembran, die aus speziellen Lipid-Rafts bestehen. Allerdings besitzen weder Neurone noch Lymphozyten, auf denen das Prionprotein vornehmlich lokalisiert ist, Caveolen (Fra et al., 1994; Lang et al., 1998; Simons and Toomre, 2000).

Möglicherweise existieren neben der GPI-geankerten Prionproteinvariante, bei der die Polypeptidkette komplett auf der Extrazellulärseite der Lipiddoppelschicht lokalisiert ist, auch eine N- sowie eine C-terminale transmembranöse Form (Hegde et al., 1998; Stewart and Harris, 2001). Ohne entsprechende prädisponierende Mutationen sind diese transmembranösen Formen aber nur in minimalen Mengen vorhanden (Stewart and Harris, 2001). Des Weiteren wurden auch Prionproteinmoleküle beschrieben, welche vollständig im Zytoplasma lokalisiert waren (Ma and Lindquist, 2002). Allerdings konnte gezeigt werden, dass dieser intrazytoplasmatischen Variante ein Artefakt durch Prionproteinüberexpression oder Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren zugrunde liegen könnte (Drisaldi et al., 2003).

2.5. Endocytose des Prionproteins

Für den Endocytosevorgang werden zwei Mechanismen diskutiert: Zum einen besteht die Möglichkeit, dass das Prionprotein in bestimmten Zellen über Caveolen, die sich von der Plasmamembran abschnüren, ins Zellinnere aufgenommen wird (Marella et al., 2002; Peters et al., 2003; Vey et al., 1996). Dieser Vorgang wird offensichtlich durch Kupferionen katalysiert (Marella et al., 2002). Als anderer möglicher Internalisierungsmechanismus wird die Endocytose über Clathrin coated pits diskutiert: Hierbei wird die Kupferbindung an den N-Terminus des Prionproteins dafür verantwortlich gemacht, dass das Prionprotein den Lipid-Raft-Bereich verlassen kann, in einen Nicht-Lipid-Raft-Bereich transloziert wird und über Clathrin coated pits endocytiert werden kann (Shyng et al., 1994; Sunyach et al., 2003; Shyng et al., 1995; Taylor and Hooper, 2006; Taylor et al., 2005). Der N-Terminus bringt das Prionprotein möglicherweise mit einem transmembranösen Adaptermolekül in Verbindung, welches wiederum mit der Clathrin-Endocytose-Maschinerie in Kontakt steht (Taylor and Hooper, 2006; Taylor et al., 2005). Sowohl Clathrin coated pits als auch Caveolen können über den Endocytose-Weg mit Endosomen verschmelzen. Die Endocytose lässt sich durch Kupferionen stimulieren (Pauly and Harris, 1998).

2.6. Spaltung des Prionproteins

Posttranslational finden potentiell zwei Spaltungen des Prionproteins mit Abspaltung des N-Terminus statt (α - und β -cleavage).

In welchem Kompartiment (intrazellulär, extrazellulär) diese Spaltungen stattfinden, ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Vermutung ist, dass sie sich auf der Zelloberfläche innerhalb der Lipid-Rafts oder in einem sauren Kompartiment während des Endocytose(Abbau)- und Recycling-Vorgangs des Proteins ereignen und in Zusammenhang mit der Funktion des Prionproteins (Aktivierung von Signaltransduktion und Zellüberleben) stehen könnten (Mange et al., 2004; McMahon et al., 2001; Chen et al., 2003b; Mouillet-Richard et al., 2000; Chen et al., 1995; Shyng et al., 1993; Taraboulos et al., 1995).

Die N-terminalen Prionprotein-Spaltstellen befinden sich in direkter Nachbarschaft zu Kupfer bindenden Histidinresten. Eine mögliche Spaltstelle des zellulären Prionproteins konnte vor der Kupfer bindenden Aminosäure His-111 oder vor der Aminosäure Met-112 identifiziert werden (α -cleavage) (Chen et al., 1995; Shyng et al., 1993; Vincent et al., 2000). Das dabei entstandene membrangebundene glycosylierte C-terminale Fragment wurde C1-Fragment genannt.

Später wurde in Westernblotanalysen neben dem kürzeren C1 Fragment (18 kDa) in geringen Mengen auch ein längeres so genanntes C2-Fragment (21-22 kDa) nachgewiesen, welches eine intakte 110/111/112 Spaltstelle besaß und aus einer Spaltung nahe der Kupfer bindenden Oktapeptidrepeat-Region an Aminosäure-Position 96/97 hervorgegangen war (β -cleavage) (Jimenez-Huete et al., 1998; Mange et al., 2004).

Es wurde spekuliert, dass das Prionprotein möglicherweise zunächst durch die β -cleavage aktiviert wird, dadurch seine Funktion (Signaltransduktion, Neuroprotektion) ausüben könnte und durch eine rasch folgende α -cleavage wieder inaktiviert wird (Mange et al., 2004). Die β -cleavage lässt sich durch oxidativen Streß stimulieren und wird möglicherweise durch einen Kupfer abhängigen Mechanismus katalysiert (McMahon et al., 2001; Watt et al., 2005; Watt and Hooper, 2005). Es wird daher postuliert, dass oxidativer Stress direkt zur Spaltung (β -cleavage) des Prionproteins und so zu seiner Aktivierung (Signaltransduktion, Neuroprotektion) führen könnte (McMahon et al., 2001; Mange et al., 2004). Mäuse, bei denen das Aminosäuremotiv 105-125 und damit die α -cleavage-Stelle deletiert worden war, entwickelten langfristig eine schwere Neurodegeneration (Li et al., 2007). HpL3-4 Zellen hingegen, bei denen die α -cleavage-Position im Prionprotein (PrP Δ 110-119) deletiert worden war, wiesen eine höhere Überlebensfähigkeit unter oxidativem Stress auf als Zellen, die ein normales Prionprotein exprimierten. Diese Ergebnisse könnten auf einen Zusammenhang der neuroprotektiven Aktivität des Prionproteins mit der α -cleavage hinweisen. Die Langzeit-Neurodegeneration wäre hier am ehesten als „gain of function“ bei fehlender Inaktivierung durch die α -cleavage zu verstehen (Mange et al., 2004).

2.7. Das pathogene PrP^{Sc} im Vergleich zum physiologischen PrP^C

Das pathogene PrP^{Sc} und das physiologische PrP^C unterscheiden sich in ihren biochemischen Eigenschaften. Während PrP^C vollständig durch zelleigene Proteasen (Proteinase K) hydrolysiert wird, ist PrP^{Sc} gegenüber dem Verdau durch Proteasen (Proteinase K) resistent (Bolton et al., 1982; Prusiner et al., 1982; McKinley et al., 1983). Außerdem zeigt PrP^{Sc} eine höhere Resistenz gegenüber Protein-denaturierenden Maßnahmen wie Hitze, UV- und γ -Strahlen als PrP^C.

PrP^C und PrP^{Sc} besitzen allerdings eine identische Primärstruktur, das heißt eine identische Aminosäuresequenz und keine divergierenden Modifizierungen (Stahl et al., 1993). Es wird angenommen, dass sich die höhere Resistenz von PrP^{Sc} auf eine andere strukturelle Faltung, das heißt eine andere Sekundär- beziehungsweise Tertiärstruktur, zurückführen lässt. Während sich PrP^C zu 42 % aus α -Helixstruktur zusammensetzt und nur zu 3 % aus β -Faltblattstruktur, besteht PrP^{Sc} nur zu 30 % aus α -Helixstruktur und zu 54 % aus β -Faltblattstruktur (Abbildung 6) (Pan et al., 1993).

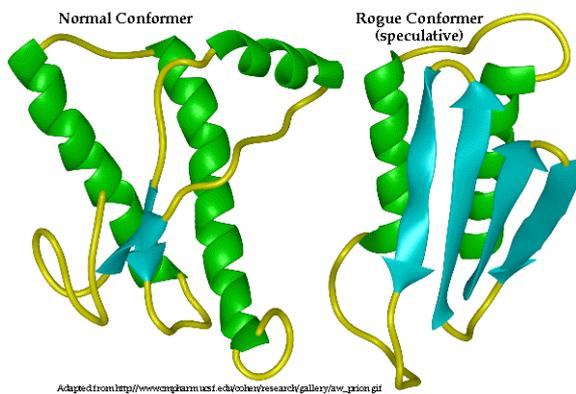


Abbildung 6: Tertiärstruktur von PrP^C (links) und PrP^{Sc} (rechts)

Diese spezielle Tertiärstruktur verleiht dem pathogenen Prionprotein PrP^{Sc} im Gegensatz zu seiner physiologischen Isoform die Fähigkeit, sich im Hirn zu Protease-resistenten, länglichen amyloidartigen Aggregaten (Fibrillen) zusammenzulagern (Prusiner et al., 1983). Dies erschwert seinen Abbau.

Während PrP^C eine kurze Halbwertszeit hat und schnell synthetisiert beziehungsweise abgebaut wird, hat PrP^{Sc} eine sehr lange Halbwertszeit, akkumuliert und lagert sich an der Zelloberfläche, in späten Endosomen, Lysosomen und schließlich im Extrazellulärraum ab (Arnold et al., 1995; Borchelt et al., 1990; McKinley et al., 1991; Jeffrey et al., 1992; Lehmann and Harris, 1996; Stahl et al., 1990).

2.8. Mechanismus der Infektiosität

Das infektiöse PrP^{Sc} geht durch strukturelle Umfaltung aus seiner physiologischen Isoform PrP^C hervor (Basler et al., 1986). Die Umwandlung von der physiologischen in die pathogene Isoform ist ein posttranslationaler Prozess (Basler et al., 1986; Borchelt et al., 1990; Caughey and Raymond, 1991). Nachdem sich ein pathogenes Prionprotein (PrP^{Sc}) gebildet hat (spontan, genetisch oder durch Inokulation bzw. Infektion), kann es dort selbst („autokatalytisch“) die Umfaltung von weiterem PrP^C zu PrP^{Sc} katalysieren und sich so vermehren. Mit der „Protein Misfolding Cyclic Amplification“ (PMCA) konnte diese autokatalytische Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} in vitro gezeigt werden (Saborio et al., 2001).

Für den Nukleinsäure-freien Replikationsmechanismus des pathogenen Prionproteins im Organismus existieren zwei Modelle, die nach reaktionskinetischen Berechnungen als realistisch gelten (Eigen, 1996):

Laut dem autokatalytischen Umfaltungsmodell („refolding model“/ Heterodimer-Modell, Abbildung 7) interagiert das infektiöse PrP^{Sc} mit dem zellulären PrP^C, wodurch das zelluläre PrP^C unter Überwindung einer hohen Energiebarriere und möglicherweise mit Hilfe eines „Faktor X“ als stabilisierendes Chaperon die Konformation des pathogenen PrP^{Sc} annimmt. PrP^{Sc} dient hierbei als dreidimensionale Matritze für den Umfaltungsprozess von PrP^C (Prusiner et al., 1982; Smith and Collinge, 1995). Diese Umfaltung setzt sich exponentiell fort und scheint durch bestimmte hereditäre Prionproteingenmutationen energetisch begünstigt zu werden (hereditäre Prionerkrankungen).

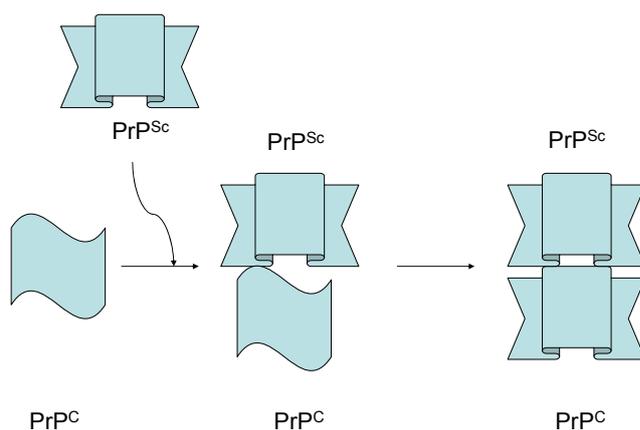


Abbildung 7: Autokatalytisches Umfaltungsmodell/ Heterodimer-Modell

Nach dem „Nukleationsmodell“ (Abbildung 8) stehen PrP^C und PrP^{Sc} in einem dynamischen Gleichgewicht, welches auf der Seite von PrP^C liegt. Geringe Mengen an PrP^{Sc}-Molekülen

sind noch nicht pathogen. Zur Infektiosität kommt es erst, wenn ein PrP^{Sc}-Oligomer von kritischer Größe, ein so genannter Nukleationskeim, entsteht (spontan auftretend) oder von außen zugeführt wird (infektiös). Dieser Nukleationskeim kann PrP^C-Moleküle an seinen Enden binden. Dadurch wird die Umwandlung der gebundenen PrP^C-Moleküle in PrP^{Sc}-Moleküle thermodynamisch begünstigt, ähnlich einer Polymerisation. Anschließend zerfällt der Nukleus in kleinere Untereinheiten, wodurch es zur exponentiellen Vermehrung von PrP^{Sc} kommt (Jarrett and Lansbury, Jr., 1993).

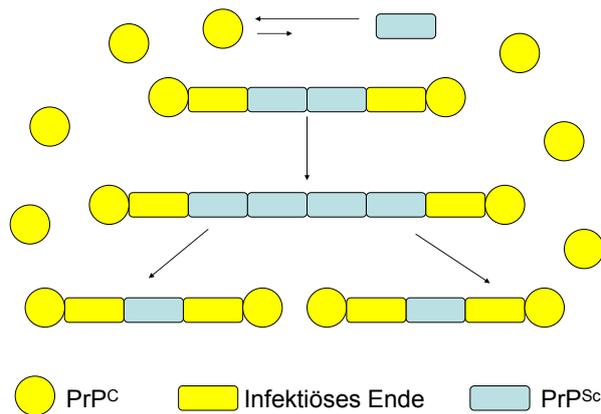


Abbildung 8: Nukleationsmodell [modifiziert nach (Kretzschmar and Feiden, 2002)]

3. Die Funktion des Prionproteins

Der hohe Grad der Konservierung des Prionproteins innerhalb der Säugetiere und die Tatsache, dass das Prionprotein bereits in der Steinzeit von Amphibien und Reptilien exprimiert wurde, legen eine wichtige Funktion des Prionproteins nahe. Bisher konnte die Funktion des Prionproteins dennoch nicht vollständig verstanden werden [zusammengefasst in (Westergard et al., 2007)].

3.1. Prnp -Knockout-Mäuse

Zunächst wurde versucht, die physiologische Funktion des Prionproteins vom Phänotyp der Prnp-Knockout-Mäusen abzuleiten, bei denen der proteinkodierende Bereich im Prionproteingen durch Insertion einer Neomycin-Resistenz-Kassette unterbrochen worden war und die somit kein Prionprotein exprimierten (Bueler et al., 1992; Manson et al., 1994). Diese Prnp-Knockout-Mäuse zeigten überraschenderweise einen unauffälligen Phänotyp, das heißt zumindest keine Abnormalitäten in Bezug auf Anatomie und Entwicklung (Bueler et al., 1992; Manson et al., 1994). Später wurden weitere Prnp-Knockout-Stämme gezüchtet, bei denen der proteinkodierende Bereich des Gens sowie angrenzende Regionen deletiert worden

waren (Rossi et al., 2001; Sakaguchi et al., 1996). Diese Mäuse zeigten, im Gegensatz zu den phänotypisch unauffälligen Knockout-Stämmen, koordinative Störungen, Ataxie und Verlust von Purkinjezellen im Kleinhirn. Es wurde gefunden, dass diese Mäuse das Protein Doppel, welches 35 % Sequenzhomologie zum Prionprotein aufweist, überexprimierten. Doppel war bei diesen Mäusen „fälschlicherweise“ unter die Kontrolle des Prionprotein-Promotors geraten. In diesen phänotypisch auffälligen Mäusen führte höchstwahrscheinlich nicht der Verlust der Funktion des Prionproteins, sondern die Überexpression des neurotoxischen Proteins Doppel zur Neurodegeneration (Rossi et al., 2001; Moore et al., 1999).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Knockout-Mäuse im „normalen Leben“ und wenn sie nicht artifiziell Doppel überexprimieren, keine relevanten Defizite zeigen. Man könnte diskutieren, dass andere Proteine in Knockout-Mäusen die essentielle Funktion des Prionproteins kompensatorisch übernehmen könnten. Dies scheint jedoch eher unwahrscheinlich, da auch Mäuse, bei denen das Prionprotein erst postnatal über das Cre-Lox System ablatiert wurde, wenig phänotypische Auffälligkeiten zeigten (Mallucci et al., 2002).

Zu den geringen phänotypischen Unterschieden, die sich bei Prnp-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Prnp-Wildtyp-Mäusen finden, gehören Veränderungen des Wach-Schlaf-Rhythmus (Tobler et al., 1996; Tobler et al., 1997), der synaptischen Plastizität im Hippocampus (Colling et al., 1997), der räumlichen Lernfähigkeit (Criado et al., 2005) sowie des Kurz- und Langzeitgedächtnisses (Coitinho et al., 2003; Nishida et al., 1997).

3.2. Einfluss auf synaptische Erregungsübertragung und Calciumhomöostase durch das Prionprotein

Auf neurophysiologischer Ebene zeigten sich deutlichere Unterschiede zwischen Prnp-Knockout-Mäusen und Prionprotein-exprimierenden Wildtyp-Mäusen, die zu den oben genannten phänotypischen Defiziten der Prnp-Knockout-Mäuse beitragen könnten. In hippocampalen Schnitten von Prnp-Knockout-Mäusen wurde eine Beeinträchtigung der Langzeitpotenzierung (LTP) festgestellt, die teilweise altersabhängig war (Curtis et al., 2003; Collinge et al., 1994; Criado et al., 2005; Manson et al., 1995). Weitere Studien konnten eine positive Korrelation zwischen dem Prionprotein-Expressionslevel und der Gesamtstärke der glutaminergen Erregungsübertragung im Hippocampus von Wildtyp-Mäusen zeigen, wobei Prionprotein-überexprimierende Mäuse sogar eine Über-Erregbarkeit zeigten (Carleton et al., 2001). In einer anderen Untersuchung wurde festgestellt, dass die Abwesenheit des Prionproteins funktionelle Veränderungen am glutaminergen System hervorrief, was sich

durch eine abnorm verminderte hyperlokomotorische Antwort von Prnp-Knockout-Mäusen auf einen NMDA-Rezeptor-Antagonisten (MK-801) hin zeigte (Coitinho et al., 2002). Die Untersuchungen zur synaptischen Erregungsübertragung lieferten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse. Lledo et al. stellten bei ihren Versuchen keine Unterschiede in der hippocampalen LTP und der neuronalen Erregbarkeit zwischen Prnp-Knockout-Mäusen und Prnp-Wildtyp-Mäusen fest (Lledo et al., 1996). Die Untersuchungen von Purkinjezellen im Kleinhirn ergaben ebenfalls keine Unterschiede in der synaptischen Erregungsübertragung an GABA- und glutamergen Rezeptoren zwischen Prnp-Knockout-Mäusen und Prnp-Wildtyp-Mäusen (Herms et al., 1995).

In neueren Studien wurde in Prnp-Knockout-Mäusen eine niedrigere Auslöseschwelle für die Langzeitpotenzierung (LTP) und eine verstärkte Exzitabilität des glutamergen Systems im Vergleich zu Prnp-Wildtyp-Mäusen festgestellt (Maglio et al., 2006; Maglio et al., 2004).

Prnp-Knockout-Mäuse wiesen sowohl in hippocampalen CA1 Neuronen (Colling et al., 1996; Mallucci et al., 2002) als auch in Purkinje-Zellen des Kleinhirns (Herms et al., 2001) eine signifikante Verminderung der Nachhyperpolarisation auf, was sich elektrophysiologisch in einer Störung der Calcium-aktivierten Kaliumströme widerspiegelte (Colling et al., 1996; Herms et al., 2001).

Dem Prionprotein wurde mehrfach eine Beeinflussung der Calciumhomöostase zugeschrieben. So zeigten zerebelläre Körnerzellen von Prnp-Knockout-Mäusen einen verminderten intrazellulären freien Calciumgehalt, eine signifikante Verminderung des Calciumeinstroms nach starker Kaliumdepolarisation sowie, im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen, keine Reaktion auf den Calciumkanalblocker Nifedipin (Herms et al., 2000). Es fand sich hierbei keine Beeinträchtigung von spannungsgesteuerten Calciumkanälen in Knockout-Zellen (Herms et al., 2000). Spätere Untersuchungen an hippocampalen Neuronen ergaben eine verminderte Aktivität der spannungsgesteuerten Calciumkanäle in Knockout-Zellen bei Depolarisationsversuchen zur Induktion einer Nachhyperpolarisation (Fuhrmann et al., 2006). Brini et al. konnten demonstrieren, dass das Prionprotein Einfluss auf die Calciumhomöostase der Zelle nahm (Brini et al., 2005).

Außerdem wurde herausgefunden, dass eine intrazelluläre Calciumerhöhung in cerebellären Körnerzellen und hippocampalen Neuronen als Reaktion auf oxidativen Stress von der Anwesenheit des Prionproteins abhing. Diese durch oxidativen Stress (H_2O_2) induzierte intrazelluläre Calciumerhöhung war außerdem von der Tyrosinkinase Fyn abhängig (Krebs et al., 2007).

3.3. Das Prionprotein und Neuroprotektion

Wegweisend auf der Suche nach der Funktion des Prionproteins war die Erkenntnis der potentiellen neuroprotektiven Funktion des Prionproteins bei Hirnschädigungen ischämischer, traumatischer oder hypoxischer Art (Hoshino et al., 2003; McLennan et al., 2004; Spudich et al., 2005; Weise et al., 2006; Mitteregger et al., 2007; Weise et al., 2004). Die Läsionsvolumina nach hypoxischer, ischämischer oder traumatischer Hirnverletzung waren in Prnp-Wildtyp-Mäusen in allen Versuchsmodellen signifikant kleiner als in Prnp-Knockout-Mäusen (McLennan et al., 2004; Spudich et al., 2005; Weise et al., 2006; Mitteregger et al., 2007; Hoshino et al., 2003). Außerdem zeigten Prnp-Wildtyp-Mäuse eine verminderte Epilepsieanfälligkeit und verminderte Epilepsie-induzierte Hirnschädigung gegenüber Prnp-Knockout-Mäusen (Walz et al., 1999; Walz et al., 2002). Neuronale Prnp-Knockout-Zellen waren in Zellkultur zudem anfälliger gegenüber durch Serumentzug induzierter Apoptose (Kim et al., 2004; Kuwahara et al., 1999; Nishimura et al., 2007; Roucou et al., 2005; Sakudo et al., 2003a; Sakudo et al., 2003b).

In diesem Zusammenhang ist zu diskutieren, dass Hypoxie, Epilepsie, Ischämie und Serumentzug äußere Stressfaktoren für die Nervenzellen darstellen, die unter Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels bis hin zur Apoptose und Nekrose führen. Gegenüber diesen kritischen und „nicht normalen Lebensbedingungen“, die alle durch oxidativen Stress in Folge von Substratmangel gekennzeichnet sind, scheinen die Prnp-Wildtyp-Neurone besser geschützt zu sein als die Prnp-Knockout-Neurone.

3.3.1. Das Prionprotein und oxidativer Stress

Dem Prionprotein wird ein protektiver Effekt gegenüber oxidativem Stress zugeschrieben [zusammengefasst in (Milhavet and Lehmann, 2002)]. So waren kultivierte Neurone aus Prnp-Knockout-Mäusen empfindlicher gegenüber Behandlung mit Substanzen, die oxidativen Stress induzierten (Wasserstoffperoxid, Xanthinoxidase, Kupferionen und Manganionen), als Neurone aus Prnp-Wildtyp-Mäusen (Brown et al., 2002; Choi et al., 2007; Kang et al., 2007; White et al., 1999; Brown et al., 1997b). Zu diesen Ergebnissen passend, wies Hirngewebe von Prnp-Knockout-Mäusen biochemische Veränderungen auf, die für verstärkten oxidativen Stress sprachen. Im Hirngewebe von Prnp-Knockout-Mäusen fand sich eine erhöhte Menge an Protein- und Lipid-Peroxidationsprodukten (Wong et al., 2001).

Zum einen wurde postuliert, dass das Prionprotein selbst als kupferabhängige Superoxiddismutase (SOD) fungieren könne (Brown et al., 1999; Brown et al., 2001), was allerdings kritisch diskutiert wurde (Rae et al., 1999; Jones et al., 2005).

In weiteren Studien wurde eine verminderte Expression, Aktivität und Kupferbeladung der Cu-Zn SOD in Prnp-Knockout-Neuronen gefunden (Brown and Besinger, 1998; Brown et al., 2002; Kang et al., 2007; Klamt et al., 2001; Brown et al., 1997b; Sakudo et al., 2003b). Andere Untersuchungen konnten für diese Ergebnisse jedoch keine Allgemeingültigkeit belegen (Hutter et al., 2003; Waggoner et al., 2000).

Ferner wurde eine verminderte Aktivität antioxidativer Enzyme, wie der Katalase, Glutathion-Reduktase und Glutathion-Peroxidase, in Prnp-Knockout-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen beobachtet (Klamt et al., 2001; White et al., 1999; Watt et al., 2005). Außerdem fanden sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Reaktion der synaptischen Erregungsübertragung auf oxidativen Stress (H_2O_2) und der Stärke der Prionproteinexpression (Herms et al., 1999).

Die Spaltung des Prionproteins kann durch oxidativen Stress (H_2O_2) induziert werden (s.o.), was möglicherweise in Zusammenhang mit der Aktivierung des Prionproteins (Neuroprotektion, Signalübertragung) unter oxidativem Stress stehen könnte (McMahon et al., 2001).

Oxidativer Stress kann in Abhängigkeit seiner Schwere und Möglichkeiten zur Kompensation entweder sofort zur Nekrose oder über Apoptose zum Zelltod führen (Saikumar et al., 1998; Graham and Chen, 2001; Plesnila, 2004).

3.3.2. Das Prionprotein und Bax-induzierte Apoptose

Auf zellulärer Ebene könnte die mehrfach beschriebene partielle Hemmung Bax-induzierter Apoptose durch das Prionprotein für die beobachteten neuroprotektiven Effekte bei Hypoxie, Ischämie, Epilepsie und Serumentzug mitverantwortlich sein (Bounhar et al., 2001; Roucou et al., 2003; Diarra-Mehrpour et al., 2004; Kuwahara et al., 1999; Li and Harris, 2005; Roucou et al., 2005; Sakudo et al., 2003b; Gains et al., 2006; Kim et al., 2004). Bax ist ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie, das eine wichtige Rolle in ausgereiften Neuronen des Zentralnervensystems spielt (van Delft and Huang, 2006; Yuan and Yankner, 2000). Es wird als einer der Hauptvermittler der durch oxidativen Stress induzierten Apoptose bei Hypoxie, Ischämie und Serumentzug angesehen (Saikumar et al., 1998; Crompton, 2000; Saikumar and Venkatachalam, 2003). Aktiviertes Bax wird an die mitochondriale Membran transloziert, erfährt eine Konformationsänderung und verändert so die mitochondriale Membranpermeabilität, was zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und zur Aktivierung einer apoptotischen Caspasekaskade über Caspase 9 und Caspase 3 führt (Abbildung 9) (Saikumar et al., 1998).

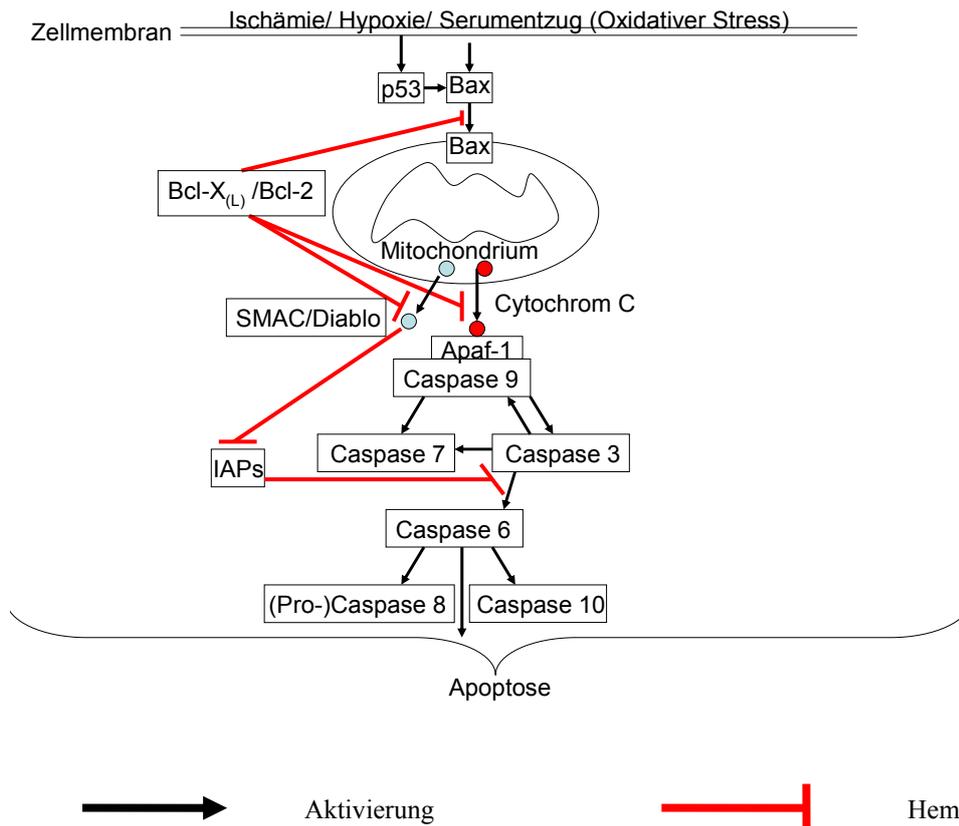


Abbildung 9: Durch Ischämie induzierter Apoptose-Signalweg über Bax, Cytochrom C und Caspase 9/3-Aktivierung. Dieser Apoptose-Signalweg kann durch die anti-apoptotischen Proteine Bcl-X_(L)/Bcl-2 gehemmt werden.

In humaner fetaler neuronaler Zellkultur löste eine Mikroinjektion eines für Bax-kodierenden Plasmids in circa 90 % der Neurone Apoptose aus. Durch Koinjektion eines für das Prionprotein kodierenden Plasmids konnte die Bax-induzierte Apoptoserate der kultivierten Neurone auf circa 10 % abgesenkt werden (Bounhar et al., 2001; Roucou et al., 2003). Außerdem konnte membranständiges Prionprotein neuronale Zellen aus Prnp-Knockout-Mäusen vor Bax-induzierter Apoptose unter Serumentzug schützen (Kuwahara et al., 1999; Sakudo et al., 2003b; Kim et al., 2004).

Roucou et al. zeigten, dass die Prionprotein-abhängige Cytoprotektion spezifisch für Bax-induzierte Apoptose war und das Prionprotein die Zelle nicht vor Bak-, t-Bid-, Staurosporine- oder Thapsigargin-vermittelter Apoptose zu schützen konnte (Roucou et al., 2005).

Bezüglich des Zusammenhangs zwischen der Prionprotein-Expression und dem Expressionslevel von Bax existieren mehrere Publikationen. Einerseits wurde kein Unterschied in der postischämischen Bax-Expression zwischen Prnp-Wildtyp- und Prnp-Knockout-Mäusen gefunden (Weise et al., 2006), andererseits wurde nach Serumentzug und

Staurosporin-induzierter Apoptose eine signifikant stärkere Bax-Expression in neuronalen Prnp-Knockout-Zellen als in neuronalen Prnp-Wildtyp-Zellen gefunden (Kim et al., 2004; Zhang et al., 2006b).

Möglicher Einfluss des Prionproteins auf p53

Auch die p53-Expression wurde in Zusammenhang mit dem Einfluss des Prionproteins auf die Bax-induzierte Apoptose untersucht. P53 wird bei DNA-Schädigung verstärkt exprimiert und kann ebenfalls eine Bax-induzierte Apoptose auslösen. Zur p53-Expression existieren unterschiedliche Publikationen. Einerseits zeigten neuronale Zellen aus Prnp-Knockout-Mäusen eine niedrigere p53-Expression als neuronale Zellen aus Prnp-Wildtyp-Mäusen (Paitel et al., 2004). Auch im Hirn von Prnp-Knockout-Mäusen fand sich eine niedrigere p53-Expression als im Hirn von Prnp-Wildtyp-Mäusen (Brown et al., 2002; Paitel et al., 2004). Im Gegensatz dazu zeigten neuronale Prnp-Knockout-Zellen in einem anderen Zellkultorexperiment eine stärkere p53-Expression als neuronale Prnp-Wildtyp-Zellen (Kim et al., 2004).

Möglicher Einfluss des Prionproteins auf die Caspase 3-Aktivität

Mehrfach wurde die Aktivität der Caspase 3, einer der Effektoren der Bax-induzierten Apoptose, in Zusammenhang mit dem Einfluss des Prionproteins auf den Ischämie-induzierten Zelltod untersucht. Nach Induktion von oxidativem Stress fand man eine erhöhte Caspase 3-Aktivität in ovariellen und neuronalen Prnp-Knockout-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen (Zhang et al., 2006b; Kang et al., 2007; Kim et al., 2004). Auch in vivo wurde 24 Stunden (Weise et al., 2006) beziehungsweise 72 Stunden (Spudich et al., 2005) postischämisch im Hirn von Prnp-Knockout-Mäusen eine höhere Caspase 3-Aktivität als im Hirn von Prnp-Wildtyp-Mäusen nachgewiesen.

Möglichkeiten der Hemmung Bax-induzierter Apoptose durch das Prionprotein

Auf welche Weise das Prionprotein dem Bax induzierten Zelltod entgegenwirkt, ist noch nicht geklärt. Zum einen könnte das GPI-geankerte Prionprotein über Interaktion mit einem Zelloberflächenrezeptor eine Signalkaskade auslösen, welche die Bax-Aktivität unterdrückt (Abbildung 10, A). Alternativ könnte cytosolisches Prionprotein direkt mit Bax in Wechselwirkung treten (B), was allerdings aufgrund des natürlicherweise nur in geringen Mengen vorkommenden cytosolischen Prionproteins eher unwahrscheinlich ist (Stewart and Harris, 2003). Auch ist es möglich, dass das Prionprotein oberhalb von Bax über bestimmte

Vorbehandlung neuronale Prionprotein-Knockout-Zellen ebenfalls vor durch Serumentzug induzierter Apoptose bewahren konnte. Dieser TNF- α induzierte Apoptoseschutz könnte auf einem signifikanten Anstieg der anti-apoptischen Proteine Bcl-x_(L) und Bcl-2 in den Prnp-Knockout-Zellen beruhen (Sakudo et al., 2003a). Auch Chen et al. brachten die Regulation der Bcl-2- und Bax-Expression mit der neuroprotektiven Funktion des Prionproteins in Zusammenhang (Chen et al., 2003b). Der Unterschied zwischen Prnp-Wildtyp- und Prnp-Knockout-Mäusen in Bezug auf ihre Bcl-2-Expression scheint allerdings nur marginal zu sein (Weise et al., 2006).

3.3.3. Der N-Terminus des Prionproteins und Neuroprotektion

Aufgrund verschiedener Studien wird aktuell diskutiert, welche Bedeutung der N-Terminus des Prionproteins, insbesondere seine Octapeptidrepeat-Region für den neuroprotektiven und anti-apoptischen Effekt des Prionproteins hat. So verloren kultivierte Zellen, bei denen die Oktapeptidrepeat-Region des Prionproteins deletiert worden war (PrP Δ oct), ihre neuroprotektive Funktion gegenüber durch Bax-, durch Serumentzug- oder durch Doppel-induzierter Apoptose (Bounhar et al., 2001; Drisaldi et al., 2004; Sakudo et al., 2005; Li and Harris, 2005). Weiterhin fand sich in PrP Δ oct-Zellen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress (Watt and Hooper, 2005). Auch in vivo zeigten Mäuse, bei denen der N-Terminus des Prionproteins deletiert worden war (PrP Δ 32-93 bzw. PrP Δ 23-88), eine verminderte Neuroprotektion gegenüber Doppel- oder Ischämie-induzierter Hirnschädigung (Atarashi et al., 2003; Mitteregger et al., 2007). Die Wirkung des N-Terminus könnte dabei von Bedeutung für die oben erwähnte Bax-induzierte Apoptose sein: Eine Bcl-2-Überexpression konnte Mäuse, welche ein N-terminal deletiertes Prionprotein exprimierten, vor cerebellärer Apoptose und Neurodegeneration schützen. Bcl-2-Überexpression verminderte hierbei die Aktivierung der Caspase 3 (Nicolas et al., 2007).

3.3.4. Zellproliferationsfördernde und neuroprotektive Signalwege, die möglicherweise durch das Prionprotein beeinflusst werden

3.3.4.1. Potentielle Interaktionspartner des Prionproteins

Auf der Suche nach einem Prionproteinsignalweg sind potentielle Interaktionspartner von großem Interesse. Unter Verwendung von Methoden wie Antikörper vermittelter Quervernetzung, Immunopräzipitation oder Yeast two-hybrid-System konnten mehrere potentielle Bindungs- beziehungsweise Interaktionspartner des Prionproteins identifiziert werden (Tabelle 1): Grb2 (Spielhauer and Schatzl, 2001), Pint1 (Spielhauer and Schatzl,

2001), Synapsin 1b (Spielhauer and Schatzl, 2001), Tubulin (Nieznanski et al., 2005), der zwei-porige Kaliumkanal TREK-1 (Azzalin et al., 2006), das pro-apoptotische Protein NRAGE (Neurotrophin-Receptor-Interacting) (Bragason and Palsdottir, 2005), das anti-apoptotische Protein Bcl-2 (Kurschner and Morgan, 1995), das Chaperon Hsp60 (Edenhofer et al., 1996), Laminin (Graner et al., 2000b; Graner et al., 2000a), der Lamininrezeptor (Gauczynski et al., 2001), Caveolin 1 (Mouillet-Richard et al., 2000), das Zelladhäsionsmolekül N-CAM (Schmitt-Ulms et al., 2001) und das anti-apoptotische Protein STI-1 (Stress-Inducible-Protein 1) (Zanata et al., 2002). Jedoch bleibt die physiologische Relevanz einiger vorgeschlagener Interaktionspartner unklar, da viele von ihnen ausschließlich im Zytosol lokalisiert sind und sich das Prionprotein hauptsächlich auf der Zelloberfläche befindet (Westergard et al., 2007).

Candidate interactor	Candidate function	Identification method	Localization
Grb2	Signal transduction (adaptor protein)	Yeast two-hybrid; co-immunoprecipitation	Cytoplasm
Pint1	Unknown	Yeast two-hybrid; co-immunoprecipitation	Cytoplasm
Synapsin 1b	Synaptic vesicle trafficking	Yeast two-hybrid; co-immunoprecipitation	Cytoplasm (synaptic vesicles)
TREK-1	Two-pore K ⁺ channel	Yeast two-hybrid; co-immunoprecipitation	Plasma membrane (transmembrane)
Tubulin	Microtubule subunit	Cross-linking	Cytoplasm (cytoskeleton)
NRAGE (Neurotrophin receptor-interacting MAGE homologue)	Activator of apoptosis	Yeast two-hybrid; co-immunoprecipitation	Cytoplasm
Laminin receptor precursor (LRP)	Extracellular matrix interactions	Yeast two-hybrid	Cytoplasm; Plasma membrane?
STI-1 (stress-inducible protein 1)	Heat shock protein	Complementary hydrophathy; co-immunoprecipitation	Cytoplasm; Plasma membrane?
Hsp60	Chaperone	Yeast two-hybrid	Cytoplasm
N-CAM	Cell adhesion	Cross-linking	Plasma membrane (transmembrane and GPI-anchored forms)
Bcl-2	Multi-domain anti-apoptotic regulator	Yeast two-hybrid	Cytoplasm (mitochondria, ER)
Caveolin-1	Caveolar coat	Co-immunoprecipitation	Plasma membrane (hairpin loop)

Tabelle 1: Potentielle Interaktionspartner mit dem Prionprotein (Westergard et al., 2007)

Aufgrund seiner Lokalisation an der Zelloberfläche nimmt man an, dass das Prionprotein an transmembranen Signalprozessen beteiligt sein könnte.

Im Folgenden wird auf die wichtigsten potentiellen Interaktionspartner mit dem Prionprotein sowie die jeweils involvierten Signaltransduktionswege, die das neuronale Wachstum und Überleben begünstigen könnten, eingegangen.

3.3.4.2. Laminin und Lamininrezeptor

Es wurde unter anderem eine Interaktion des Prionproteins mit Laminin beschrieben, welche das neuronale Wachstum in PC12 Zellen und hippocampalen Neuronen förderte (Graner et

al., 2000a). Laserinaktivierung des Prionproteins führte zur Störung der durch Laminin induzierten Zelldifferenzierung und förderte den Rückzug von Neuronen (Graner et al., 2000b).

Ein weiteres Zelloberflächenprotein, mit dem das Prionprotein interagieren könnte, ist der Lamininrezeptor, der ursprünglich im Yeast two-hybrid Modell identifiziert wurde und von dem angenommen wird, dass er als endocytotischer Rezeptor für die zelluläre Aufnahme des Prionproteins fungieren könnte (Gauczynski et al., 2001; Rieger et al., 1997).

3.3.4.3. Antikörper-vermittelte Quervernetzung des Prioproteins, Clustering, Caveolin-1, Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn, ERK1/2 und N-CAM

Wie andere GPI-geankerte Proteine, befindet sich das Prionprotein in Lipid-Raft-Domänen, die als molekulares Grundgerüst für viele Signalübertragungswege dienen (siehe auch A Einleitung, 2.4. Zelluläre Lokalisation des Prionproteins) (Tsui-Pierchala et al., 2002; Taylor and Hooper, 2006; Simons and Eehalt, 2002).

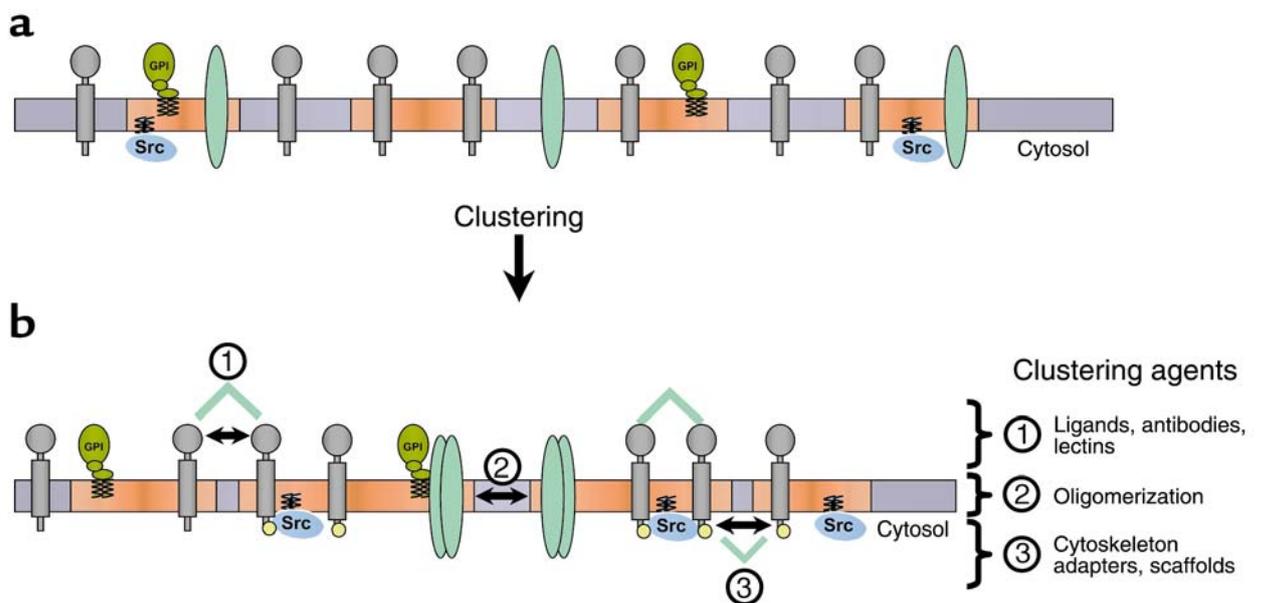


Abbildung 11: Clustering-Mechanismus von Lipid-Raft-Domänen (orange) (Simons and Eehalt, 2002)

Die durch das Prionprotein induzierten Proteininteraktionen und Signalübertragungswege können möglicherweise durch Antikörper-vermittelte Quervernetzung des Prionproteins stimuliert werden.

Von Mouillet-Richard konnte im Zellkulturexperiment an einer neuroektodermalen Zelllinie (1C11) gezeigt werden, dass eine Antikörper-vermittelte Quervernetzung des Prionproteins

(„Clustering“) zu einer Caveolin-1 abhängigen Kopplung des Prionproteins an die Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn führte (Mouillet-Richard et al., 2000). In anschließenden Versuchen wurde gezeigt, dass die Antikörper-vermittelte Fyn-Aktivierung eine NADPH-Oxidase abhängige ROS-Produktion sowie die Aktivierung der Extrazellulär Regulierten Kinasen (ERK1/2) zur Folge hatte (Schneider et al., 2003). Auch die Aktivität mehrerer G-Protein gekoppelter Serotonin Rezeptoren auf der Oberfläche von 1C11 Zellen wurde durch Prionprotein-Quervernetzung verändert (Mouillet-Richard et al., 2005). Es wurde postuliert, dass die Signalwege, die durch Anti-Prionprotein-Antikörper in 1C11 Zellen beeinflusst wurden, einen neuroprotektiven Effekt hätten (Mouillet-Richard et al., 2000).

Monnet et al. stellten als Folge der Anti-Prionprotein-Antikörper-vermittelten Quervernetzung auch eine ERK1/2-Phosphorylierung und -Aktivierung sowie zusätzlich eine Phosphorylierung des Mikrotubuli destabilisierenden Proteins OP18/Stathmin fest (Monnet et al., 2004).

Des Weiteren wurde beschrieben, dass eine Quervernetzung des Prionproteins in Jurkat- und T-Zellen die Assoziation des Prionproteins mit den intrazellulären Raft-Proteinen Reggie-1 und Reggie-2 bewirkte. Dies führte wiederum zur Rekrutierung von Thy-1, TCR/CD3, LAT (linker of activated T-cells) und der Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinasen Fyn und Lck in die Lipid-Rafts, einhergehend mit lokaler Tyrosin-Phosphorylierung und F-Aktin-Polymerisierung sowie einer verstärkten Phosphorylierung von ERK1/2. Begleitet wurden diese Vorgänge von einem kurzen intrazellulären Calciumanstieg (Stuermer et al., 2004).

Außerdem stimulierte die Antikörper vermittelte Quervernetzung des Prionproteins in hippocampaler Zellkultur eine Interaktion des Prionproteins mit dem Zelladhäsionsmolekül „neural cell adhesion molecule“ (N-CAM) (Schmitt-Ulms et al., 2001). Diese Interaktion bewirkte eine Rekrutierung von N-CAM in die Lipid-Raft-Region, dabei eine Aktivierung der Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn und eine Verstärkung des Neuronenwachstums (Santuccione et al., 2005).

Ferner konnte ein intrazellulärer Calciumanstieg in Prionprotein-exprimierenden neuronalen Primärzellkulturen als Folge von oxidativem Stress beobachtet werden. Da dieser sowohl in Prnp-Knockout- als auch in Fyn-Knockout-Neuronen gleichermaßen alteriert war, liegt auch hier die Vermutung eines gemeinsamen Signalweges nahe (Krebs et al., 2007).

Zusammenfassend stellten mehrere Arbeitsgruppen einen Zusammenhang zwischen einem „Clustering“ des zellmembranständigen Prionproteins und einer Aktivierung der Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn her. Downstream-Signalwege der Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn sind daher von großem Interesse für eine potentielle neuroprotektive Wirkung des Prionproteins.

Neben positiven Effekten auf Wachstum und Überleben der Zelle wurde andererseits beschrieben, dass durch Anti-Prionprotein-Antikörper-vermittelte Quervernetzung in vivo Apoptose in hippocampalen und cerebellären Neuronen ausgelöst werden konnte (Solforosi et al., 2004). Es ist allerdings kritisch anzumerken, dass hierbei die Prionprotein-bindenden Antikörper murinen Ursprungs waren und daher in den verwendeten Mäusen eine allgemeine Antikörper-vermittelte lokale Entzündungsreaktion ausgelöst haben könnten, die für den Neuronenverlust verantwortlich gemacht werden könnte

Downstream der Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn findet sich unter anderem die extracellular regulated kinase „ERK“. Tatsächlich wurde bei einigen oben zitierten Studien zellkulturell auch eine Aktivierung der ERK1/2 beschrieben. Allerdings ist die ERK1/2 als „Keyplayer“ von extrazellulär vermittelten Signalen durch etliche andere Signalwege stimulierbar. Daher ist es nicht verwunderlich, dass z.B. Spudich et al. drei Stunden postischämisch im Hirnlysat von Prnp-Knockout-Mäusen eine signifikant höhere ERK1/2-Aktivität als im Hirn von Prnp-Wildtyp-Mäusen feststellten (Spudich et al., 2005). Auch wurde publiziert, dass eine Inhibierung des ERK1/2-Signalweges den neuroprotektiven Effekt des Prionproteins nicht aufheben konnte (Chiarini et al., 2002).

Dennoch belegen Versuche mit Prnp-Knockout-Mäusen, die eine N-terminal deletierte Form des Prionproteins exprimierten und eine erhöhte ERK1/2-Aktivität aufwiesen, erneut den Zusammenhang mit dem Prionprotein (Nicolas et al., 2007). Es besteht daher ein großer Erklärungsbedarf der ERK-Aktivierung in Zusammenhang mit der Prionproteinexpression. In diesem Zusammenhang könnte auch die gefundene höhere STAT-1- und JNK-Aktivität 24 Stunden beziehungsweise 72 Stunden nach Ischämie in Prnp-Knockout-Mäusen, verglichen mit den Prnp-Wildtyp-Mäusen, bedeutungsvoll sein (Spudich et al., 2005).

3.3.4.4. STI-1, c-AMP/Proteinkinase A, PI3-Kinase/Akt

Durch Co-Immunopräzipitation wurde das Hitzeschockprotein „Stress-Inducible-Protein-1“ (STI-1) als ein potentieller Interaktionspartner mit dem Prionprotein in der Plasmamembran

gefunden (Zanata et al., 2002). STI-1 schien die Zellen retinaler Explantate durch Bindung an das Prionprotein über einen c-AMP/ PKA-Signalweg vor Anisomycin-induzierter Apoptose zu schützen (Zanata et al., 2002; Chiarini et al., 2002). Eine neuere Untersuchung zeigte, dass die Inkubation hippocampaler Neurone mit STI-1 das neuronale Wachstum über den ERK-Signalweg förderte (Lopes et al., 2005).

Andere Forschungsergebnisse legten eine potentielle Bedeutung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs für den neuroprotektiven Effekt des Prionproteins nahe (Vassallo et al., 2005; Weise et al., 2006). Der PI3-Kinase/Akt-Signalweg führt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zur Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-x_L, Bcl-2 und IAP (Inhibitor of Apoptotic Proteins), welche die Bax-induzierte Apoptose hemmen (He et al., 2003; Yamaguchi and Wang, 2002).

Zudem übt PI3-Kinase/Akt einen kurzfristigen transkriptionsunabhängigen Effekt über die Phosphorylierung und Inaktivierung pro-apoptotischer Proteine aus (Brunet et al., 2001).

Bei einer Untersuchung der PI3-Kinase/Akt-Aktivität an kultivierten Neuroblastomazellen und murinen hippocampalen Neuronen zeigten Prionprotein-exprimierende Zellen signifikant höhere PI3-Kinase-Aktivitätslevel als die Prnp-Knockout-Zellen. Außerdem konnte in Hirnlysaten von Prnp-Wildtyp-Mäusen eine signifikant stärkere Aktivität der PI3-Kinase als in Hirnlysaten von Prnp-Knockout-Mäusen nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Rekrutierung der PI3-Kinase zum neuronalen Überleben unter oxidativem Stress beitrug (Vassallo et al., 2005). In einer anderen Studie fand sich in Prnp-Knockout-Maushirnen vor und nach Ischämie eine signifikante Verminderung der aktivierten phosphorylierten Akt im Vergleich zu Prnp-Wildtyp-Maushirnen, was nahelegte, dass das Prionprotein die PI3-Kinase/Akt-abhängige Neuroprotektion förderte (Weise et al., 2006). Die Gesamtexpression von Akt unterschied sich jedoch nicht zwischen Prnp-Wildtyp-Mäusen und Prnp-Knockout-Mäusen (Weise et al., 2006).

In neuronaler Zellkultur begünstigte das Prionprotein sowohl das neuronale Wachstum als auch das neuronale Überleben, einhergehend mit der Aktivierung aller bisher in Zusammenhang mit dem Prionprotein beschriebenen Signalwege. Zusammenfassend zählen hierzu im Wesentlichen eine Aktivierung der Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn (p59), der Proteinkinase C (PKC), der c-AMP abhängigen Proteinkinase A (c-AMP/PKA), der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK1/2) und des PI3-Kinase/Akt-Signalweges (Chen et al., 2003b).

4. Zielsetzung

Ziel dieser Doktorarbeit war es, Hinweise für den molekularen Mechanismus der neuroprotektiven Funktion des Prionproteins zu erhalten. Da die Neuroprotektion des Prionproteins insbesondere unter oxidativem Stress wie bei transienter Ischämie, Hypoxie, Epilepsie und Serumentzug zum Tragen kam, wurde hier das Modell einer transienten Ischämie mit anschließender Reperfusion gewählt. Die kurze Ischämie und lange Reperfusion rufen größere Schäden und vor allem in höherem Maße Apoptose hervor als eine lange permanente Ischämie mit überwiegender Nekrose (Vosko et al., 2006). Im Detail wurden am Modell der transienten einstündigen Okklusion der Arteria cerebri media (Vosko et al., 2006) mit 24-stündiger (Histologie) bzw. 4-stündiger Reperfusion (Protein-Microarrays) folgende Fragestellungen untersucht:

- Welche Hirnregionen profitieren besonders stark vom neuroprotektiven Effekt des Prionproteins? In welchen Hirnregionen existieren die größten Unterschiede der Infarkt volumina zwischen Prnp-Knockout- und Prnp-Wildtyp-Mäusen?
- Welche molekularen neuroprotektiven Signalwege und Mechanismen werden in Gegenwart des Prionproteins vor und nach transienter cerebraler Ischämie aktiviert?

Dem Prionprotein wird Einfluss auf neuronale Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung, synaptische Erregungsübertragung und Signaltransduktion zugeschrieben. Die bislang vielfältig beschriebenen Veränderungen, vor allem aber deren Beeinflussung untereinander, erforderten die gleichzeitige Untersuchung mehrerer relevanter Proteine. Daher wurden Gehirne von Prnp-Wildtyp-(Prnp^{+/+}-)Shammäusen und Prnp-Knockout-(Prnp^{-/-}-)Shammäusen sowie Gehirne von Prnp^{+/+}-Mäusen und Prnp^{-/-}-Mäusen nach transienter Ischämie in Protein-Microarrays untersucht, auf denen sich Antikörper gegen 224 verschiedene Proteine aus den Bereichen Apoptose, Zellzyklus, Zytoskelett, Neurobiologie und Signaltransduktion befanden. Da viele dieser Proteine nur über kurze Zeit aktiviert werden (vor allem diejenigen der extrazellulär vermittelten Signaltransduktionen), wurde für die Untersuchung eine einstündige Ischämie mit verkürzter 4-stündiger Reperusionszeit gewählt. Der Vergleich umfasste jeweils Prnp^{+/+}- mit Prnp^{-/-}-Tieren, sowie Ischämie- mit Sham-operierten Kontrolltieren (insgesamt 4 Gruppen).

B. Material und Methodik

Unter G. Anhang werden die Bestandteile der verwendeten Puffer und Lösungen entsprechend jedem Textabschnitt aufgelistet.

1. Mäuse

Die Tierexperimente wurden gemäß Tierschutzstandards durchgeführt und von der oberbayerischen Regierung genehmigt (Protokoll-Nummer: 209.1-2531-81/01). Es wurden alle Bemühungen unternommen, die Zahl verwendeter Tiere zu reduzieren und sicherzustellen, dass sie frei von Schmerzen waren.

1.1. Tierzucht

Die Prnp-Knock-out-(Prnp^{-/-})Mäuse der Linie „Zürich I“ (Weissmann and Flechsig, 2003) wurden mit Wildtyp-(Prnp^{+/+})Mäusen mit 129/Sv-C57/Bl6 Hintergrund gekreuzt. Die Prnp^{+/-}-Rekombinanten wurden zur Züchtung der für die Versuche benötigten männlichen Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Littermates verwendet. Alle Mäuse wurden standardgemäß mittels PCR genotypisiert (Shmerling et al., 1998).

1.2. Tierhaltung

Zur Sicherstellung eines hohen Hygiene-Standards waren die Tierhaltungsräume überdruckbelüftet und über ein geschlossenes Schleusensystem zu betreten. Die Mäuse wurden unter standardisierten diurnalen Bedingungen bei 21 °C in THKB-M2V-M Polysulfonkäfigen Typ MII gehalten. Für den Versuch wurden nur männliche Tiere verwendet, die in Gruppengrößen von maximal 5 Tieren pro Käfig gehalten wurden.

1.3. Murines Infarktmodell

Für die Untersuchungen wurde ein Infarktmodell mit kleiner Primär- und großer Sekundärläsion gewählt, um die vermuteten anti-apoptotischen, neuroprotektiven Effekte des Prionproteins, die vornehmlich in der Penumbra des Infarkts zu erwarten sind, möglichst gut studieren zu können. Dies wurde durch eine transiente Ischämie der A. cerebri media mit anschließender Reperfusion erreicht. Die Tierversuche erfolgten in Zusammenarbeit mit der Neurologischen Klinik, Arbeitsgruppe M. Vosko. Die Okklusion der rechten A. cerebri media wurde über einen in die rechte A. carotis communis operativ eingebrachten intraluminalen Faden erzeugt, der durch Vorschub in die A. cerebri media gelangte (Vosko et al., 2006). Die

Reperfusion wurde nach einstündiger Ischämie durch Zurückziehen des Fadens initiiert. Nach der Reperfusionsperiode wurden die Tiere getötet.

Operatives Procedere

Die Narkose wurde mit 3 % Isofluran eingeleitet und mit 1,5 % Isofluran und 70 % Lachgas aufrechterhalten. Die Körpertemperatur wurde über rektale Messung und eine Wärmematte konstant gehalten (37 ± 0.5 °C). Der regionale cerebrale Blutfluss (rCBF) von allen Tieren wurde mit Hilfe von Laser Doppler Flussmessung (Perimed, Järfäla, Schweden) aufgezeichnet, indem ein fiberoptisches Laser-Endoskop über dem Versorgungsgebiet der A. cerebri media 2 mm posterior und 2 mm lateral des Bregmas platziert wurde (Hata et al., 1998). Unter Schonung des N. vagus wurde nun die A. carotis communis auf Höhe ihrer Bifurkation in die A. carotis interna und externa durch einen ventralen medianen Hautschnitt freigelegt. Unter kurzzeitigem Abklemmen der A. carotis communis wurde diese eröffnet und ein Nylonfaden (je nach Gewicht des Tieres mit einem Durchmesser von 0,08 – 0,26 mm) mit Silikonbeschichtung (Ethicon, Johnson&Johnson, Norderstedt, Belgium) anterograd in die A. carotis interna (ab Bifurkation etwa 9 mm) vorgeschoben, um auf diese Weise die A. cerebri media zu verschließen. Die Werte des basalen rCBF reduzierten sich um über 70 %. Nach Ablauf einer einstündigen cerebralen Ischämieperiode wurde der Nylonfaden zurückgezogen, was die Rekanalisation des Media-Stromgebietes initiierte. Die Wundfläche wurde mittels Gewebekleber verschlossen. Am Ende einer 24-stündigen (Histologie) bzw. einer 4-stündigen (Protein-Microarrays) Reperfusionsphase wurden die Tiere unter tiefer Narkose durch intrakardiale Perfusion mit kalter isotoner Salzlösung [bovines Serumalbumin (5 g/l), Heparin (10 IE/l), 2 ml Nitroprussid-Natrium-Lösung (100 µl, 18 mg in 10 ml Saline)] getötet. Anschließend wurden die Hirne entnommen und für die spätere Aufarbeitung bei -80°C tiefgefroren.

Die Shamtiere wurden den gleichen Operationsbedingungen unterzogen, außer, dass in diesen Mäusen der Faden nicht über die A. carotis communis hinaus vorgeschoben wurde. Dadurch wurde keine cerebrale Ischämie induziert.

1.4. Verwendete Tiere

1.4.1. Histologie

Für die histologischen Beurteilungen wurden folgende Tiere verwendet:

Gruppe:	Genotyp:	Zustand:	Anzahl (N):
A	Prnp ^{+/+}	Ischämie	12
B	Prnp ^{-/-}	Ischämie	7

Tabelle 2: Littermates, Gewicht bei ihrer Tötung: 25-35 g, Alter bei ihrer Tötung: 2 Monate

1.4.2. Protein-Microarrays und Westernblots

Für die Protein-Microarrays und Westernblots wurden folgende Tiere verwendet:

Gruppen:	Genotyp:	Zustand:	Anzahl N (ohne Kleinhirn):
A	Prnp ^{+/+}	Ischämie	5 (A1-A5)
B	Prnp ^{+/+}	Sham	5 (B1-B5)
C	Prnp ^{-/-}	Ischämie	5 (C1-C5)
D	Prnp ^{-/-}	Sham	5 (D1-D5)

Tabelle 3: Littermates, Gewicht bei ihrer Tötung: 25-35 g, Alter bei ihrer Tötung: 1,5 bis 2,5 Monate

Für die Westernblotanalysen wurden die kontralateralen Hirnhemisphären der Prnp^{+/+}-Shammäuse und Prnp^{-/-}-Shammäuse verwendet, deren ipsilaterale Hemisphären für die Protein-Microarrays verwendet worden waren.

2. Histologische Methoden

2.1. Material

Die verwendeten Lösungen sind im Anhang tabellarisch aufgelistet (G. Anhang, 1.1. Histologie: Lösungen).

2.2. Methodik

2.2.1. Anfertigung von Kryoschnitten

Die tiefgefrorenen Hirne wurden mittels Tissue-Tek® (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) auf dem Kryotom (HM 360, Microm, Deutschland) befestigt. Entsprechend der Schnittstufen des Schneideprotokolls (G. Anhang, 2. Schneideprotokoll Maushirn für) wurden 10 µm bzw. 20 µm dicke koronare Kryoschnitte bei RT auf die Objektträger aufgezogen. Jeder 50. Schnitt wurde für die volumetrische Analyse gesammelt. Festgelegte Abschnitte unterschiedlicher Dicke (10 µm bis maximal 480 µm) zwischen verschiedenen Schnittstufen eines Hirns

wurden verworfen (G. Anhang, 2. Schneideprotokoll Maushirn für Histologie). Die übrigen Schnitte wurden für immunhistochemische Färbungen und Gewebeanalysen verwendet. Die Schnittstufen E 1/5 A-D und E 1/8 A-D (siehe Schneideprotokoll) wurden für die histologischen Untersuchungen in dieser Arbeit herangezogen.

Bis zur Färbung wurden die Kryoschnitte bei -80 °C gelagert.

2.2.2. Fixierung und Rehydrierung von Kryoschnitten

Um eine Kondenswasserbildung beim Auftauen der Schnitte und daraus folgende Gewebeerflüssigung und -ablösung vom Objektträger zu vermeiden, wurden die Kryoschnitte vor der Färbung fixiert.

Hierzu wurden die Kryoschnitte direkt aus -80 °C in -20 °C kaltem 100 %igem Ethanol dehydriert und anschließend bei 4 °C in 4 %igem Paraformaldehyd (PFA-Fixierlösung) über Nacht fixiert. Die weitere Behandlung am folgenden Tag erfolgte im Kühlschrank bei 2 °C bzw. auf Eis. Die Objektträger wurden dreimal je 20 Minuten in eisgekühltem (2 °C) PBS pH 7,3 gespült, anschließend 30 Minuten lang in gekühltes (2 °C) 100 %iges Ethanol gegeben und danach 30 Minuten bei RT luftgetrocknet.

Dann wurden die Kryoschnitte unmittelbar vor der Färbung bei RT zunächst 10 Minuten lang in 70 %igem Ethanol rehydriert, anschließend mit Aqua dest. gespült und danach zweimal je 10 Minuten in PBS pH 7,3 gewaschen.

2.2.3. Nissl-Färbung

Die Nisslfärbung wurde gewählt, um insbesondere die Veränderung der empfindlichen Neurone im Rahmen der Apoptose und Nekrose darzustellen (Pyknose, Karyorhexis und Veränderungen der Proteinsynthese). Die Nissl-Färbung, die nach Doktor Franz Nissl benannt wurde, ist eine histologische Färbemethode, die besonders Kerne und die sogenannte Nissl-Substanz anfärbt. Der histologische Schnitt wird hierbei mit einem Farbstoff wie Cresylviolett, Toluidinblau oder Thionin versetzt. Diese Farbstoffe binden an basophile Verbindungen wie DNA, RNA und Ribosomen und färben diese blau oder violett. Dadurch stellt sich die DNA und RNA des Zellkerns dar. Zudem wird auch das Endoplasmatische Retikulum, welches viele Ribosomen enthält, angefärbt („Nissl-Schollen“).

Die Nissl-Färbung in dieser Arbeit wurde wie folgt durchgeführt:

Die tiefgefrorenen Schnitte wurden in 70 %igem Ethanol „prä-inkubiert“. Danach wurden die Kryoschnitte 5 Minuten lang in Cresylviolett gefärbt und anschließend kurz mit Aqua dest. gespült. Es folgte nun die Kern-Differenzierung in aufsteigender Alkoholreihe und Eisessig: 1.) 96 %iges Ethanol, 2.) 100 %iges Ethanol (80 ml) + 8 Tropfen von 100 %igem

Eisessig (etwa 300 µl entsprechend), 3.) 100 %iges Ethanol. Die Dauer der Differenzierungsschritte, je etwa 5 Minuten, wurde so gewählt, dass neben der Anfärbung der Zellkerne und basophilen Verbindungen ein möglichst schwacher Hintergrund zur bestmöglichen Differenzierung apoptotischer, nekrotischer und intakter Hirnareale erreicht wurde. Das Stoppen der Färbung erfolgte in Isopropanol.

Zum Schluß wurden die Schnitte in Xylol fixiert und mit dem Eindeckmedium Coverquick (Labornord, Mönchen-Gladbach, Deutschland) eingedeckelt.

2.2.4. PrP^C-Färbung

Nach Fixierung und Rehydrierung der Kryoschnitte, wie unter 2.2.2. Fixierung und Rehydrierung von Kryoschnitten beschrieben, wurde die immunhistochemische Färbung von PrP^C nach Entwicklung der Färbung per Hand auf dem Immunhistochemie-Färbeautomaten (Ventana BenchMark, Strassburg, Frankreich) wie folgt durchgeführt:

1. Antigen-Retrieval-Schritt [Andau des Gewebes mit Protease 1 (Ventana, Strassburg, Frankreich)]
2. 15-minütiges Blocken unspezifischer Bindungen durch 0,05 %iges Casein (I-Block™, Tropix, Bedford, MA, USA) bei 37 °C
3. 2 x Waschen
4. 32-minütige Inkubation bei 37 °C mit dem Primärantikörper (100 µl), der gegen PrP^C gerichtet ist [CDC1 Kaninchen-Anti-Maus, gerichtet gegen rekombinantes Volllänge-Maus-Prionprotein, Aminosäuren 23-231 (Eigenproduktion), Verdünnung 1 : 500 in Antibody Dilutant (Ventana, Strassburg, Frankreich)]
5. Waschen
6. Detektion des Primärantikörpers durch 32-minütige Inkubation bei 37 °C mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (100 µl), der gegen den Primärantikörper gerichtet ist und Streptavidin binden kann [polyklonaler Sekundärantikörper Schwein-Anti-Kaninchen (DAKO, Hamburg, Deutschland), Verdünnung 1 : 150 in Antibody Dilutant (Ventana, Strassburg, Frankreich)]
7. Waschen
8. 12-minütige Inkubation bei 37 °C mit 100 µl an Alkalische Phosphatase gekoppeltem Streptavidin (Verstärkung) [Enhanced SA-AP/Ventana-Reagenz (Ventana, Strassburg, Frankreich)]
9. Waschen

10. 4-minütige Inkubation bei 37 °C mit 100 µl Enhanced Enhancer/Ventana Reagenz (Ventana, Strassburg, Frankreich) und 100 µl Enhanced Naphthol (Ventana, Strassburg, Frankreich)
11. Entwicklung mit dem Chromogen Fast Red, welches durch die Aktivität der Alkalischen Phosphatase als roter Farbstoff ausfällt (Absorption: 488 nm, Emission: 562 nm) [8-minütige Inkubation bei 37 °C mit 100 µl Enhanced Fast Red A (Ventana, Strassburg, Frankreich), anschließend 8-minütige Inkubation bei 37 °C mit 100 µl Enhanced Fast Red B (Ventana, Strassburg, Frankreich)]
12. 2 x Waschen
13. Gegenfärbung mit Hämalaun und DAPI
14. Dehydrierung der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70 %, Ethanol 96 %, 5 Minuten Ethanol 100 %)
15. Fixierung in Xylol und Eindeckeln in Coverquick (Labornord, Mönchen-Gladbach, Deutschland)

2.2.5. β -Aktin-Färbung

Die immunhistochemische Färbung von β -Aktin wurde ebenfalls auf dem Immunhistochemie-Färbeautomaten (Ventana BenchMark, Strassburg, Frankreich) durchgeführt. Bis auf die Verwendung eines anderen Primärantikörpers (Polyklonaler Anti- β -Aktin-Antikörper, Aktin I-19, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland, Verdünnung 1 : 500 in Antibody-Dilutant) und Weglassen des Antigen-Retrieval-Schrittes zu Beginn der Färbung, erfolgte die β -Aktin-Färbung in identischer Weise wie die PrP^C-Färbung.

2.2.6. Aufnahme mikroskopischer Bilder und Auswertung

Die histologischen Kryoschnitte wurden mit einer auf dem Mikroskop (Axiovert 200 M, Carl Zeiss AG, Deutschland) installierten CCD-Kamera (Axiocam MRc5, Carl Zeiss AG, Deutschland) digital fotografiert.

Zur Bestimmung der vom Infarkt betroffenen prozentualen Anteile verschiedener Hirnregionen auf den fotografierten Maushirnkryoschnitten wurde die Software analySIS® (Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland) benutzt.

Es wurden die vom Infarkt betroffenen prozentualen Anteile folgender Hirnareale zwischen der Prnp^{+/+}-Ischämieausgruppe (N = 12) und der Prnp^{-/-}-Ischämieausgruppe (N = 7) statistisch miteinander verglichen: Basalganglien (Striatum plus Pallidum), motorischer Kortex, somatosensorischer Kortex, insulärer Kortex, piriformer Kortex, cingulärer Kortex, peri- und ektorhinaler Kortex, Hippocampus und paraventriculäre thalamische Nuklei.

2.2.7. Volumetrie

Eine ausführliche Darstellung des Schneideprotokolls mit den für die Volumetrie benutzten Schnitten findet sich im Anhang (G. Anhang, 2. Schneideprotokoll Maushirn für). Die Schnitte wurden nach Nissl gefärbt, um das vom Infarkt betroffene Gewebe zu identifizieren (schwache Färbung mit Kern-Differenzierung), und mit einem Flachscanner (Epson, Meerbusch, Deutschland) digitalisiert.

Mit Hilfe von Optimas Imaging Software wurden die Flächen der Läsion und der Hemisphären metrisch berechnet.

Die Läsionsvolumina bzw. die Hemisphärenvolumina in beiden Mausgruppen wurden durch Summieren der markierten Infarktflächen bzw. der Hemisphärenflächen in 500 µm Schritten nach folgender Formel berechnet (Riechkolben bis Okzipitalpol mit Kleinhirn, zentriert auf Bregma mit 0 mm):

$$V_{ges} = \sum_{x=-2,5}^{7mm} Area * |dx|$$

Zur Determinierung signifikanter Unterschiede zwischen den beiden Mausgruppen in Bezug auf die Infarktolumina der untersuchten Regionen wurde der parametrische t-Test für unabhängige Stichproben und ungleiche Varianzen verwendet. Alle p-Werte waren zweiseitig. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant, p-Werte $\leq 0,1$ als Trend festgelegt.

3. Antikörper(Protein)-Microarrays

3.1. Material

3.1.1. Komponenten des Kits

Es wurden Protein-Microarrays (Panorama™ Antibody Microarray - Cell Signaling) der Firma Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Im Kit enthalten waren weiterhin entsprechende Lösungen zur Proteinaufbereitung, Antikörper-Inkubation und späteren Färbung (siehe unten).

Die Reagenzien wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet und gelagert (Produktinformation, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland).

Die Lösungen des Kits sind im Anhang tabellarisch aufgelistet (G. Anhang, 1.2.1. Lösungen).

3.1.2. Antikörper auf einem Microarray

Alle Antikörper auf einem Microarray stammen von der Firma Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland und sind spezifisch gegen folgende Proteine gerichtet (Tabelle 4):

Antikörper	Gebiet	P/M
Apoptosis Inducing Factor (AIF)	Apoptose	P
ARTS Clone: ARTS-51	Apoptose	M
Bcl-x	Apoptose	P
Bcl-xL Clone: 2H12	Apoptose	M
Caspase 3	Apoptose	P
Bcl-10	Apoptose	P
Caspase 3 – Active	Apoptose	P
Caspase 4	Apoptose	P
Caspase 4 Clone: CAS4	Apoptose	M
Caspase 5 Clone: CAS5	Apoptose	M
Caspase 6	Apoptose	P
Caspase 7	Apoptose	P
Caspase 8; Clone: CAS8	Apoptose	M
Caspase 8	Apoptose	P
Procaspase 8	Apoptose	P
Caspase 9 Clone: CAS9	Apoptose	M
Caspase 10	Apoptose	P
Caspase 10 Clone: 25C2	Apoptose	M
Caspase 11	Apoptose	M
Caspase 12 Clone: 14F7	Apoptose	M
Cathepsin D Clone: CTD-19	Apoptose	M
Cystatin A Clone: WR-23/2/3/3	Apoptose	M
DAXX	Apoptose	P
DAP-Kinase Clone: DAPK-55	Apoptose	M
Phospho-DAPK (pS ³⁰⁸) Clone: DAPKS308	Apoptose	P
GADD 153 (CHOP-10)	Apoptose	P
PAR4 (Prostate Apoptosis Response 4)	Apoptose	P
Phosphatidylserine Receptor (PSR)	Apoptose	P
SMAC/DIABLO	Apoptose	P
c-Abl Clone:ABL-148	Zellzyklus	M
Cdc25 Clone: DCS-193	Zellzyklus	M
Cdc27 Clone: AF3.1	Zellzyklus	M
CDC6 Clone: DCS-180	Zellzyklus	M
Cdh1 Clone: DCS-266	Zellzyklus	M
Cdk4 Clone: DCS-31	Zellzyklus	M
Cdk6 Clone: DCS-90	Zellzyklus	M
Cdk-7/cak Clone: MO-1.1	Zellzyklus	M
Chk1 Clone: DCS-310	Zellzyklus	M
Chk2 Clone: DCS-270	Zellzyklus	M
c-myc	Zellzyklus	P
c-Myc Clone: 9E10	Zellzyklus	M
E2F1	Zellzyklus	P
Cyclin A	Zellzyklus	P

B. Material und Methodik

Cyclin A	Clone: CY-A1	Zellzyklus	M
Cyclin B1		Zellzyklus	P
Cyclin D1	Clone: DCS-6	Zellzyklus	M
Cyclin D2	Clone: DCS-3	Zellzyklus	M
Cyclin D3	Clone: DCS-22	Zellzyklus	M
MDM2	Clone: HDM2-323	Zellzyklus	M
p14 ^{arf}	Clone: DCS-240	Zellzyklus	M
p16 ^{INK4a/CDKN2}	Clone: DCS-50	Zellzyklus	M
p19 ^{INK4d}	Clone: DCS-100	Zellzyklus	M
p21 ^{Waf-1}	Clone: CP-74	Zellzyklus	M
p34 ^{cdc2}	Clone: A17	Zellzyklus	M
p35		Zellzyklus	P
p53	Clone: BP53-12	Zellzyklus	M
p57 ^{kip2}	Clone: KP-39	Zellzyklus	M
p63	Clone: 4A4	Zellzyklus	M
Phospho-Retinoblastoma (pS ⁷⁹⁵)		Zellzyklus	M
SMAD4	Clone: DCS-46	Zellzyklus	M
Ap-1/cjun		Zellzyklus/Nukleus	P
ATF2		Zellzyklus/Nukleus	P
CUG-BP1	Clone: HL1190	Zellzyklus/Nukleus	M
HAT1 (Histone acetyltransferase)		Zellzyklus/Nukleus	P
HDAC 1 (Histone Deacetylase 1)		Zellzyklus/Nukleus	P
HDAC 2 (Histone Deacetylase 2)		Zellzyklus/Nukleus	P
HDAC 4 (Histone Deacetylase 4)		Zellzyklus/Nukleus	P
SUV39H1 Histone Methyl Transferase Clone: 44.1		Zellzyklus/Nukleus	M
PCAF		Zellzyklus/Nukleus	P
hnRNP M3-M4	Clone: HC37	Zellzyklus/Nukleus	M
Phospho-Histone H3 (pS ¹⁰)	Clone:H3-P	Zellzyklus/Nukleus	M
Phospho-Histone H3 (pS ²⁸)	Clone:HTA28	Zellzyklus/Nukleus	M
Acetyl & phospho Histone H3(Ac-Lys ⁹ ,pS ¹⁰)		Zellzyklus/Nukleus	P
Acetyl-Histone H3 (Ac-Lys ⁹)		Zellzyklus/Nukleus	P
RAN	Clone:ARAN1	Zellzyklus/Nukleus	M
NTF2	Clone: 4f5	Zellzyklus/Nukleus	M
Topoisomerase-1	Clone MAB1	Zellzyklus/Nukleus	M
Trf-1	Clone: TRF-78	Zellzyklus/Nukleus	M
Aop-1	Clone: AOP-38	Zellstress	M
HSP 70	Clone: BRM-22	Zellstress	M
HSP 90	Clone: AC-16	Zellstress	M
Nedd 8	Clone: ND23	Zellstress	M
Calcineurin	Clone: CN-A1	Ca-assoziertes Protein	M
Calmodulin		Ca-assoziertes Protein	M
Calnexin		Ca-assoziertes Protein	P
Calponin	Clone: hCp	Ca-assoziertes Protein	M
Calreticulin		Ca-assoziertes Protein	P
Aktin		Zytoskelett	P
Aktin	Clone: AC-40	Zytoskelett	M
β Aktin	Clone: AC-74	Zytoskelett	M
Actopaxin		Zytoskelett	P
Adaptin β1+β2	Clone: 100/1	Zytoskelett	M
βCOP	Clone: maD	Zytoskelett	M

α Catenin		Zytoskelett	P
β Catenin	Clone: 6F9	Zytoskelett	M
Plakoglobin	Clone: 15F11	Zytoskelett	M
Caveolin-1		Zytoskelett	P
Clathrin Light Chain	Clone: CON.1	Zytoskelett	M
Connexin 32		Zytoskelett	P
Connexin 32	Clone: CXN-32	Zytoskelett	M
Connexin 43	Clone: CXN-6	Zytoskelett	M
Cytokeratin 8.12	Clone: K8.12	Zytoskelett	M
Cytokeratin pep 8.60	Clone:K8.60	Zytoskelett	M
Cytokeratin pep 19	Clone: A53-B/A2	Zytoskelett	M
Cytokeratin pep 4	Clone: 6B10	Zytoskelett	M
Cytokeratin pep 7	Clone: LDS-68	Zytoskelett	M
Cytokeratin pep 8.13	Clone: K8.13	Zytoskelett	M
Cytokeratin pep 13	Clone: KS-1A3	Zytoskelett	M
Cytokeratin pep 18	Clone: KS-B17.2	Zytoskelett	M
Pan Cytokeratin	Clone : C-11	Zytoskelett	M
Desmin	Clone:DE-U-10	Zytoskelett	M
Dystrophin	Clone: MANDYS8	Zytoskelett	M
Ezrin	Clone: 3C12	Zytoskelett	M
Fibronectin	Clone: FN-15	Zytoskelett	M
Internexin α	Clone: 2E3	Zytoskelett	M
MAP1	Clone: HM-1	Zytoskelett	M
MAP1b	Clone: AA6	Zytoskelett	M
MAP2 (2a+2b)	Clone: AP-20	Zytoskelett	M
OP18/Stathmin		Zytoskelett	P
Myosin IIA		Zytoskelett	P
Myosin Va (LE-16)		Zytoskelett	P
Pan Cadherin	Clone:CH-19	Zytoskelett	M
Spectrin (α + β)	Clone: SB-SP1	Zytoskelett	M
Tropomyosin	Clone: TM311	Zytoskelett	M
Vinculin	Clone: VIN-11-5	Zytoskelett	M
Chondroitin Sulfate	Clone: CS-56	Zytoskelett	M
α Tubulin	Clone: B-5-1-2	Zytoskelett	M
β Tubulin I	Clone: SAP-465	Zytoskelett	M
β Tubulin III	Clone: SDL-3D10	Zytoskelett	M
β Tubulin IV	Clone: ONS-1A6	Zytoskelett	M
β Tubulin polyglutamylated	Clone: B3	Zytoskelett	M
γ Tubulin		Zytoskelett	P
α 1 syntrophin		Neurobiologie	P
i-NOS		Neurobiologie	P
i-NOS	Clone: NOS-IN	Neurobiologie	M
b-NOS		Neurobiologie	P
b-NOS	Clone: NOS-B1	Neurobiologie	M
e-NOS		Neurobiologie	P
e-NOS		Neurobiologie	P
e-NOS	Clone: NOS-e1	Neurobiologie	M
Amyloid Precursor Protein (APP)		Neurobiologie	P
Amyloid Precursor Protein (APP) C-terminal		Neurobiologie	P
CNPase	Clone: 11-5B	Neurobiologie	M
Cofilin		Neurobiologie	P
DOPA Decarboxylase	Clone: DDC-109	Neurobiologie	M
Dystrophin	Clone: MANDRA-1	Neurobiologie	M

B. Material und Methodik

Glutamate receptor NMDAR 2A	Neurobiologie	P
Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65/67)	Neurobiologie	P
Glutamine Synthetase	Neurobiologie	P
Nerve Growth Factor Receptor (NGFR p75)	Neurobiologie	P
Nerve Growth Factor Receptor Clone: ME20.4	Neurobiologie	M
KIF3A	Neurobiologie	P
Nicastrin	Neurobiologie	P
SNAP-25	Neurobiologie	P
S-100 β Clone: SH-B1	Neurobiologie	M
S-100 Clone: SH-A1	Neurobiologie	M
Neurofilament 200	Neurobiologie	P
Neurofilament 200 Clone: N52	Neurobiologie	M
Synaptotagmin	Neurobiologie	P
Syntaxin Clone:HPC-1	Neurobiologie	M
Synuclein- α	Neurobiologie	P
β -Synuclein (PNP-14)	Neurobiologie	P
Tyrosine Hydroxylase Clone: TH-16	Neurobiologie	M
Phospho-Ta (pS ^{199/202})	Neurobiologie	P
p120 ^{CTN}	Neurobiologie	P
Tryptophane Hydroxylase Clone:WH-3	Neurobiologie	M
ARNO (Cytohesin 2) Clone:CYT2-21	Signaltransduktion	M
GAP1 Clone: GP-3	Signaltransduktion	M
GRP1(ARNO3 Cytohesin-3) Clone: CYT3	Signaltransduktion	M
CRK-L	Signaltransduktion	P
CAM Kinase II α	Signaltransduktion	P
CAM Kinase IV (Ay-18)	Signaltransduktion	P
EGF receptor Clone: F4	Signaltransduktion	M
Estrogen Receptor (ER)	Signaltransduktion	P
ERK5 (Big MAPK-BMK1)	Signaltransduktion	P
FAK (focal adhesion kinase)	Signaltransduktion	R
FAK Phospho (pS ⁷⁷²)	Signaltransduktion	P
FAK Phospho (pS ⁹¹⁰)	Signaltransduktion	P
FAK Phospho (pY ⁵⁷⁷)	Signaltransduktion	P
FAK phospho (pY397)	Signaltransduktion	P
GRB-2 Clone: GRB-232	Signaltransduktion	M
I κ B α	Signaltransduktion	P
NAK	Signaltransduktion	M
NF- κ B Clone: NF-12	Signaltransduktion	M
JNK	Signaltransduktion	P
JNK activated (diphosphorylated JNK) Clone: JNK-PT	Signaltransduktion	M
p38 MAPK	Signaltransduktion	P
p38 MAPK activated (diphosphorylated p38) Clone: P38-TY	Signaltransduktion	M
Mcl-1	Signaltransduktion	P
MAP-Kinase (ERK1+ERK2)	Signaltransduktion	P
MAP-Kinase (ERK-1)	Signaltransduktion	P
MAP-Kinase activated (diphosphorylated MAPK) Clone MAPK-YT	Signaltransduktion	M
MAP-Kinase activated phosphothreonine Clone:ERK PT115	Signaltransduktion	M

MAP-Kinase activated phosphotyrosine Clone:ERK-PY193	Signaltransduktion	M
MAPK non phosphorylated ERK Clone:ERK-NP2	Signaltransduktion	M
MAP-Kinase activated protein kinase-2 (MAKAPK2)	Signaltransduktion	P
Cdc7 Kinase	Signaltransduktion	M
Phospho-PAK (pS ²¹²) Clone: PK-18	Signaltransduktion	M
Phospholipase A2 group V	Signaltransduktion	M
Phospholipase C γ 1	Signaltransduktion	P
Phosphoserine Clone: PSR-45	Signaltransduktion	M
Phosphotyrosine Clone: PT-154	Signaltransduktion	M
Phosphothreonine Clone: PTR-8	Signaltransduktion	M
PKB /AKT Clone: PKB-175	Signaltransduktion	M
PKB/AKT	Signaltransduktion	P
Phospho-PKB (pS ⁴⁷³)	Signaltransduktion	P
Phospho-PKB (pT ³⁰⁸)	Signaltransduktion	P
PKC α	Signaltransduktion	P
PKC β	Signaltransduktion	P
PKC γ	Signaltransduktion	P
PKC γ Clone: PK-G4	Signaltransduktion	M
PKD	Signaltransduktion	P
MAP-Kinase-Phosphatase-1 (MKP-1)	Signaltransduktion	P
Protein phosphatase 1 α	Signaltransduktion	P
PTEN	Signaltransduktion	P
PTEN Clone:PTN-18	Signaltransduktion	M
SGK (serum and glucocorticoid inducible kinase)	Signaltransduktion	P
Pyk2	Signaltransduktion	P
Phospho-Pyk2 (pY ⁵⁷⁹)	Signaltransduktion	P
Phospho-Pyk2 (pY ^{579/580})	Signaltransduktion	P
Phospho-Pyk2 (pY ⁵⁸⁰)	Signaltransduktion	P
Phospho-Pyk2 (pY ⁸⁸¹)	Signaltransduktion	P
RAF1	Signaltransduktion	P
Phospho-Raf (pS ⁶²¹)	Signaltransduktion	P

Tabelle 4: Antikörper eines Protein-Microarray; P: polyklonal, M: monoklonal

3.2. Methodik

3.2.1. Prinzip

Der verwendete Array erlaubt die gleichzeitige Expressionsanalyse von 224 verschiedenen Proteinen von zwei Gewebeproben (einer Test- und einer Kontrollprobe).

Der Antikörper-Array ist ein mit Nitrozellulose beschichteter Glasobjektträger, auf dem 224 unterschiedliche Antikörper (Dots) gebunden sind (Abbildung 12). Jeder Antikörper ist zugunsten einer höheren Meßgenauigkeit bzw. zum Erkennen von Fehlern doppelt auf den

Glasobjektträger aufgetragen. Die Proteine der Gewebeprobe werden durch die Antikörper gebunden (Capture). Mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs, mit dem alle in den Proben enthaltenen Proteine zuvor markiert worden sind, können die gebundenen Proteine im UV-Licht detektiert werden. Die Konzentration des gesuchten Proteins ist dabei annähernd proportional zu der Stärke der Fluoreszenz. Erst bei sehr hohen Konzentrationen (hier nicht verwendet) kommt es zu einem Sättigungseffekt.

Die verwendeten Antikörper besitzen eine besonders hohe Spezifität, damit keine falschen Proteine gebunden werden. Durch mehrfache interne Kontrollen wurde zudem eine hohe Präzision der Messung gewährleistet (s.u.). Um etwaige Abweichungen in der Prozessierung zu minimieren, enthielt jeder Microarray neben der zu untersuchenden Gewebeprobe eine bekannte Standardprobe (Referenzprobe). Dadurch wurden die Messungen untereinander vergleichbar.

Im Detail: Die zu untersuchende Probe wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3, die Referenzprobe mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert. Die zu untersuchende Probe und die Referenzprobe wurden mit einem dichromatischen Filter für grünes bzw. für rotes Licht bei entsprechender Anregung mit UV-Licht detektiert (Beispiel: Abbildung 12).

Detektion der Proteine im UV-Licht mit einem grünen (Cy3) bzw. roten (Cy5) Filter

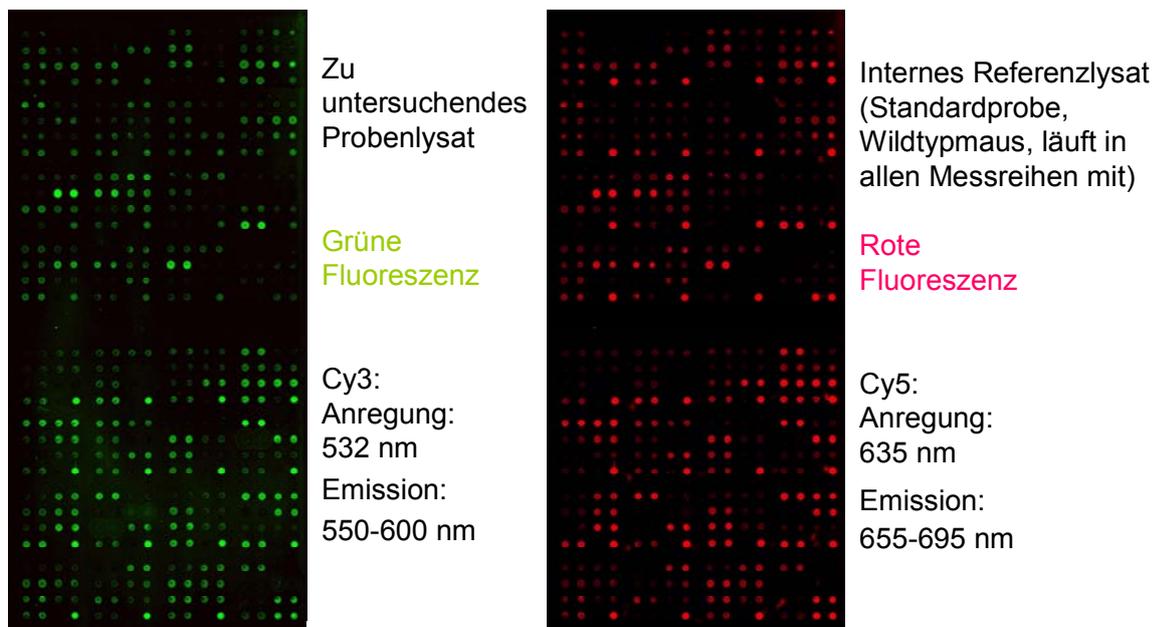


Abbildung 12 : UV-Licht-Detektion der Cy3-markierten Probe und der Cy5-markierten Referenz

Die gemessenen Helligkeiten des Probenlysats (Cy3) und des Referenzlysats (Cy5) wurden zunächst normiert:

100 % = gemittelte Färbeintensität von Cy3 bzw. Cy5

0 % = Negativkontrollen, vom Hersteller vorgegebene leere Felder

Anschließend wurde die Ratio aus dem zu untersuchenden Probenlysats und dem Referenzlysats gebildet (Division der Intensitäten, Abbildung 13). Ein Einfluss durch den Färbeprozess wurde damit minimiert.

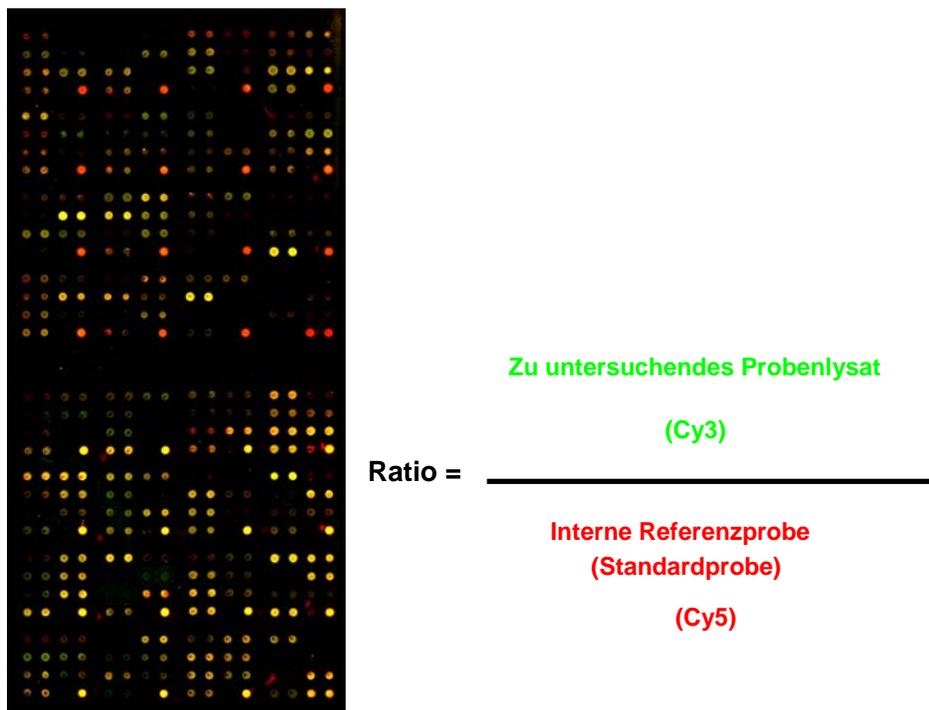


Abbildung 13: Ratio; Division von Cy3-markierter Probe durch Cy5-markierte Referenz

3.2.2. Probenaufbereitung und Proteinextraktion

Die vom Infarkt betroffenen rechten Hemisphären der zu untersuchenden Maushirne (ohne Kleinhirn) wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zermörsert (Handhomogenisator, Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

Anschließend wurde jede pulverisierte Hirnhemisphäre der zu untersuchenden Maushirne portioniert. Die Portionen einer Hemisphäre wurden jeweils gewogen (Präzisionswaage, CP224S, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Zur Durchführung der Antikörper-Arrays standen je Hirnhemisphäre 10 mg pulverisiertes Hirn zur Verfügung. Da der Proteinanteil im Maushirn auf etwa 1/10 der Gesamthirnmasse geschätzt wird, entsprechen die 10 mg Hirn ungefähr 1 mg Protein.

Bis zur Prozessierung wurden alle pulverisierten Hirne bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert, um einen Proteinandaue durch gewebeigene Enzyme zu verhindern. Die folgende Beschreibung bezieht sich auf die Prozessierung 10 mg pulverisierten Hirns jeweils einer Maus. Die gesamte Prozessierung erfolgte auf Eis.

Zur Proteinextraktion wurde das pulverisierte Hirn (10 mg, -80 °C) direkt in ein 1,5 ml fassendes Eppendorf-Tube gegeben, in dem bereits 500 μl Buffer A vorgelegt waren (Verdünnung 1 : 5, auf Eis lagernd). Durch direkte Transferierung des gefrorenen Hirnpulvers in Buffer A, welcher Detergenzien und Protease-Inhibitoren enthält, wurde eine Degradation durch hirneigene Enzyme effizient verhindert.

Mit einem Handhomogenisator (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde die zunächst trübe Lösung bis zur Klärung weiter lysiert, bzw. homogenisiert. Der verwendete Lysispuffer (Buffer A) führte so zu einer kompletten Lysierung des Gewebes. In einem anschließenden Zentrifugationsschritt (10 Sekunden lang bei 10.000 rpm) in einer Mikrozentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) konnte kein sichtbares Sediment getrennt werden. Der „Überstand“ wurde weiterverarbeitet.

Die Standardisierung auf einen definierten Proteingehalt von 1 mg/ml Buffer A erfolgte durch gezielte Verdünnung nach Proteinkonzentrationsbestimmung (3.2.3. Proteinkonzentrationsbestimmung: Bradford Protein Messung) (Bradford, 1976). In 10 mg Hirn konnte ca. 1 mg Protein gefunden werden, so dass durch die Verdünnung mit Buffer A ein Endvolumen von ungefähr 1 ml erreicht wurde.

3.2.3. Proteinkonzentrationsbestimmung: Bradford Protein Messung

Die Bradford-Methode beruht darauf, daß das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue G-250 in sauren Lösungen abhängig von der Proteinkonzentration von 465 auf 595 nm verschoben wird (Bradford, 1976). Durch die photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm kann die Konzentration einer unbekanntes Proteinlösung nach Erstellung einer Eichkurve mit bekannten Protein-Standard-Konzentrationen bestimmt werden. Zur Eichung wurde eine Referenzprobe mit Rinder-Serum-Albumin (BSA) verwendet (Bezug über BioRad, München, Deutschland).

Erstellung der Eichkurve:

Als Standardreihe wurden definierte BSA-Verdünnungen gemessen (100 μg BSA/ml Aqua dest., 250 μg BSA/ml Aqua dest., 500 μg BSA/ml Aqua dest., 750 μg BSA/ml Aqua dest., 1000 μg BSA/ml Aqua dest., 1500 μg BSA/ml Aqua dest., 2000 μg BSA $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aqua dest., 3000 μg BSA/ml Aqua dest.).

Für eine Messung eines BSA-Protein-Standards wurde 1 ml Bradford-Färbelösung [Bradford-Reagenz für Proteinassay (BioRad, München, Deutschland) 1 : 5 in Aqua dest. verdünnt] in eine Mess-Küvette vorgelegt und 5 µl Buffer A sowie 5µl BSA-Protein-Standard zugegeben. Der BSA-Protein-Standard wurde immer erst unmittelbar vor Durchführung der Messung zugegeben, um Ausflockung zu vermeiden. Die Mischung der Lösung erfolgte durch 20 s Vortexen. Die Extinktions-Messung erfolgte sogleich im Spektrophotometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 595 nm. Pro BSA-Protein-Standard-Konzentration wurden drei Messungen durchgeführt und jeweils der Mittelwert aus allen drei Bestimmungen zum Erstellen der Standard-Eichkurve herangezogen. Die Mittelwerte aus den Dreifachbestimmungen wurden vom Photometer berechnet und als Eichkurve abgespeichert.

Abbildung 14 zeigt beispielhaft eine solche Eichkurve:

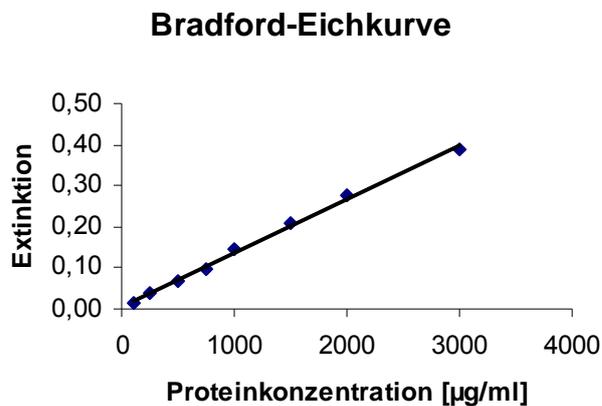


Abbildung 14: Bradford Standard Eichkurve

Proteinkonzentrationsbestimmung:

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung in einer Hirnprobe wurde 1 ml Bradford-Färbelösung [Bradford-Reagenz für Proteinassay (BioRad, München, Deutschland) 1 : 5 in Aqua dest.verdünnt] in eine Mess-Küvette vorgelegt und 5 µl Hirnlysat (Hirnprobe in Buffer A) sowie 5µl Aqua dest. zugegeben. Gemischt wurde durch 20 s Vortexen. Anhand der eingespeicherten Kalibrierungskurve (100 – 3000 µg BSA/ml Aqua dest.) ließen sich mit dem Photometer die Proteinkonzentrationen in den einzelnen zu untersuchenden Hirnlysaten durch Extinktionsmessung bei 595 nm automatisch berechnen.

Jedes Lysat wurde anschließend auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml verdünnt. Nach Verdünnung wurde die Proteinkonzentration des Lysats noch einmal mit einem Protein-Standard (1000 µg Protein/ml) überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

3.2.4. Prozessierung des Arrays

Jedes der 20 zu untersuchenden Hirnlysate wurde auf einem separaten Array zusammen mit einem immer gleichen internen Referenzlysat prozessiert. Somit wurden die im Folgenden beschriebenen Schritte für jedes der 20 zu untersuchenden Hirnlysate einzeln, das heißt insgesamt 20 Mal, durchgeführt:

Zur Prozessierung eines Arrays wurden je 150 µl Probenlysat (150 µg Protein-Probe) bzw. je 150 µl Referenzlysat (150 µg Referenz-Protein) benötigt. Die gesamte Prozessierung erfolgte in der Dunkelkammer.

1. Verdünnung der Fluoreszenzfarbstoffe: Die Farbstoffe Cy3 (Cy3 Monofunctional Reactive dye 1 mg, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) und Cy5 (Cy5 Monofunctional Reactive dye 1 mg, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) wurden jeweils in 100 µl Buffer A, das heißt auf eine Konzentration von je 10 mg/ml verdünnt.
2. Markierung („Labeling“) der Hirnlysate mit dem Fluoreszenzfarbstoff: Das Hirnlysat der zu untersuchenden Probenmaus wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3, das Hirnlysat der internen Referenzmaus mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert. Das Probenlysat und das interne Referenzlysat wurden bis zur gemeinsamen Inkubation auf dem Array getrennt voneinander in identischer Weise und zeitgleich prozessiert. Zur Markierung („Labeling“) der im Lysat enthaltenen Proteine wurden 20 µl Farbstoff-Lösung (Cy3 bzw. Cy5), entsprechend 200 µg Farbstoff, zu 180 µl Lysat (Probenlysat bzw. Referenzlysat) hinzugefügt, wodurch die vorgesehene Farbstoffkonzentration von 1 mg/ml erreicht wurde. Das Farbstoff/Lysat-Gemisch wurde durch 10 s Vortexen unter Vermeidung von Schaumbildung gemischt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation des Probenlysats mit dem Farbstoff Cy3 bzw. des Referenzlysats mit dem Farbstoff Cy5 bei RT im Dunkeln. Während der Inkubationszeit wurde die Farbstoff/Lysat-Lösung alle 10 Minuten durch 10 s Vortexen gemischt.
3. Entfernung des ungebundenen Cy3- bzw. Cy5-Überschußes durch eine Filtration des Farbstoff/Lysat-Gemisches mit Hilfe der Sigma Spin Columnen: Die in Lösung aufbewahrten Sigma Spin Columnen (Säulen) wurden jeweils in ein Collection-Tube montiert und 2 Minuten lang mit 3377 rpm „halbtrocken“ zentrifugiert. Das entstandene Eluat wurde verworfen. Die Columnen wurden dann jeweils in ein frisches Collection-Tube montiert. Anschließend wurden 150 µl des „gelabelten“ Probenlysats bzw. 150 µl des „gelabelten“ Referenzlysats auf eine Sigma Spin

Columnne geladen. Die mit „gelabeltem“ Lysat versehenen Columnnen wurden 4 Minuten lang bei 3377 rpm zentrifugiert. Das Eluat, also das „gelabelte“ Lysat („gelabelte Proteinlösung“), wurde für die weitere Prozessierung der Arrays verwendet.

4. Gemeinsame Inkubation des Cy3-markierten Probenlysats und des Cy5-markierten Referenzlysats auf dem Microarray: Der Glasobjektträger wurde kurz in PBS äquilibriert. Das Cy3-markierte Probenlysat und das Cy5-markierte Referenzlysats wurden in einem Gefäß mit 5 ml Array Incubation Buffer zusammengemischt und anschließend zur gemeinsamen Inkubation auf den Array gegeben. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten und erfolgte bei RT im Dunkeln auf dem Rocking Shaker mit 30 rpm.
5. Drei 10-minütige Waschschrte in 5 ml Washing Buffer auf dem Rocking Shaker
6. Waschschrte über 2 Minuten in desionisiertem Wasser
7. Trocknung der Arrays
8. Scannen der Arrays mit Hilfe eines Microarray-Scanners (GenePix® Personal 4100A Microarray Scanner, Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA)

Abbildung 15 fasst die Microarray-Prozessierung nocheinmal anschaulich zusammen.

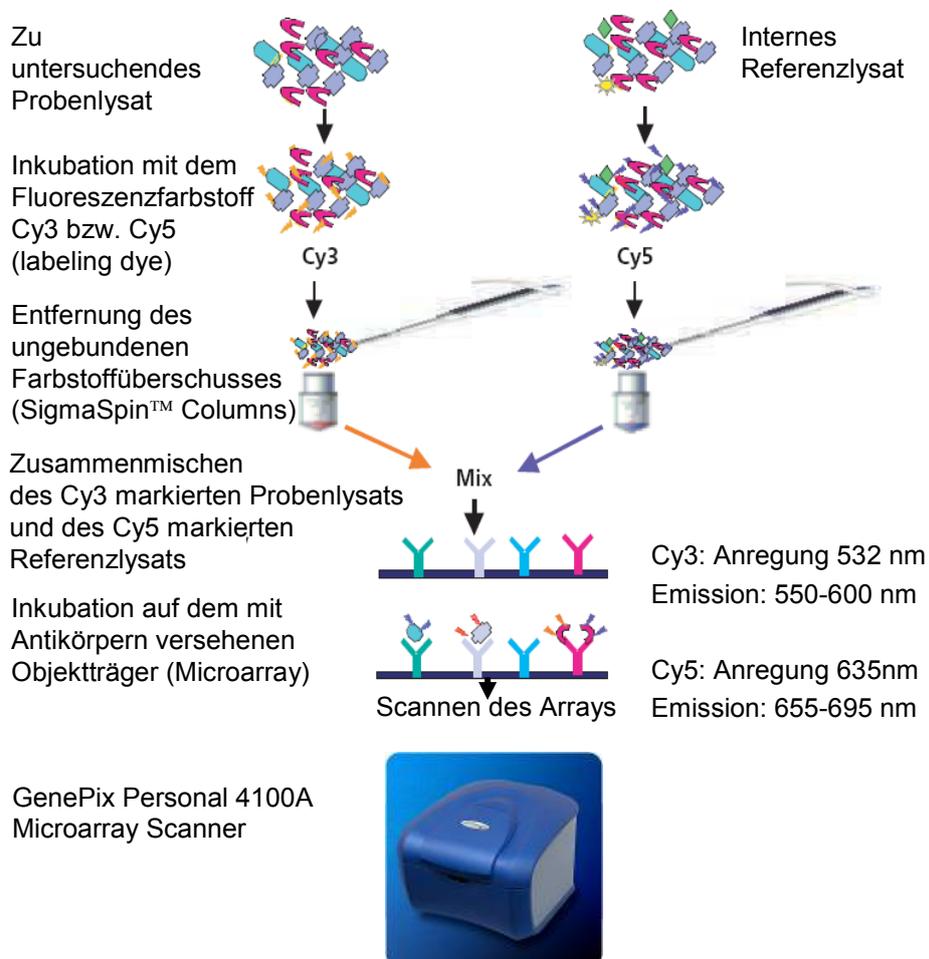


Abbildung 15: Microarray-Prozessierung

3.2.5. Antikörperposition auf dem Microarray

Auf einem Array befinden sich 224 unterschiedliche Antikörper gegen Proteine aus den Bereichen Apoptose, Zellzyklus, Zytoskelett, Neurobiologie und Signaltransduktion. Horizontal nebeneinander befinden sich jeweils zwei identische Antikörper-Dots (siehe G. Anhang, 1.2.2. Antikörperposition auf dem Microarray). Auch befinden sich in den einzelnen Subarrays je eine Positiv- und eine Negativkontrolle nebeneinander (Cy3+Cy5/BSA).

3.2.6. Auswertung

Die Auswertung wurde mit Unterstützung des statistischen Instituts für Informatik, Biometrie, Epidemiologie (IBE) der LMU München (Prof. Dr. Ulrich Mansmann) durchgeführt. Es wurden insgesamt 20 Arrays angefertigt. Auf jedem der 20 Arrays befand sich das Hirnlysat einer zu untersuchenden Maus aus einer der folgenden vier Gruppen:

- Prnp^{+/+}-Sham (N=5)
- Prnp^{-/-}-Sham (N=5)
- Prnp^{+/+}-Ischämie (N=5)
- Prnp^{-/-}-Ischämie (N=5)

Zusätzlich wurde auf jedem der 20 Arrays das interne Referenzlysat mitprozessiert.

Die fluoreszierenden Punkte (Dots) auf einem Array entsprechen den detektierten Proteinen, d.h. den Proteinen, welche an ihre jeweiligen Antikörper in den entsprechenden Positionen auf dem Array gebunden haben (zur Anordnung der Antikörper auf dem Array siehe G. Anhang, 1.2.2. Antikörperposition auf dem Microarray).

Die Helligkeitsintensität eines Punktes korreliert positiv mit der Menge des an seinen Antikörper gebundenen Proteins. In geringen Mengen besteht ein linearer Zusammenhang. Mittels Software (PictureAnalyser V1.0) wurden die mittleren Helligkeiten innerhalb der runden Dots bestimmt.

Nachfolgende Rechenschritte wurden durchgeführt:

1. Für jedes zu untersuchende Protein standen je zwei Dots (Helligkeitsintensitäten) zur Verfügung, aus denen der Mittelwert gebildet wurde.
2. Abzug des „Hintergrunds“ in den leeren Feldern (= 0 %)
3. Division durch die mittlere Gesamthelligkeit aller Dots eines Arrays (= 100 %)

4. Division des normierten Cy3-gelabelten Probenlysats durch das normierte Cy5-gelabelte Referenzlysate (= Ratio)

Im Anhang finden sich die Ratios der untersuchten Maushirnlisate, tabellarisch entsprechend der Proteinposition auf dem Array angeordnet (siehe G. Anhang, 3. Vollständig normierte Werte aller im Microarray untersuchten Proteine).

Nach Berechnung der Werte bzw. der Ratios jeder Maus wurden für jedes Protein jeweils der Median sowie der SEM-Wert (Standard Error of the Mean) innerhalb der Mausgruppen gebildet.

Signifikante Unterschiede (bzw. Trends) zwischen den vier untersuchten Gruppen (Prnp^{+/+}-Sham vs. Prnp^{-/-}-Sham, Prnp^{+/+}-Sham vs. Prnp^{+/+}-Ischämie, Prnp^{-/-}-Sham vs. Prnp^{-/-}-Ischämie, Prnp^{-/-}-Ischämie vs. Prnp^{+/+}-Ischämie) wurden mit dem parametrischen t-Test für unabhängige Stichproben und ungleiche Varianzen determiniert. Zusätzlich wurde eine ANOVA (Analysis of variance) durchgeführt. Es wurde hierzu von einer Normalverteilung aller Werte ausgegangen.

Alle p-Werte waren zweiseitig. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant, p-Werte $\leq 0,1$ als Trend festgelegt.

4. Westernblot

4.1. Material

Die verwendeten Lösungen sind im Anhang tabellarisch aufgelistet (G. Anhang, 1.3.1. Lösungen).

4.2. Methodik

4.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Gelelektrophorese erlaubt eine Auftrennung geladener Moleküle nach ihrem Molekulargewicht unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes (Laemmli, 1970). Die zu untersuchenden Proteine werden zunächst in Laemmli-Puffer, der β -Mercaptoethanol und SDS enthält (siehe G. Anhang) bei 95 °C denaturiert. Das β -Mercaptoethanol reduziert und spaltet dabei kovalente Disulfidbrücken zwischen Cysteinen, das anionische Detergenz SDS bricht die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine auf und entfaltet (denaturiert) die Proteine dadurch.

So kann das negativ geladene SDS an die Proteine binden und es entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe (die Eigenladungen der Proteine werden von SDS überdeckt) mit nahezu konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis (1,4 g SDS/g Protein). Dadurch unterscheiden sich die SDS-Protein-Komplexe fast nur noch ihrer Größe nach. Die geringfügigen Unterschiede erklären sich durch die leicht unterschiedliche Anzahl von Ladungsstellen der verschiedenen Aminosäuren (hydrophile AS > hydrophobe AS) sowie der Ladungsdichte (bizarren entfaltete Proteine laufen geringfügig langsamer).

Durch die SDS-bedingte starke negative Ladung wandern die Proteine im elektrischen Feld zur Anode, wobei die poröse Polyacrylamidgelmatrix die Proteine nach ihrem Molekulargewicht auftrennt. Die Dichte der Gele und damit ihr Auftrennungsverhalten kann durch den prozentualen Anteil von Acrylamid gesteuert und so jeweils für die Größe der Proteine optimiert werden.

Die Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgt über anschließendes Western Blotting [4.2.4. Immunoblot (Westernblot)].

Mit Hilfe eines standardisierten Proteinmarkers kann das Molekulargewicht der einzelnen Proteine bestimmt werden.

4.2.2. Herstellung von Polyacrylamid-Gelen

In dieser Arbeit wurden entsprechend der Methode nach Lämmli (Laemmli, 1970) diskontinuierliche Polyacrylamidgele mit Tris-Glycin-Puffern verwendet. Dabei wird das Trenngel von einem Sammelgel überlagert, in dem die Proteine vor ihrer Auftrennung zunächst „fokussiert“ werden.

Dazu wurden die für das Trenngel erforderlichen Substanzen zusammengegeben und in eine 0,1 cm x 8 cm x 8 cm große Vertikalkammer gefüllt (bis 1,5 cm unterhalb des oberen Randes der Kammer). Das Gel wurde dann mit 1 ml 2-Butanol überschichtet, um eine glatte Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel zu erhalten. Nach 30-minütiger Polymerisation des Trenngels wurde das Butanol entfernt, das Sammelgel in das verbleibende Volumen der Kammer gegossen und ein Kamm zur Bildung von Taschen blasenfrei ins Sammelgel eingesetzt. Nach halbstündiger Polymerisation war auch das Sammelgel gehärtet und konnte für die Elektrophorese verwendet werden.

Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist im Anhang tabellarisch aufgelistet (siehe G. Anhang, 1.3.2. Trenn- und Sammelgel: Zusammensetzung).

4.2.3. Probenaufbereitung und Elektrophorese

Für die Westernblotanalysen wurden die kontralateralen Hirnhemisphären der 5 Prnp^{+/+}-Shammäuse und der 5 Prnp^{-/-}-Shammäuse, deren ipsilaterale Hemisphären für die Protein-Microarrays (s.o.) verwendet worden waren, herangezogen.

Die zehn Hirnhemisphären wurden bei -80 °C zermörstert, jeweils in Lysierungs-Puffer lysiert und homogenisiert (Handhomogenisator, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Eine Hemisphäre mit einem ungefähren Gewicht von 150 mg, entsprechend etwa 15 mg Protein, wurde dazu in 500 µl Lysierungspuffer überführt. Anschließend folgte noch eine 10 s Zentrifugation der Lysate mit 10.000 rpm (Mikrozentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), wobei kein Sediment getrennt werden konnte. Danach wurde eine genaue Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt (s.o.) und die Proben entsprechend verdünnt (Endkonzentration 2 mg/ml).

Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben 10 Minuten lang bei 95 °C in Lämmli-Puffer aufgeköcht und kurz auf Eis gelagert.

Anschließend wurden die Proben mit einer Hamilton-Pipette in die vorgesehenen Taschen des Sammelgels pipettiert. Für das Befüllen einer SDS-Geltasche wurde eine Proteingesamtmenge von 25 µg, entsprechend etwa 12,5 µl lysierter Probe, eingesetzt.

Zusätzlich zu den Proben wurde der Standard-Proteinmarker „PageRuler™ Prestained Protein Marker“ (Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland) zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine auf jedes Gel aufgebracht.

Um die Meßgenauigkeit zu erhöhen, wurden jeweils zwei Gele mit den zehn zu untersuchenden Proben zur Detektion des Proteins Bcl-x sowie zur Detektion der NMDA-Rezeptor-Untereinheit 2A angefertigt.

Die Elektrophorese wurde in 1 x SDS Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 100 V über 24 Minuten pro Gel durchgeführt (Spannungsgenerator für WB, Power Pac 1000, BioRad Laboratories, München, Deutschland).

Damit die Gele durch die bei der Elektrophorese entstehende Wärme nicht überhitzten, wurde das in die Apparatur integrierte Kühlkammersystem an eine Kühlwasserleitung angeschlossen.

4.2.4. Immunoblot (Westernblot)

Der Western Blot ist eine Methode zur Detektion der zuvor im SDS-Gel aufgetrennten Proteine mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion (Towbin et al., 1989; Burnette, 1981). Dabei werden die Proteine durch Wanderung in einem elektrischen Feld auf eine PDVF-Membran übertragen und aufgrund ihrer Ladung dort gebunden. Anschließend erfolgt eine Antikörper-basierte Immunodetektion.

Im Detail: Der spezifische Nachweis der Proteine Bcl-x, NMDAR 2A und β -Aktin über Antikörper-Erkennung erfolgte durch das Übertragen der Proteinbanden aus den 12 %igen SDS-Gelen auf PDVF-Membranen (Immobilon, Millipore, Eschborn, Deutschland) mit der Blottingapparatur „Semi-dry blotting technique, Semi Phor“ (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) bei einer konstanten Stromstärke von 68 mA/50 cm² (Fläche eines Gels) über 2,5 Stunden mit frischem Blotting-Puffer.

Vor dem immunochemischen Nachweis der entsprechenden Proteine wurden freie Bindungsstellen auf der PDVF-Membran zuerst mit Blockungspuffer 1 Stunde lang bei RT abgesättigt („geblockt“).

Anschließend erfolgte bei RT die einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper Anti-Bcl-x (Polyklonaler Hase Anti-Bcl-x-Antikörper, gerichtet gegen den synthetisch hergestellten N-Terminus, Aminosäuren 2-20, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Verdünnung 1:2000 in Blockungspuffer) bzw. Anti-NMDAR 2A (Polyklonaler Hase Anti-NMDAR 2A-Antikörper, gerichtet gegen ein synthetisch hergestelltes Peptid, dem C-Terminus des NMDAR 2A entsprechend, Aminosäuren 1449-1464, Verdünnung 1:3000 in Blockungspuffer) bzw. Anti- β -Aktin (Aktin I-19, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland, Verdünnung 1:5000 in Blockungspuffer).

Nach anschließendem dreimaligem Waschen für jeweils 15 Minuten in Blockungspuffer bei RT wurde der Blot mit dem Alkalische-Phosphatase-(AP-)gekoppelten Sekundärantikörper (Polyklonales Ziege Anti-Hase Immunglobulin/AP, DakoCytomation, Hamburg, Deutschland, Verdünnung 1:2000 in Blockungspuffer) über Nacht bei 2 °C inkubiert.

Nach erneutem Waschen in Blockungspuffer und Umpufferung der PDVF-Membran in Alkalische-Phosphatase-Puffer (100 mM Tris, pH 9,5, 10 ml) über 1 Minute bei RT auf pH 9,5 wurde der gebundene AP-gekoppelte Sekundärantikörper durch Inkubation mit der Chromogenlösung NBT/BCIP (0,1 %ige Färbelösung) sichtbar gemacht.

Bei dieser Visualisierungsreaktion dephosphoryliert die an den Sekundärantikörper gekoppelte alkalische Phosphatase das BCIP, welches dann mit NBT in einer Redox-Farbreaktion einen unlöslichen blauen Farbstoff generiert.

Als die schwächsten Banden nach etwa 2 Stunden der Chromogen-Inkubation zart sichtbar wurden, wurde die Reaktion durch Wässern und Umpufferung in Blockungspuffer (pH 7,4) gestoppt.

4.2.5. Auswertung

Die fertigen Western-Blots wurden mit einem hoch auflösenden Flachscanner (Epson, Meerbusch, Deutschland) digitalisiert und die Intensität der Banden mit der Software Total Lab V 2.01 (Nonlinear Dynamics, Newcastle-upon-Tyne, England) quantifiziert.

Es wurden zwei Westernblots zur Detektion von Bcl-x (abgebildet unter C. Ergebnisse, 3.1. Bcl-x) und zwei Westernblots zur Detektion von NMDAR 2A (abgebildet unter C. Ergebnisse, 3.2. NMDAR 2A) nach oben beschriebener Methodik angefertigt.

Ziel war es, die NMDAR 2A-Expression bzw. die Bcl-x-Expression zwischen der Prnp^{+/+}-Shammausgruppe und der Prnp^{-/-}-Shammausgruppe zu vergleichen.

Nach Abzug des Hintergrunds wurden die Intensitäten der zwei Bcl-x- bzw. der zwei NMDAR 2A-Westernblots gemittelt.

Um Unterschiede zu minimieren, wurde zusätzlich auf allen vier Westernblots in jedem Maushirnlisat β -Aktin als Bezugsprotein mitdetektiert. β -Aktin ist ein im Hirn relativ konstant exprimiertes Protein. Somit konnten durch einen Bezug auf β -Aktin kleine Schwankungen in den Proteinkonzentrationen zwischen den verschiedenen prozessierten Maushirnlisaten ausgeglichen werden.

Im Ergebnisteil sind jeweils Median \pm SEM (Standard Error of the Mean) beider Mausgruppen dargestellt.

Die statistische Auswertung des quantitativen Vergleichs der Bcl-x- Expression bzw. der NMDAR 2A-Expression zwischen Prnp^{+/+}-Shammäusen und Prnp^{-/-}-Shammäusen erfolgte mit einem zweiseitigen ungepaarten t-Test. P-Werte $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

C. Ergebnisse

1. Histologie

Um herauszufinden, welchen Einfluss das Prionprotein bei transientser Ischämie auf die Infarktgröße hat und welche verschiedenen Hirnregionen davon betroffen sind, wurden Nissl-gefärbte koronare Gefrierschnitte von $Prnp^{+/+}$ -Maushirnen (N=12) und $Prnp^{-/-}$ -Maushirnen (N=7) nach einstündiger cerebraler Ischämie und 24-stündiger Reperfusion (transientser Okklusion der A. cerebri media) in Bezug auf Infarktgröße und Infarktverteilungsmuster untersucht.

1.1. Größe des Infarkts in $Prnp^{+/+}$ - und $Prnp^{-/-}$ -Mäusen

Der vom Infarkt betroffene Bereich war in beiden Mausgruppen makroskopisch gut abgrenzbar und stellte sich als schwächer angefärbtes Areal mit verdämmernden Zellkernen dar. Die ischämischen Läsionen erstreckten sich vom Vorderhirn bis einige Millimeter hinter das Bregma mit maximaler Ausdehnung auf Höhe des Bregmas. Abbildung 16 zeigt schematisch den Aufbau des Maushirns mit Kennzeichnung des Bregmas (schwarzer Pfeil) und stellt exemplarisch einen Nissl-gefärbten Hirnschnitt einer $Prnp^{-/-}$ -Maus nach einstündiger cerebraler Ischämie und 24-stündiger Reperfusion auf Höhe des Bregmas dar. Es findet sich ein großes Infarktareal (blasse Fläche) sowie ein Ödem der betroffenen Hemisphäre mit entsprechender Mittellinienverlagerung zur kontralateralen Hemisphäre.

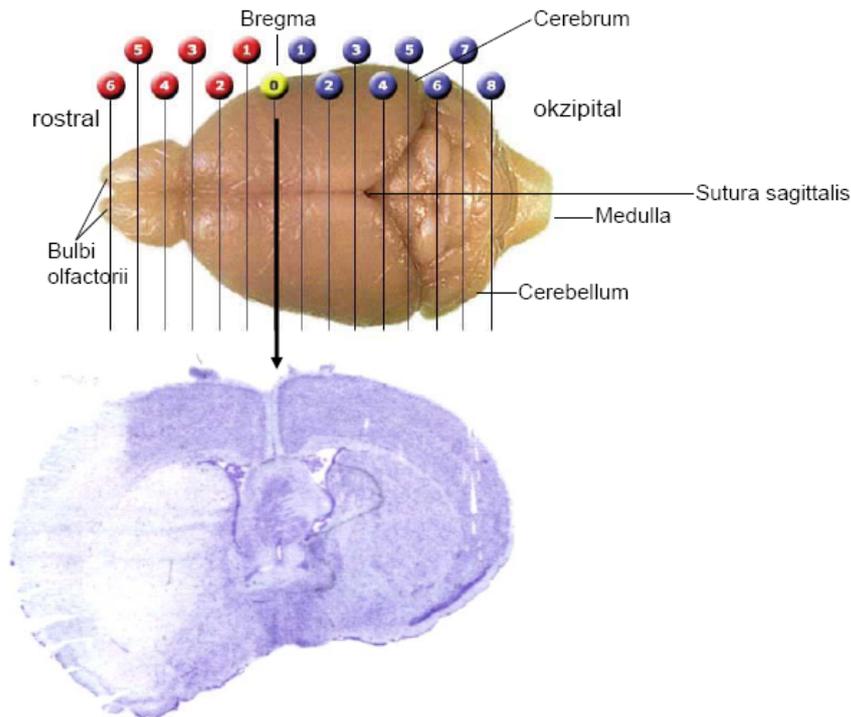


Abbildung 16: Die Abbildung zeigt ein Maushirn in der Ansicht von oben (Quelle: www.mbl.org), auf Höhe „0“ findet man das Bregma (Schnittpunkt der Sutura coronalis mit der Sutura sagittalis). Ferner ist ein 10 µm dicker histologischer Nissl-gefärbter Gefrierschnitt eines $Prnp^{-/-}$ -Maushirns auf Höhe des Bregmas nach einstündiger cerebraler Ischämie (via Okklusion der rechten A. cerebri media) und 24-stündiger Reperfusion abgebildet. Deutlich sind die infarzierten Areale als blasse Fläche abzugrenzen. Zusätzlich zeigt sich ein Ödem mit Mittellinienverlagerung.

Die Läsionsvolumina in beiden Mausgruppen wurden durch Summieren der markierten Infarktflächen in 500 µm Schritten berechnet. Sie waren in den $Prnp^{-/-}$ -Mäusen signifikant größer als in den $Prnp^{+/+}$ -Mäusen ($p \leq 0,05$) und betragen $34,78 \text{ mm}^3 \pm 12,99 \text{ mm}^3$ in $Prnp^{-/-}$ -Mäusen bzw. $10,06 \text{ mm}^3 \pm 4,8 \text{ mm}^3$ in den $Prnp^{+/+}$ -Mäusen (Abbildung 17).

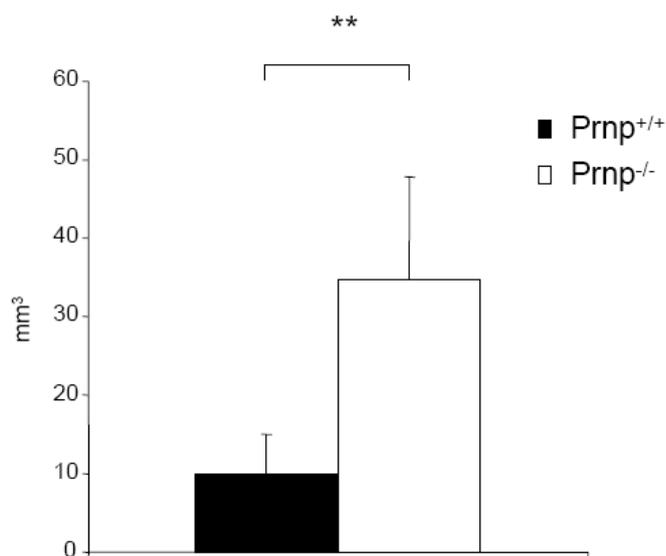


Abbildung 17: Infarktolumina in mm^3 in den $Prnp^{+/+}$ -Mäusen und den $Prnp^{-/-}$ -Mäusen (**: Signifikanz)

Die Volumina der Hemisphären wurden in beiden Mausgruppen von 2,5 mm rostral bis 7 mm okzipital des Bregmas gemessen und betragen in den Prnp^{+/+}-Mäusen 50,19 mm³ +/- 19,5 mm³ für die ipsilaterale Hemisphäre und 50,89 mm³ +/- 19,88 mm³ für die kontralaterale Hemisphäre. Bei den Prnp^{-/-}-Mäusen waren es 86,45 mm³ +/- 18,4 mm³ für die ipsilaterale Hemisphäre und 79,20 mm³ +/- 15,03 mm³ für die kontralaterale Hemisphäre. Das Verhältnis des Infarkt volumens zum Volumen der ipsilateralen Hemisphäre betrug in den Prnp^{-/-}-Mäusen 39 % +/- 10 % und in den Prnp^{+/+}-Mäusen 20 % +/- 3%. Dieser Unterschied war signifikant ($p \leq 0,05$).

In der Prnp^{-/-}-Mausgruppe zeigte sich ein ausgeprägtes Ischämie-induziertes Hirnödem (Abbildung 16). Während das Verhältnis der ipsilateralen zur kontralateralen Hemisphäre in den Prnp^{+/+}-Mäusen etwa bei 1 lag, betrug es in den Prnp^{-/-}-Mäusen 1,14 +/- 0,10. Die Hirnschwellung war damit in den Prnp^{-/-}-Mäusen signifikant stärker als in den Prnp^{+/+}-Mäusen.

1.2. Regionales Verteilungsmuster des Infarkts in Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäusen

Um im Detail zu untersuchen, auf welche Bereiche sich die transiente Okklusion der A. cerebri media besonders auswirkt, wurde anhand von 2 Schnittstufen histologisch beurteilt, zu welchem Grad jeweils die einzelnen Hirnregionen in den Prnp^{+/+}- und den Prnp^{-/-}-Mäusen vom Infarkt betroffenen waren. Anhand einer Schnittstufe auf Höhe des Bregmas (Abbildung 18 a) sowie einer Schnittstufe 1,3 mm okzipital des Bregmas (Abbildung 18 b) wurden folgende Hirnregionen betrachtet: Basalganglien (Striatum plus Pallidum), motorischer Kortex, somatosensorischer Kortex, insulärer Kortex, piriformer Kortex, cingulärer Kortex, peri- und ektorhinaler Kortex, Hippocampus und paraventriculäre thalamische Nuklei.

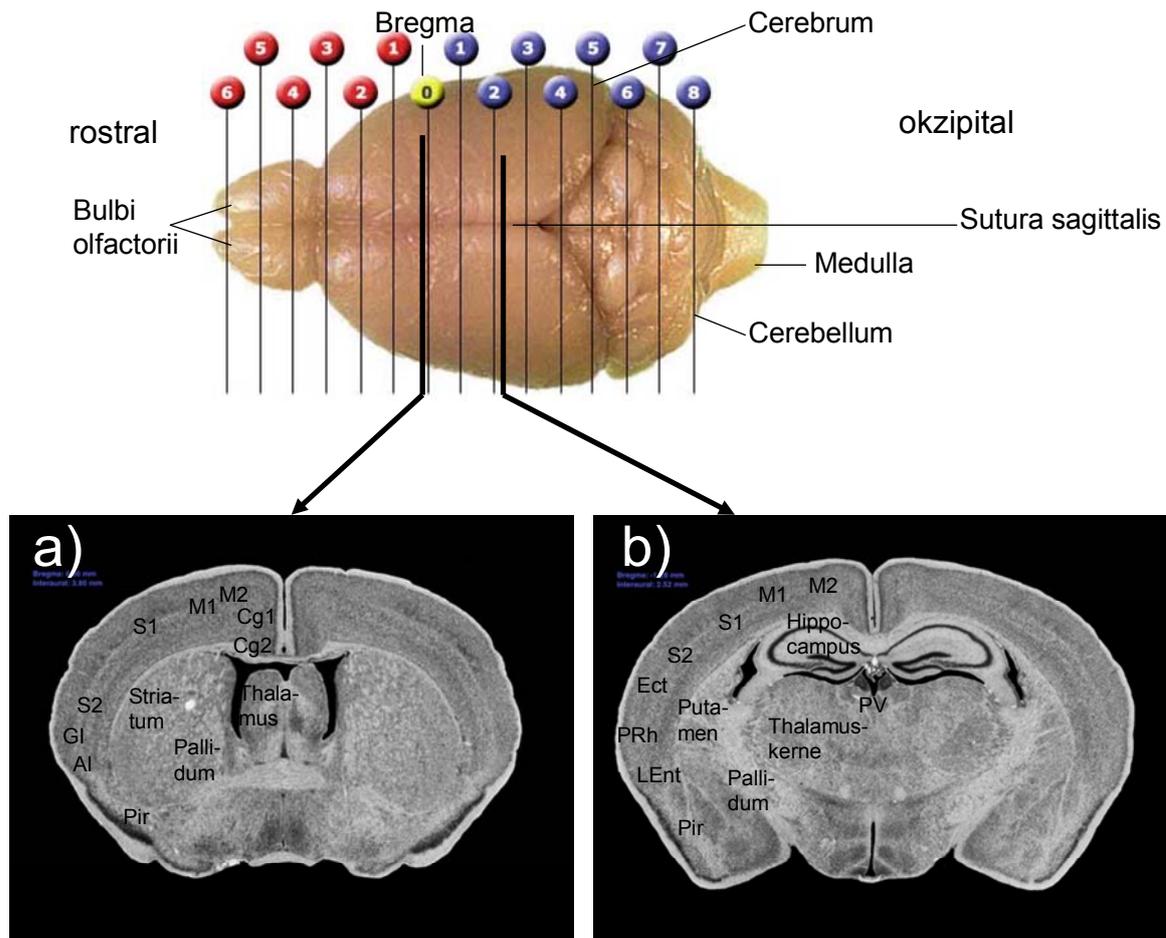


Abbildung 18: a) zeigt die erste histologische Schnittstufe zur Beurteilung der prozentualen vom Infarkt betroffenen Anteile der einzelnen Hirnregionen auf Höhe des Bregmas (Quelle: www.mbl.org).

b) zeigt einen Schnitt auf Höhe der zweiten zur Untersuchung herangezogenen histologischen Schnittstufe 1,3 mm okzipital des Bregmas (Quelle: www.mbl.org).

Abkürzungen: Cg1: Cingulärer Kortex Area 1; Cg2: Cingulärer Kortex Area 2;

M1: Primärer Motorischer Kortex; M2: Sekundärer Motorischer Kortex; S1: Primärer Somatosensorischer Kortex; S2: Sekundärer Somatosensorischer Kortex; GI: Granulärer Insulärer Kortex; AI: Agranulärer Insulärer Kortex; Pir: Piriformer Kortex; Ect: Ektorhinaler Kortex; PRh: Perirhinaler Kortex; LEnt: Lateraler Entorhinaler Kortex; PV: Paraventriculäre thalamische Nuklei;

In Tabelle 5 sind die vom Infarkt betroffenen Anteile der untersuchten Hirnregionen in beiden Mausgruppen prozentual dargestellt:

	Prnp ^{+/+} (N=12)	Prnp ^{-/-} (N=7)	p-value
Piriformer (Olfaktorischer) Kortex **	8%	67%	0,02
Insulärer Kortex **	21%	67%	0,05
Somatosensorischer Kortex *	19%	60%	0,10
Basalganglien	63%	81%	0,37
Peri- und Ektorhinaler Kortex	33%	78%	0,19
Motorischer Kortex	0%	7%	0,36

Paraventriculärer Kortex	0%	0%	-
Hippocampus	0%	0%	-
Cingulärer Kortex	0%	0%	-

Tabelle 5: Mittelwerte der vom Infarkt betroffenen prozentualen Anteile der einzelnen Hirnregionen (**: Signifikanz; *: Trend)

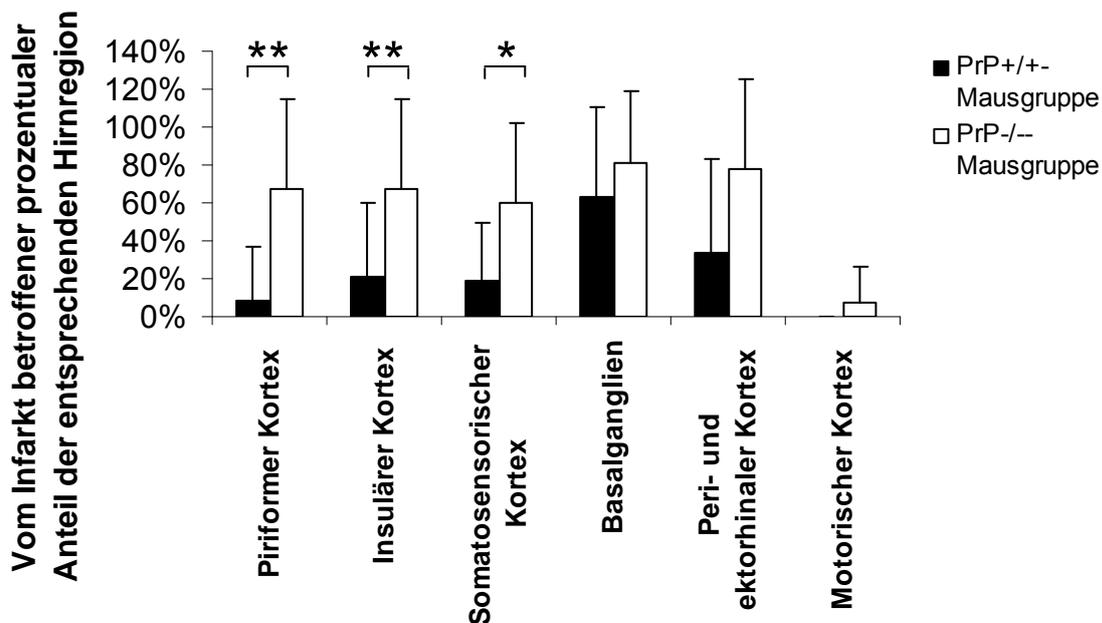


Abbildung 19: Mittelwerte der vom Infarkt betroffenen prozentualen Anteile der einzelnen Hirnregionen (**: Signifikanz; *: Trend)

Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den $Prnp^{+/+}$ -Mäusen und den $Prnp^{-/-}$ -Mäusen in Bezug auf ihre Infarktgrößen fanden sich in den beiden dreischichtigen zum Paleo- bzw. zum Archikortex gehörenden Regionen, dem piriformen Kortex ($p=0,02$) und dem insulären Kortex ($p=0,05$). Im piriformen Kortex betrug der Infarktanteil in den $Prnp^{+/+}$ -Mäusen 8 % und in den $Prnp^{-/-}$ -Mäusen 67 % der Gesamtregion. Im insulären Kortex waren bei den $Prnp^{+/+}$ -Mäusen 21 % und bei den $Prnp^{-/-}$ -Mäusen 67 % der Gesamtregion vom Infarkt betroffen.

Ein Trend ($p \leq 0,1$) zeigte sich im sechsschichtigen zum Neokortex zählenden somatosensorischen Kortex, welcher aufgrund seiner aus kleinen rundlichen Neuronen bestehenden prominenten Körnerzellschicht auch als granulärer Kortex bezeichnet wird. Hier erstreckte sich das Infarktareal der $Prnp^{+/+}$ -Mäuse auf 19 % und das der $Prnp^{-/-}$ -Mäuse auf 60 % der Gesamtregion ($p=0,1$).

In beiden Mausgruppen lagen alle vom Infarkt betroffenen Gebiete im Versorgungsbereich der A. cerebri media.

Zum Versorgungsbereich der A. cerebri media gehören als Teile des Diencephalons die Basalganglien (Striatum und Pallidum) und der Thalamus. Ferner werden Teile des dreischichtigen Allokortex (Paleo- und Archikortex), d.h. der insuläre und der piriforme Kortex, Teile des sechsschichtigen Neokortex, d.h. Teile des motorischen Kortex (Rumpf, vordere Extremität und Kopfbereich), der primäre und sekundäre somatosensorische Kortex sowie der peri- und ektorhinale Kortex von Ästen der A. cerebri media versorgt. Von diesem Versorgungsbereich waren in den Prnp^{-/-}-Mäusen insgesamt etwa 70 %, in den Prnp^{+/+}-Mäusen etwa 30 % vom Infarkt betroffen. Nie war der gesamte Versorgungsbereich der A. cerebri media vom Infarkt betroffen. So blieb der Thalamus in beiden Mausgruppen vollständig, der motorische Kortex weitgehend vom Infarkt ausgespart.

Die größten Infarktvolumina in den Prnp^{+/+}-Mäusen und in den Prnp^{-/-}-Mäusen zeigten sich in den Basalganglien, die histologisch durch eine Vielzahl kleinerer rundlicher Neurone gekennzeichnet sind. In den Prnp^{+/+}-Mäusen waren 63 % der Basalganglienregion und in den Prnp^{-/-}-Mäusen 81 % der Basalganglienregion vom Infarkt betroffen. Peri- und ektorhinaler Kortex waren in den Prnp^{+/+}-Tieren zu 33 % und in den Prnp^{-/-}-Tieren zu 68 % vom Infarkt betroffen.

Der motorische Kortex, der insbesondere durch eine breite Pyramidenzellschicht mit großen pyramidenförmigen Motoneuronen gekennzeichnet ist, war in den Prnp^{+/+}-Mäusen gar nicht vom Infarkt betroffen, in den Prnp^{-/-}-Mäusen zu 7 %.

Die paraventriculären Nuklei, der Hippocampus und der cinguläre Kortex - Regionen, die nicht durch die A. cerebri media versorgt werden - waren weder bei den Prnp^{+/+}- noch bei den Prnp^{-/-}-Tieren vom Infarkt betroffen.

2. Protein-Microarrays

Mit Hilfe von Protein-Microarrays wurden die relativen Expressionslevel von 224 unterschiedlichen Proteinen in Gehirnen von Prnp^{+/+}-Shammäusen und Prnp^{-/-}-Shammäusen sowie in Gehirnen von Prnp^{+/+}-Mäusen und Prnp^{-/-}-Mäusen nach transienter cerebraler Ischämie untersucht. Die Ischämiegruppen erhielten eine transiente cerebrale Ischämie von einer Stunde Dauer mit 4-stündiger Reperfusion. Die Shamgruppen wurden denselben Operationsbedingungen unterzogen wie die Ischämiegruppen, aber ohne, dass eine cerebrale Ischämie induziert wurde.

Es wurden folgende Gruppen gebildet (N=5):

- Prnp^{+/+}-Sham
- Prnp^{-/-}-Sham
- Prnp^{+/+}-Ischämie
- Prnp^{-/-}-Ischämie

In der Gruppe Prnp^{+/+}-Sham wurden zwei Arrays aufgrund von Überfärbung nicht zur Auswertung herangezogen.

Der Vergleich umfasste jeweils Prnp^{+/+}- mit Prnp^{-/-}-Tieren, sowie Ischämie- mit Sham-operierten Kontrolltieren (Prnp^{+/+}-Sham vs. Prnp^{-/-}-Sham, Prnp^{+/+}-Sham vs. Prnp^{+/+}-Ischämie, Prnp^{-/-}-Sham vs. Prnp^{-/-}-Ischämie, Prnp^{-/-}-Ischämie vs. Prnp^{+/+}-Ischämie).

Wie in B. Material und Methodik dargestellt, wurden aus den Intensitäten der einzelnen Dots der Microarrays die entsprechenden relativen Proteinkonzentrationen ermittelt. Durch Bildung der Ratio gegenüber der Referenzprobe wurden Fertigungstoleranzen, Varianzen in der Inkubation oder Fluoreszenzmessung sowie Schwankungen im Proteingehalt minimiert (Ratio = Sample/Reference). Das Ergebnis ist beispielhaft in der nachfolgenden Abbildung 20 für ein Feld dargestellt. Aus den doppelt angelegten Dots wurde jeweils der Mittelwert gebildet. Im Anhang findet sich eine Übersicht über alle gemessenen, vollständig normierten Werte entsprechend der Anordnung auf dem Array (siehe G. Anhang, 3. Vollständig normierte Werte aller im Microarray untersuchten Proteine).

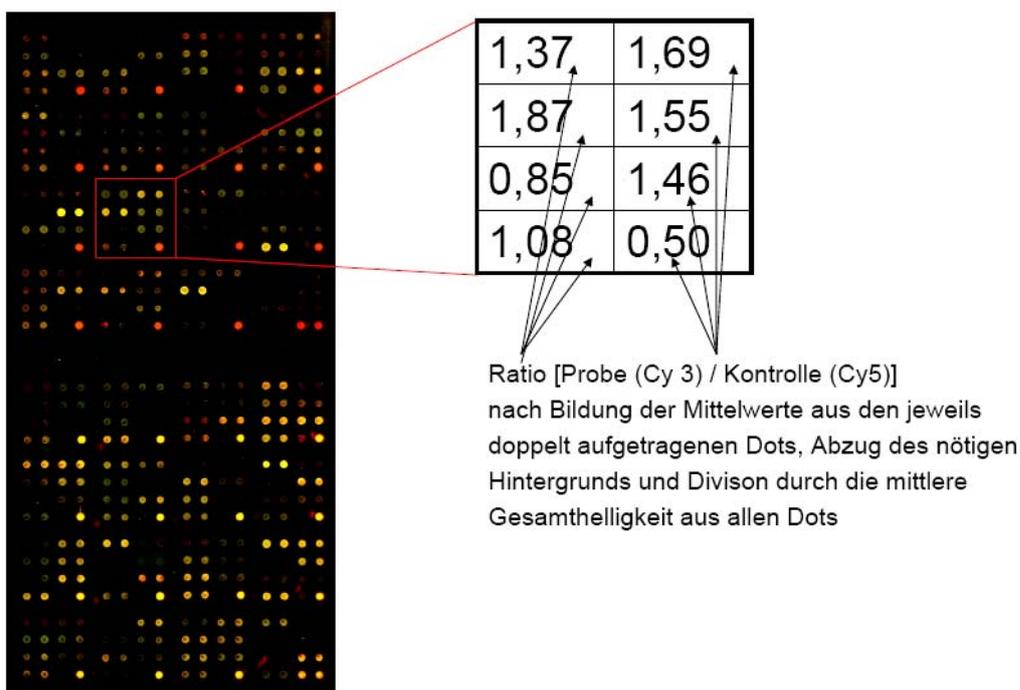


Abbildung 20: Microarray

Die Mäuse aus den vier Mausgruppen wurden in Bezug auf ihren relativen Proteinexpressionslevel statistisch miteinander verglichen (t-Test und ANOVA):

Im Folgenden werden Median, Standardabweichung (StabW) und Standard Error of the Mean (SEM) der relevanten Proteine geordnet nach Themenbereichen aufgeführt. Zum besseren Verständnis wird deren biologische Bedeutung anhand einer Kurzbeschreibung bzw. einer Grafik veranschaulicht. Die im Folgenden beschriebenen Signifikanzen bzw. Trends beziehen sich, sofern nicht anders im Text bzw. in den Tabellen angegeben, auf den t-Test. Signifikanzen bzw. Trends, die mit Hilfe der ANOVA ermittelt wurden, werden explizit im Text bzw. in den Tabellen als ANOVA erwähnt.

2.1. Signalwege aus dem Bereich der Apoptose

2.1.1. Caspasen

Caspasen sind Proteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum. Sie spalten Peptidbindungen C-terminal von Aspartat und aktivieren dadurch ihre Substrate, die Vorläufer-(Pro)caspasen. Der Name Caspase leitet sich von **cysteiny-l-aspartase** ab. Caspasen untergliedern sich in Apoptose-Caspasen und inflammatorische Caspasen (siehe unten).

Übersicht: Apoptose-induzierende Caspasen:

Caspasen sind die wichtigsten Enzyme der Apoptose, des programmierten Zelltods. Zu den Apoptose-Caspasen gehören die Caspasen 2, 3, 6, 7, 8, 9 und 10. Diese werden in Initiatorcaspasen (Caspasen 2, 8, 9 und 10) und Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6 und 7) untergliedert.

Untersucht wurden in dieser Arbeit die Proteinlevel der Initiatorcaspasen (Pro)caspase 8, Caspase 9 und 10 sowie der drei Effektorcaspasen 3, 6 und 7 und der aktivierten Caspase 3.

In Abbildung 21 sind die untersuchten Apoptose-Caspasen und deren Signalwege im Überblick dargestellt. Die Caspasen, die beim Vergleich der vier Mausgruppen einen Trend bzw. eine Signifikanz zeigten, sind mit einem Stern bzw. zwei Sternen markiert (*=Trend im t-Test; **=Signifikanz im t-Test; *=Trend in der ANOVA **=Signifikanz in der ANOVA).

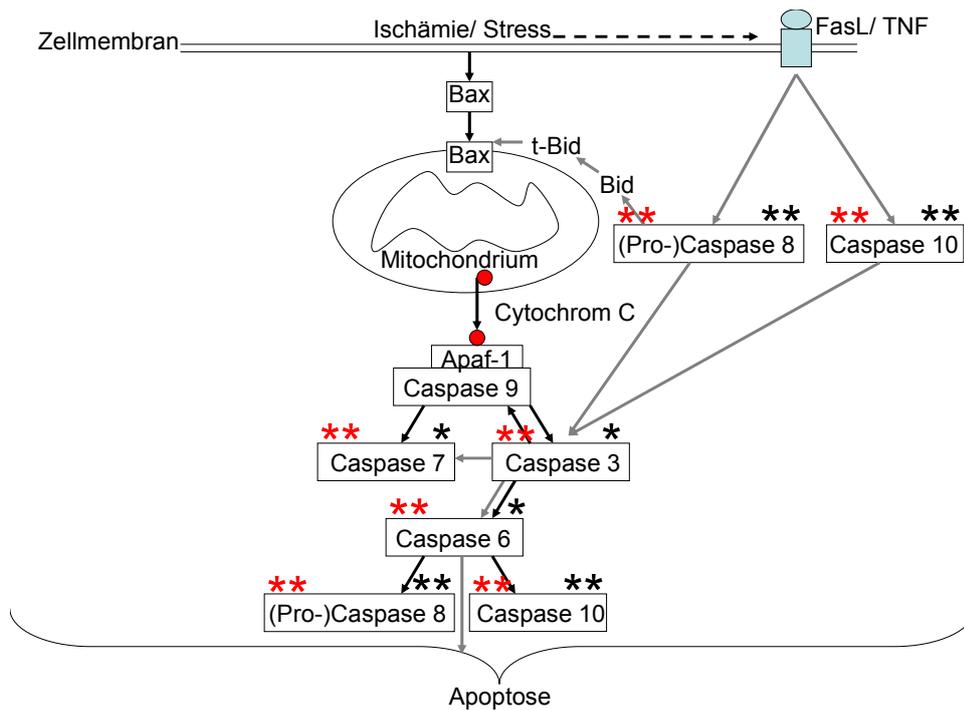


Abbildung 21: Apoptose-Caspase-Kaskaden (*=Trend im t-Test; **=Signifikanz im t-Test; *=Trend in der ANOVA; **=Signifikanz in der ANOVA)

→ Extrinsische Apoptose-Kaskade (Aktivierung) → Intrinsische Apoptose-Kaskade (Aktivierung)

Nachfolgend findet sich eine detaillierte Darstellung der entsprechenden Aktivitäten und Expressionslevel der einzelnen untersuchten Caspasen sowie deren statistischer Vergleich (Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 24, Abbildung 25, Abbildung 26, Abbildung 27, Abbildung 28, Abbildung 29):

Initiatorcaspasen

Procaspase	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
8						
Median	1,08	0,85	1,24	1,08	Prnp ^{+/+} Sham > Prnp ^{-/-} Sham (p=0,03) ANOVA (p=0,02)	Prnp ^{-/-} Ischämie > Prnp ^{-/-} Sham (p=0,06)
StabW	0,12	0,14	0,30	0,21	-	-
SEM	0,07	0,06	0,13	0,09	-	-

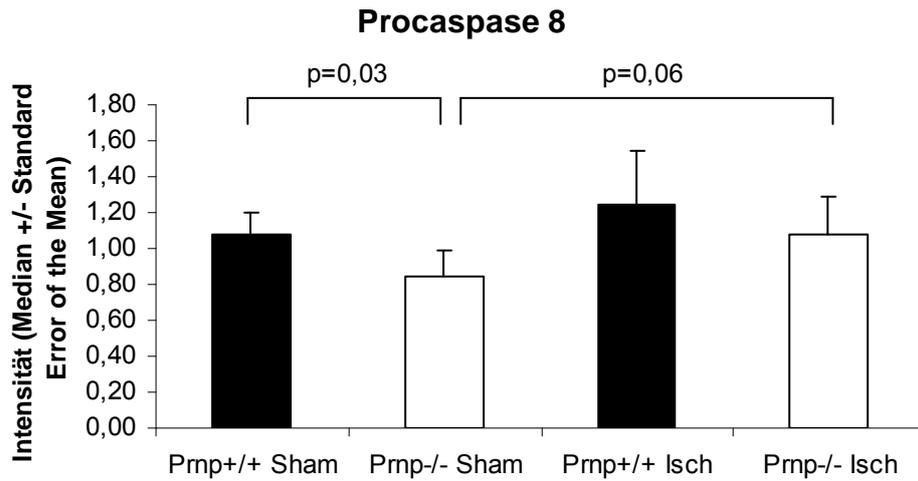


Abbildung 22: Procaspase 8 (Beschreibung im Text)

Caspase 8	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,80	0,98	1,21	1,07	ANOVA (p=0,04)	-
StabW	0,85	0,12	0,23	0,25	-	-
SEM	0,49	0,05	0,10	0,11	-	-

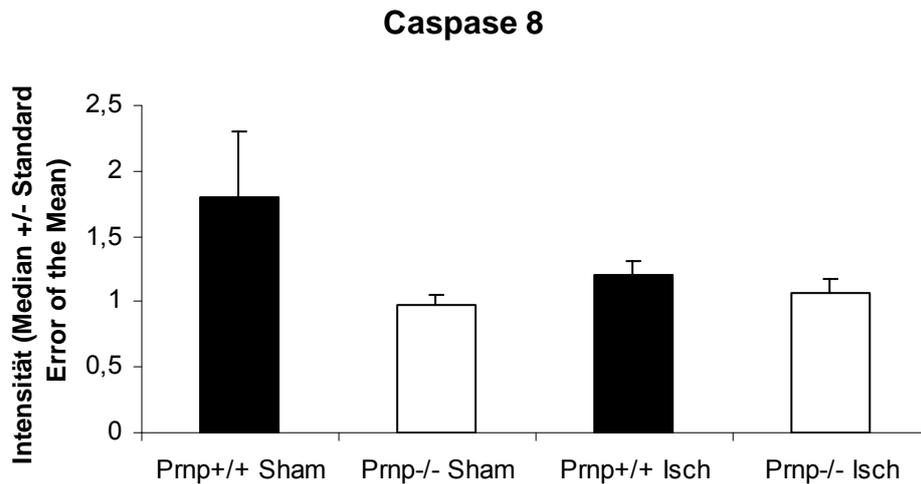


Abbildung 23: Caspase 8 (Beschreibung im Text)

Caspase 9	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,58	0,88	1,26	1,20	-	-
StabW	0,93	0,33	0,38	0,30	-	-
SEM	0,53	0,15	0,17	0,13	-	-

Caspase 9

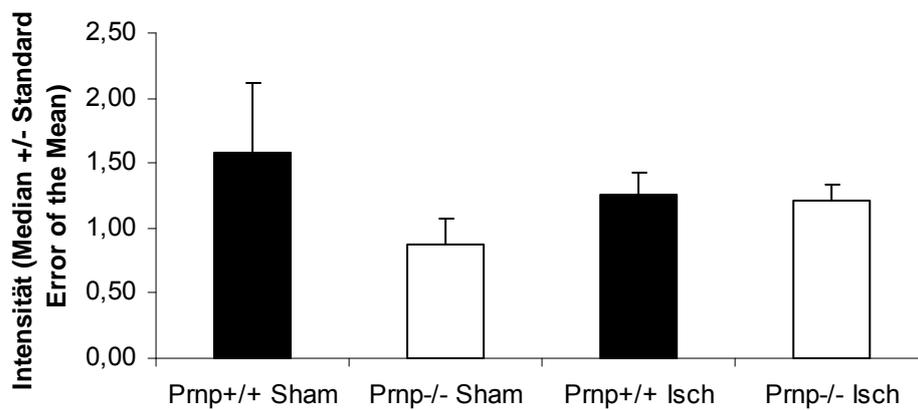


Abbildung 24: Caspase 9 (Beschreibung im Text)

Caspase 10	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,17	0,92	1,26	1,17	Prnp ^{+/+} Sham > Prnp ^{-/-} Sham (p=0,03) ANOVA (p=0,02)	-
StabW	0,10	0,11	1,00	0,30	-	-
SEM	0,06	0,05	0,45	0,13	-	-

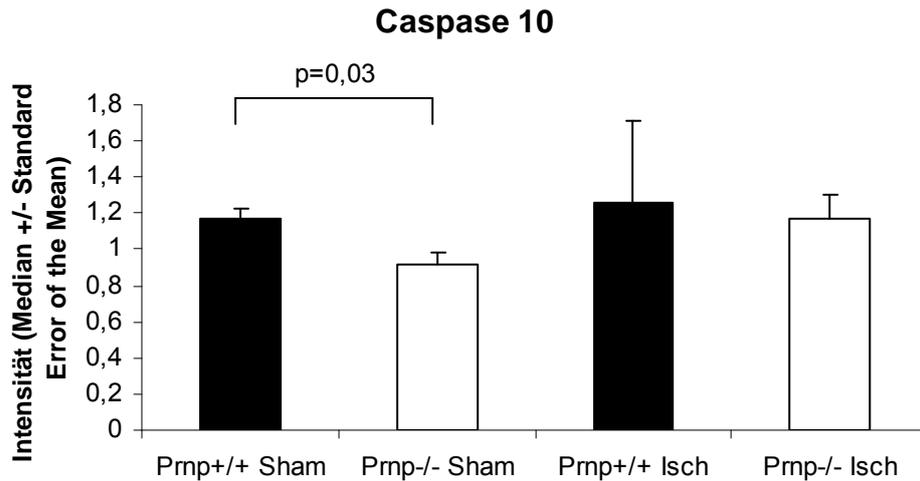


Abbildung 25: Caspase 10 (Beschreibung im Text)

Effektorcaspasen

Caspase	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
3						
Median	1,20	0,90	1,25	1,06	ANOVA (p=0,01)	Prnp ^{+/+} Ischämie>Prnp ^{-/-} Ischämie (p=0,06)
StabW	0,26	0,10	0,06	0,19	-	-
SEM	0,15	0,04	0,03	0,08	-	-

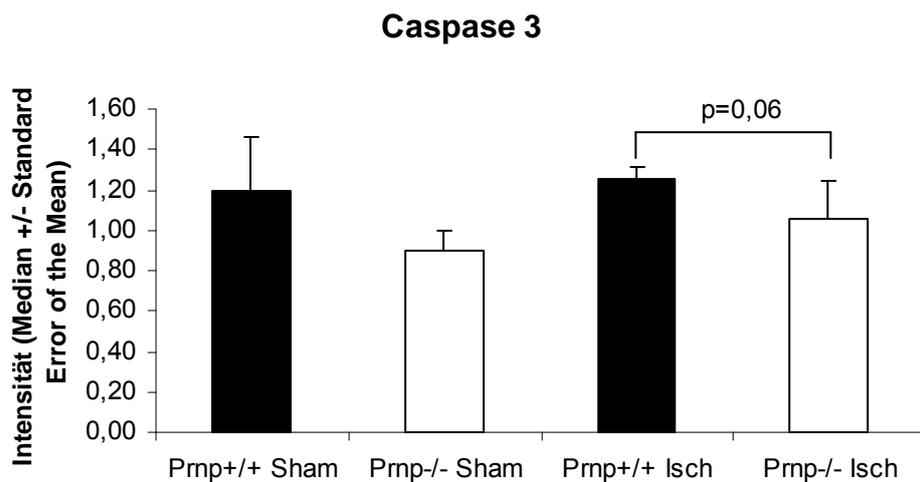


Abbildung 26: Caspase 3 (Beschreibung im Text)

aktivierte Caspase 3	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,23	0,99	1,05	1,06	-	-
StabW	0,24	0,11	0,22	0,19	-	-
SEM	0,14	0,05	0,10	0,08	-	-

aktivierte Caspase 3

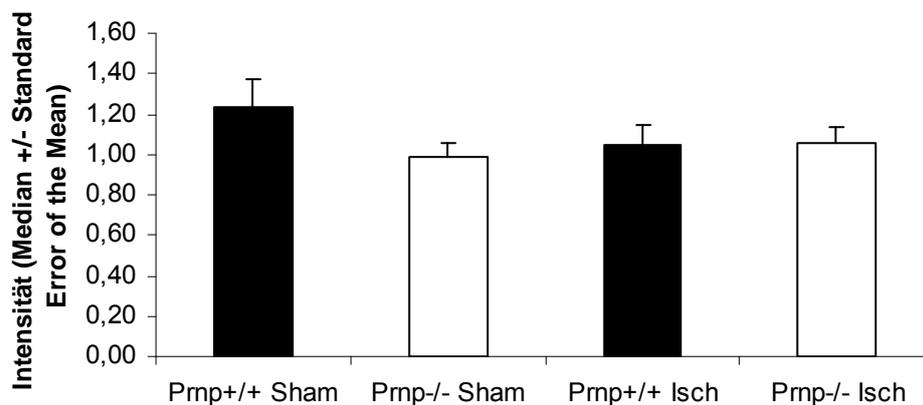


Abbildung 27: Aktivierte Caspase 3 (Beschreibung im Text)

Caspase 6	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,07	0,90	1,18	1,06	ANOVA (p=0,02)	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{-/-} Ischämie (p=0,08) Prnp ^{-/-} Ischämie > Prnp ^{-/-} Sham (p=0,08)
StabW	0,31	0,20	0,10	0,16	-	-
SEM	0,18	0,09	0,05	0,07	-	-

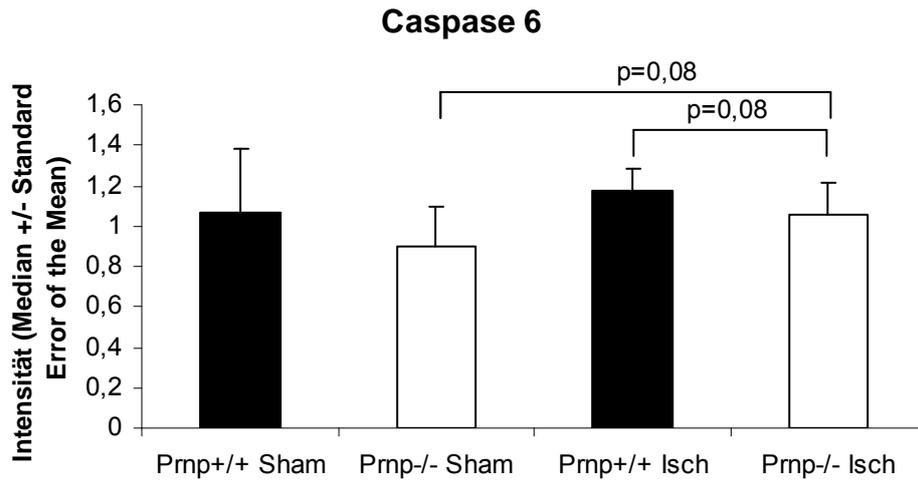


Abbildung 28: Caspase 6 (Beschreibung im Text)

Caspase 7	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,16	0,87	1,19	0,99	ANOVA (p=0,01)	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{-/-} Ischämie (p=0,1) Prnp ^{-/-} Ischämie > Prnp ^{-/-} Sham (p=0,08)
StabW	0,26	0,13	0,07	0,16	-	-
SEM	0,15	0,06	0,03	0,07	-	-

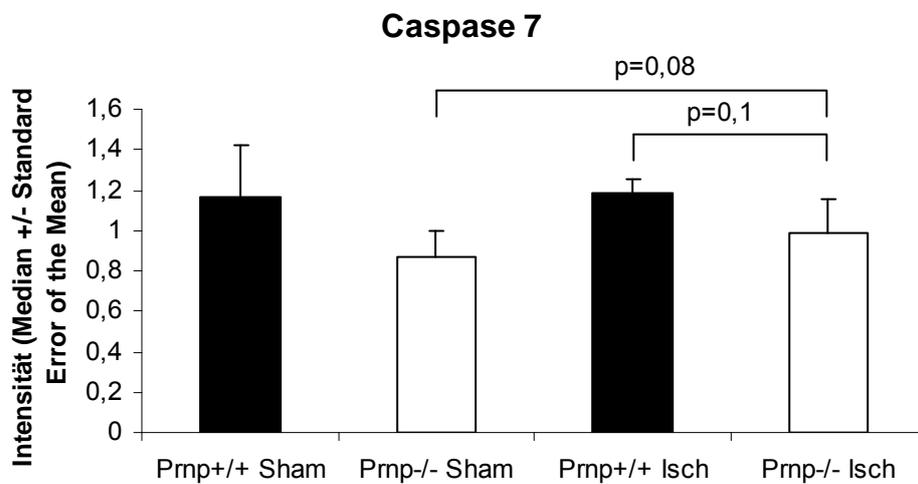


Abbildung 29: Caspase 7 (Beschreibung im Text)

Zusammenfassung: Apoptose-induzierende Caspasen:

Nach Shambehandlung zeigten die Prnp^{+/+}-Mäuse eine stärkere Expression der Initiatorcaspasen (Pro)caspase 8, Caspase 9 und 10 sowie der Effektorcaspasen 3 (aktiviert und gesamt), 6 und 7 als die Prnp^{-/-}-Mäuse (signifikante Unterschiede fanden sich bezüglich der Expression der Initiatorcaspasen Procaspase 8 und Caspase 10). Auch nach Ischämiebehandlung waren die Expressionslevel der Initiatorcaspasen (Pro)caspase 8, Caspase 9 und 10 sowie der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 in den Prnp^{+/+}-Tieren höher als in den Prnp^{-/-}-Tieren (ein Trend zeigte sich hier in Bezug auf die unterschiedliche Expression der Effektorcaspasen 3, 6 und 7). Die Aktivität der Caspase 3 zeigte nach einstündiger Ischämie und 4-stündiger Reperfusion kaum Unterschiede zwischen den Prnp^{+/+}-Mäusen und den Prnp^{-/-}-Mäusen.

Die Prnp^{+/+}-Tiere wiesen nach Ischämie teils etwas höhere (Initiatorcaspasen Procaspase 8 und Caspase 10; Effektorcaspase 6), teils niedrigere [Initiatorcaspasen 8 und 9; Effektorcaspase 3 (aktiviert)] und teils annähernd gleiche Caspase-Level [Effektorcaspasen 3 (gesamt) und 7], verglichen mit dem Shamzustand, auf. Hier zeigte sich weder Trend noch Signifikanz. In den Prnp^{-/-}-Mäusen fanden sich nach Ischämie höhere Level der Initiatorcaspasen (Pro)caspase 8, Caspase 9 und 10 sowie der Effektorcaspasen 3 (aktiviert und gesamt), 6 und 7 als im Shamzustand (ein Trend ergab sich hier bezüglich der unterschiedlichen Expression der Initiatorcaspase Procaspase 8 und der Effektorcaspasen 6 und 7).

In der ANOVA zeigten sowohl die Expressionslevel der Initiatorcaspasen (Pro)caspase 8 und Caspase 10 als auch die Expressionslevel der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 signifikante Unterschiede zwischen den vier Mausgruppen, wobei die Expressionsunterschiede bei den Effektorcaspasen 3 und 7 hoch signifikant waren.

[Alle Apoptose-Caspasen in der Summe waren sowohl im Shamzustand als auch nach Ischämie in den Prnp^{+/+}-Mäusen hoch signifikant stärker exprimiert als in den Prnp^{-/-}-Mäusen. In der Summe zeigten die Apoptose-Caspasen in den Prnp^{-/-}-Mäusen nach Ischämie einen hoch signifikanten Anstieg gegenüber dem Shamzustand. In den Prnp^{+/+}-Mäusen fand sich bei Summierung der Werte aller Caspasen kein signifikanter Unterschied zwischen Shamzustand und Ischämie (Abbildung 30)].

Summe aller Apoptose-Caspasen	Prnp ^{+/+} Sham (N=21)	Prnp ^{-/-} Sham (N=35)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=35)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=35)	Signifikanz	Trend
Median	1,17	0,92	1,22	1,07	Prnp ^{+/+} Sham > Prnp ^{-/-} Sham (p = 0,0009) Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{-/-} Ischämie (p = 0,01) Prnp ^{-/-} Ischämie > Prnp ^{-/-} Sham (p = 0,00023)	-
StabW	0,53	0,19	0,43	0,22		-
-	-	-	-	-		-

Abbildung 30: Summe aller Apoptose-Caspasen (Beschreibung im Text)

Überblick: Inflammatorische Caspasen: Neben den Apoptose-Caspasen ist die Gruppe der inflammatorischen Caspasen (Caspasen 4, 5, 11, 12 und 13) von Interesse, da sie in die Reifung von Cytokinen involviert sind. Von ihnen wurden die Caspasen 4, 5, 11 und 12 in dieser Arbeit untersucht. Es wurden folgende Intensitäten ermittelt (Abbildung 31, Abbildung 32, Abbildung 33, Abbildung 34):

Caspase 4	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	2,94	0,88	2,20	1,12	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{-/-} Ischämie (p=0,05)	ANOVA (p=0,06)
StabW	1,18	0,27	0,83	0,61	-	-
SEM	0,68	0,12	0,37	0,27	-	-

Caspase 4

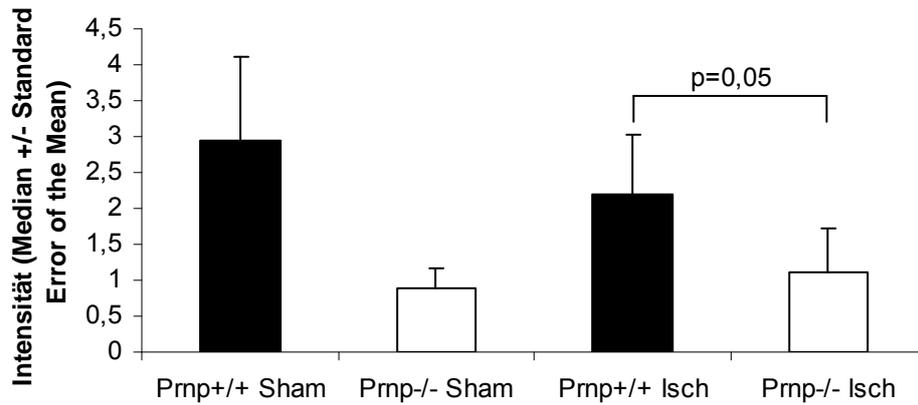


Abbildung 31: Caspase 4 (Beschreibung im Text)

Caspase	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
5						
Median	0,95	0,80	1,13	0,97	-	Prnp ^{-/-} Ischämie > Prnp ^{-/-} Sham (p=0,1)
StabW	0,61	0,13	0,25	0,23	-	-
SEM	0,35	0,06	0,11	0,10	-	-

Caspase 5

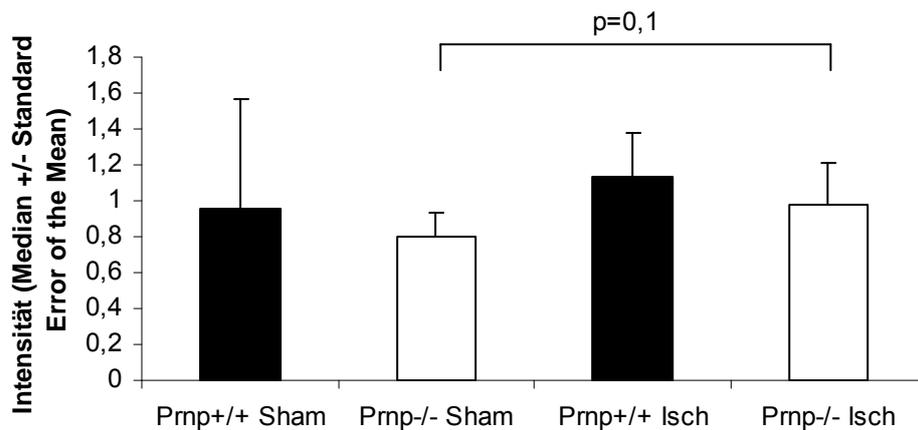


Abbildung 32: Caspase 5 (Beschreibung im Text)

Caspase 11	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,00	0,83	1,15	1,06	ANOVA (p=0,04)	-
StabW	0,21	0,16	0,06	0,19	-	-
SEM	0,12	0,07	0,03	0,08	-	-

Caspase 11

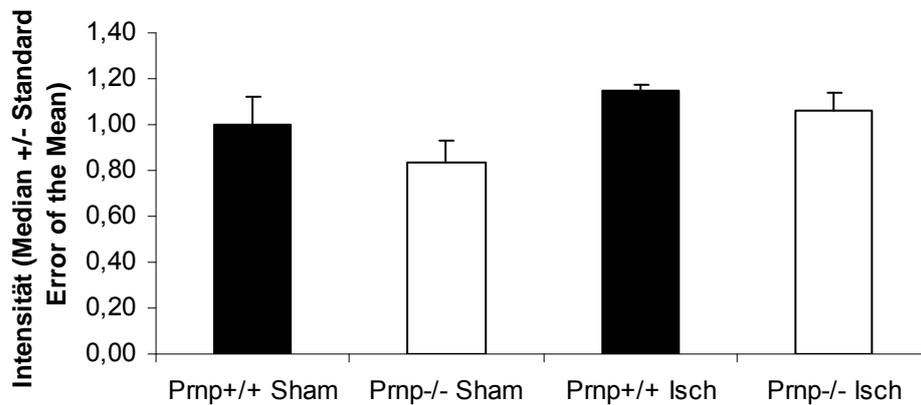


Abbildung 33: Caspase 11 (Beschreibung im Text)

Caspase 12	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,11	0,94	1,24	0,97	-	-
StabW	0,27	0,16	0,31	0,19	-	-
SEM	0,15	0,07	0,14	0,09	-	-

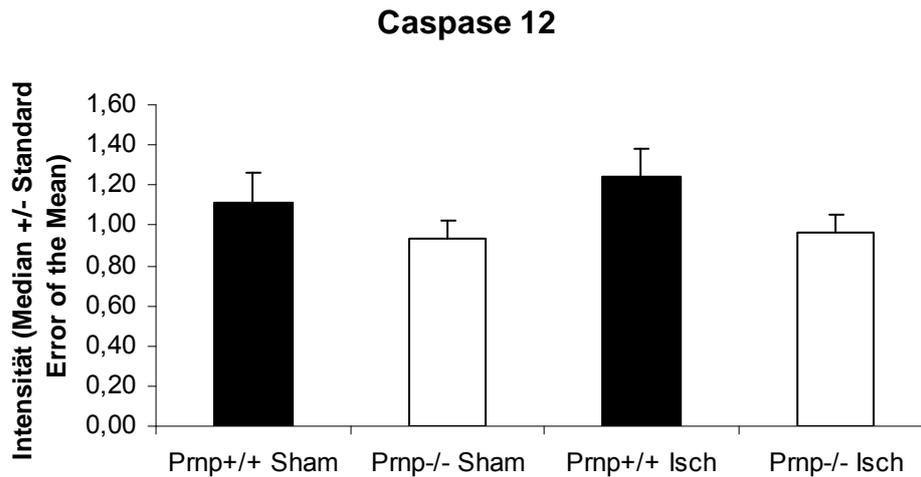


Abbildung 34: Caspase 12 (Beschreibung im Text)

Zusammenfassung: Inflammatorische Caspasen:

Die inflammatorischen Caspasen 4, 5, 11 und 12 zeigten nach Shambehandlung und nach Ischämiebehandlung in den Prnp^{+/+}-Mäusen höhere Proteinlevel als in den Prnp^{-/-}-Mäusen (ein Trend ergab sich bezüglich der unterschiedlichen Expression der Caspase 4 nach Ischämiebehandlung). In den Prnp^{+/+}-Tieren wiesen die Caspasen 5, 11 und 12 nach Ischämiebehandlung etwas höhere Level als nach Shambehandlung auf. Caspase 4 war in den Prnp^{+/+}-Ischämietieren etwas schwächer exprimiert als in den Prnp^{+/+}-Shamtieren (Unterschiede nicht signifikant).

In den Prnp^{-/-}-Tieren zeigten die Caspasen 4, 5 und 11 nach Ischämiebehandlung etwas höhere Level als nach Shambehandlung (ein Trend ergab sich hier bezüglich der unterschiedlichen Expression der Caspase 5). Die Caspase 12-Level unterschieden sich kaum zwischen den Prnp^{-/-}-Ischämietieren und den Prnp^{-/-}-Shamtieren.

In der ANOVA ergab sich in Bezug auf die Expressionsunterschiede der Caspase 4 zwischen den vier Mausgruppen ein Trend und in Bezug auf die Expressionsunterschiede der Caspase 11 eine Signifikanz.

2.1.2. Weitere pro-apoptotische Proteine

Übersicht: Als weitere pro-apoptotische Proteine, die in die Ischämie- und Bax-induzierte Apoptose involviert sind, wurden in dieser Arbeit die Proteine Bcl-10, SMAC/Diablo (SMAC: **S**econd **M**itochondria-derived **A**ctivator of **C**aspases), ARTS (**A**poptosis-**R**elated Protein in the **T**G β **S**ignalling pathway), AIF (**A**poptosis **I**nducing **F**actor), PAR4 (**P**rostate **A**poptosis **R**esponse **4**) und p53 untersucht. Abbildung 35 stellt die Einflüsse der Proteine Bcl-10, SMAC/Diablo, ARTS, AIF, PAR4 und p53 auf die Ischämie-induzierte Apoptose dar.

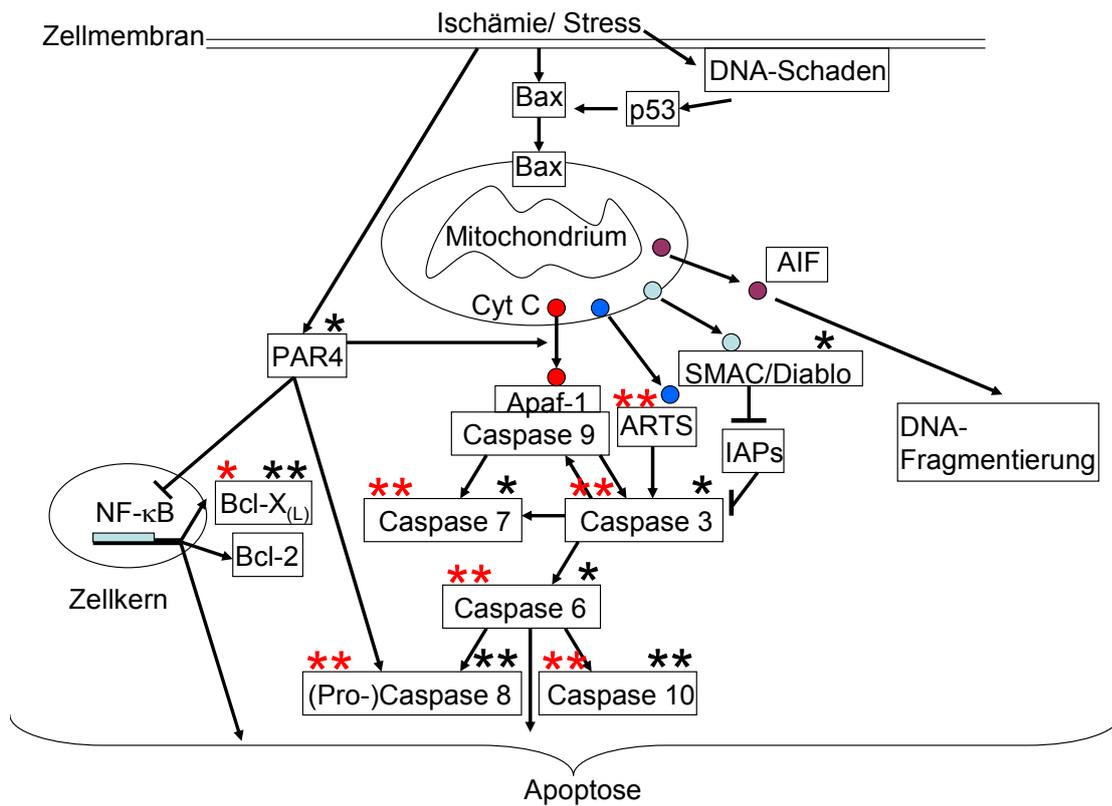


Abbildung 35: Einflüsse von Bcl-10, SMAC/Diablo, PAR4, p53 und AIF auf die Ischämie-induzierte Apoptose-Caspase-Kaskade (*=Trend im t-Test; **=Signifikanz im t-Test; *=Trend in der ANOVA; **=Signifikanz in der ANOVA)

→ Aktivierung —| Hemmung

2.1.2.1. SMAC/Diablo

Im Rahmen der Bax-induzierten Apoptose kommt es durch Perforation der äußeren Mitochondrienmembran zur Freisetzung des Proteins SMAC/Diablo aus den Mitochondrien. SMAC/Diablo kann daraufhin die IAPs (Inhibitoren der Apoptose-Proteine) neutralisieren und so verhindern, dass die Apoptosekaskade zu einem späteren Zeitpunkt gehemmt wird. Für SMAC/Diablo zeigten sich folgende Intensitäten (Abbildung 36):

SMAC/Diablo	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,13	0,99	1,10	0,97	-	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{-/-} Ischämie (p=0,06)
StabW	0,21	0,30	0,15	0,11	-	-
SEM	0,12	0,13	0,07	0,05	-	-

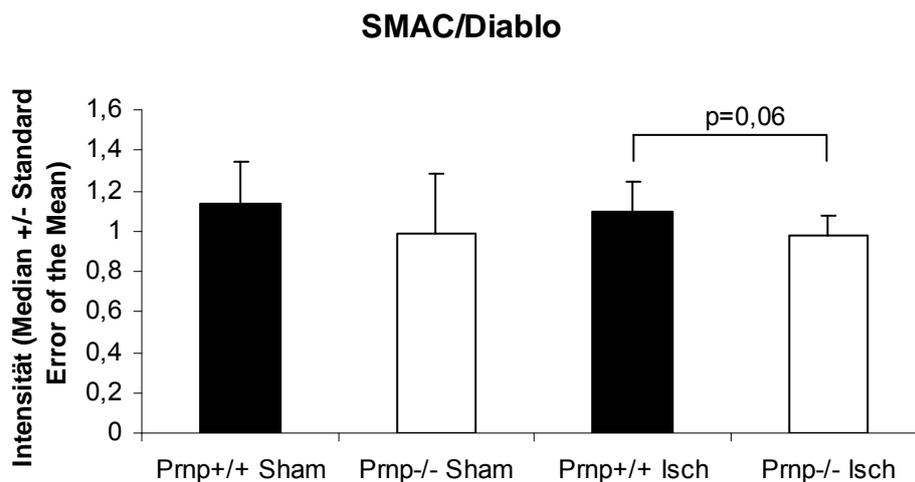


Abbildung 36: SMAC/Diablo (Beschreibung im Text)

Nach Shambehandlung und nach Ischämie waren die SMAC/Diablo-Proteinlevel in den Prnp^{+/+}-Tieren etwas höher als in den Prnp^{-/-}-Tieren (Trend in den Ischämiegruppen). Zwischen den Shamtieren und den Ischämietieren fanden sich weder in der Prnp^{+/+}-Mausgruppe noch in der Prnp^{-/-}-Mausgruppe signifikante Unterschiede.

2.1.2.2. ARTS

ARTS (**A**poptosis-**R**elated Protein in the **T**GF- β **S**ignaling pathway) ist ein pro-apoptotisches Protein, welches bei Stimulation des Zelltodesrezeptors TGF- β - und in geringerem Ausmaß auch bei anderen Apoptosestimuli - aus den Mitochondrien freigesetzt wird und über Aktivierung der Caspase 3 zur Apoptose führt.

Für ARTS ergaben sich folgende Intensitäten (Abbildung 37):

ARTS	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	2,45	0,95	1,31	1,00	ANOVA (p=0,02)	-
StabW	1,73	0,35	0,17	0,37	-	-
SEM	1,00	0,16	0,07	0,17	-	-

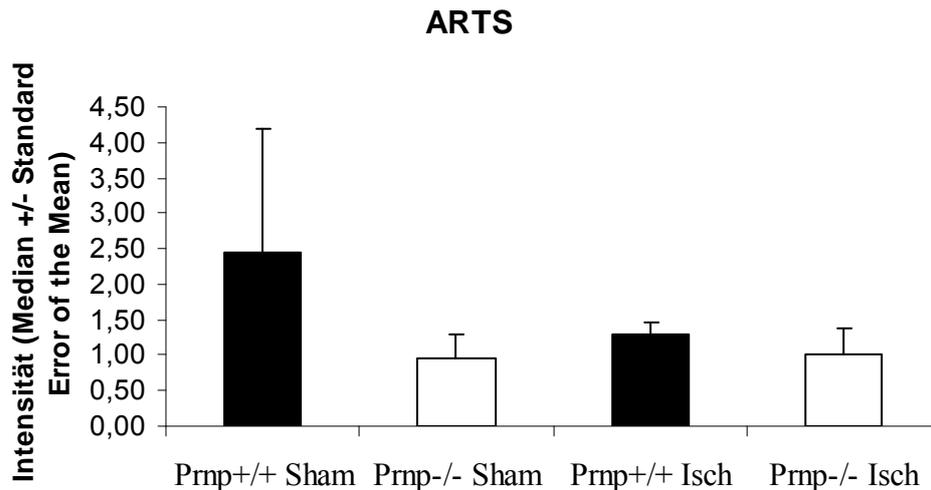


Abbildung 37: ARTS (Beschreibung im Text)

Nach Sham- und nach Ischämiebehandlung war ARTS in den Prnp^{+/+}-Mäusen stärker exprimiert als in den Prnp^{-/-}-Mäusen, wobei sich der Unterschied nach Shambehandlung stärker darstellte. Nach Ischämie fand sich in den Prnp^{+/+}-Mäusen ein geringerer ARTS-Level als nach Shambehandlung. In den Prnp^{-/-}-Mäusen unterschied sich die ARTS-Expression nach Shambehandlung kaum von der ARTS-Expression nach Ischämie. In der ANOVA ergab sich in Bezug auf die ARTS-Expressionsunterschiede zwischen den vier Mausgruppen eine Signifikanz.

2.1.2.3. PAR4 (*Prostate Apoptosis Response 4*)

PAR4 ist ein pro-apoptotisches Protein, das in Ischämie/Stress- und Glutamat-induzierte Apoptosekaskaden involviert ist. Transiente Frontalhirnischämie, Sauerstoffradikale und Calciumeinstrom führen zur verstärkten Expression von PAR-4. PAR-4 kann die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B unterdrücken und so zu einer Mindersynthese der anti-apoptotischen Faktoren Bcl-2 und Bcl-x_(L) führen. Außerdem beeinträchtigt PAR-4 die mitochondriale Funktionalität und verstärkt die Caspase-8-Aktivierung. Für PAR4 wurden folgende Intensitäten ermittelt (Abbildung 38):

PAR4	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,30	0,99	1,12	1,14	-	Prnp ^{-/-} Ischämie > Prnp ^{-/-} Sham (p=0,09)
StabW	0,23	0,23	0,54	0,15	-	-

SEM	0,13	0,10	0,24	0,07	-	-
-----	------	------	------	------	---	---

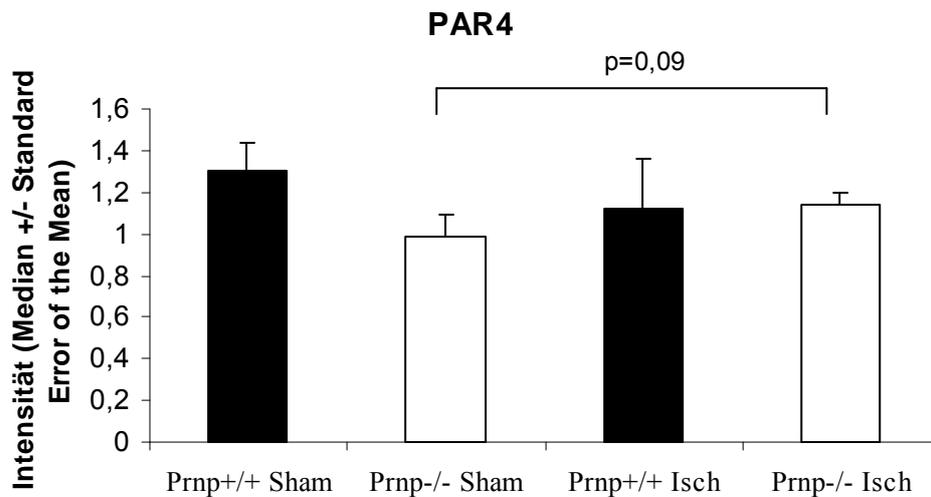


Abbildung 38: PAR4 (Beschreibung im Text)

PAR4 war im Shamzustand in den Prnp^{+/+}-Tieren etwas stärker exprimiert als in den Prnp^{-/-}-Tieren. Nach Ischämie fanden sich annähernd gleiche PAR4-Proteinlevel in den Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäusen. In den Prnp^{-/-}-Tieren stieg der PAR4-Expressionslevel nach Ischämiebehandlung gegenüber dem Shamzustand an (Trend). In den Prnp^{+/+}-Tieren fiel der PAR4-Proteinlevel nach Ischämiebehandlung gegenüber dem Shamzustand leicht ab.

2.1.2.4. Apoptosis Inducing Factor (AIF)

AIF gehört wie SMAC/Diablo und Cytochrom C zu den pro-apoptotischen Faktoren, die bei Ischämie- und Bax-induzierter Apoptose durch Perforation der äußeren Mitochondrienmembran aus den Mitochondrien freigesetzt werden. AIF wies folgende Intensitäten auf (Abbildung 39):

AIF (Apoptosis Inducing Factor)	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,26	0,93	1,36	1,63	-	-
StabW	0,88	0,13	0,36	0,58	-	-
SEM	0,51	0,06	0,16	0,26	-	-

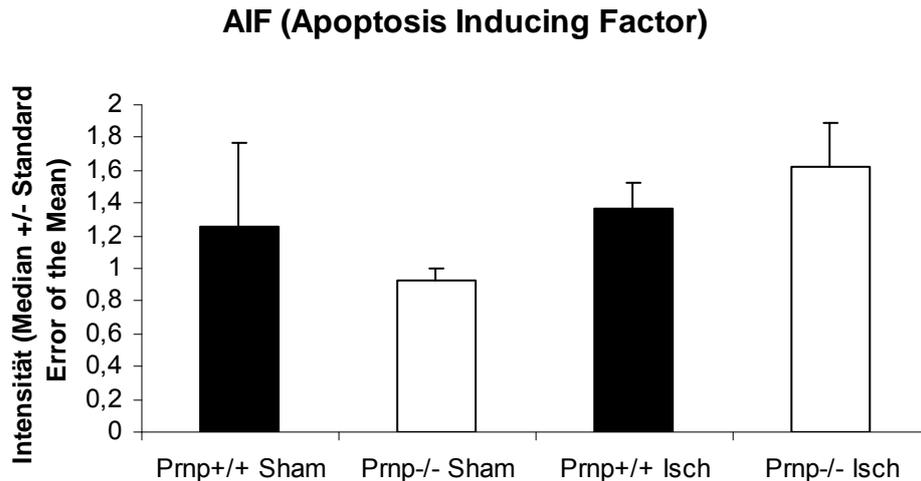


Abbildung 39: AIF (Beschreibung im Text)

Nach Shambehandlung zeigte AIF in den Prnp^{+/+}-Mäusen etwas höhere Level als in den Prnp^{-/-}-Mäusen. Nach Ischämie fanden sich in den Prnp^{-/-}-Mäusen etwas höhere AIF-Level als in den Prnp^{+/+}-Mäusen. Bei den Prnp^{+/+}-Tieren und bei den Prnp^{-/-}-Tieren waren die AIF-Level in den Ischämietieren etwas höher als in den Shamtieren, wobei in den Prnp^{-/-}-Tieren ein stärkerer Anstieg nach Ischämiebehandlung zu verzeichnen war.

2.1.2.6. p53 (siehe C. Ergebnisse, 3.2.4. Proteine, die sowohl antiproliferativ als auch pro-apoptotisch wirken: p53)

2.1.3 Anti-apoptotische Proteine

Übersicht: Von den anti-apoptotischen Komponenten, die in Bax- und Ischämie/Stress-induzierte Apoptose involviert sind, wurden in dieser Arbeit die Proteine Bcl-x_(L), DAPK und Cystatin A untersucht. Abbildung 40 stellt die Einflüsse von Bcl-x_(L), DAPK und Cystatin A auf die Bax-induzierte Apoptose dar.

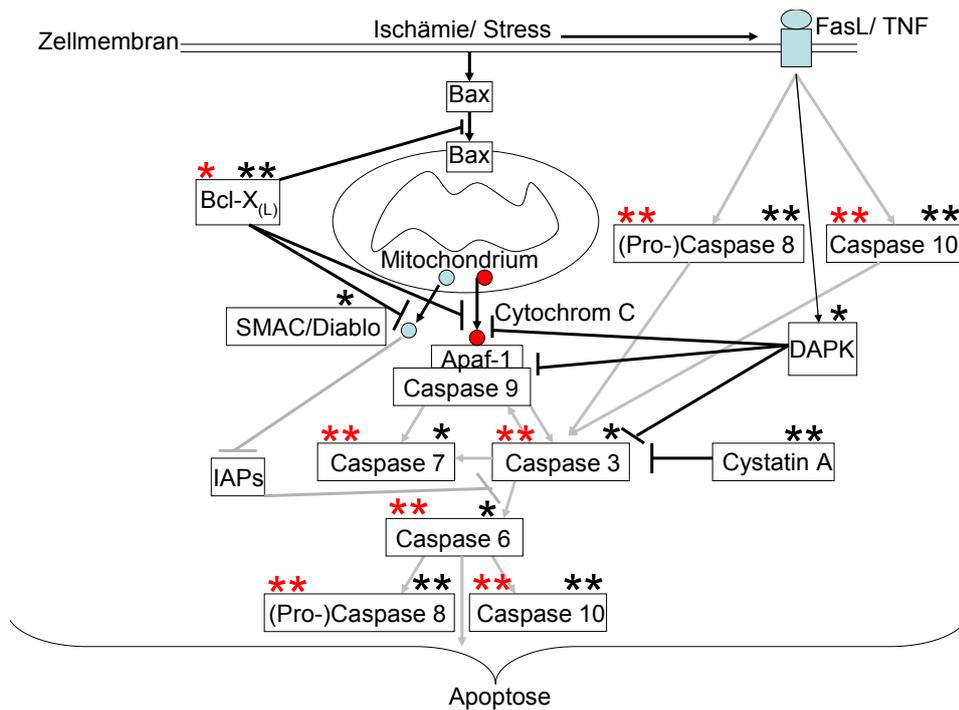


Abbildung 40: Einflüsse der untersuchten anti-apoptischen Proteine auf die Ischämie-induzierte Apoptose-Caspase-Kaskade (*=Trend im t-Test; **=Signifikanz im t-Test; *=Trend in der ANOVA; **=Signifikanz in der ANOVA)



2.1.3.1. Bcl-x und Bcl-x_L

Bcl-x ist ein Protein der Apoptose-regulierenden Bcl-2 Familie.

Das Bcl-x Gen kann durch alternatives Splicen für zwei verschiedene Proteine kodieren: Für das pro-apoptotische Bcl-x_S und für das anti-apoptotische Bcl-x_L. Das pro-apoptotische Bcl-x_S findet sich in hoher Konzentration in Zellen mit einem hohen Umsatz wie heranreifenden Lymphozyten; das anti-apoptotische Bcl-x_L findet sich hauptsächlich in langlebigen postmitotischen Zellen wie adultem Hirngewebe.

Bcl-x_L antagonisiert die pro-apoptotische Wirkung von Bax und unterbindet die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine wie SMAC/Diablo und Cytochrom C aus den Mitochondrien. Bcl-x_L hemmt unter anderem die Angliederung von Bax an die Mitochondrien, seine Konformationsänderung sowie seine Oligomerisierung.

Bcl-x und Bcl-x_L zeigten folgende Intensitäten (Abbildung 41, Abbildung 42):

Bcl-x	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,28	1,06	1,27	0,84	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{-/-} Ischämie (p=0,05)	ANOVA (p=0,1)
StabW	0,59	0,19	0,09	0,28	-	-
SEM	0,34	0,08	0,04	0,12	-	-

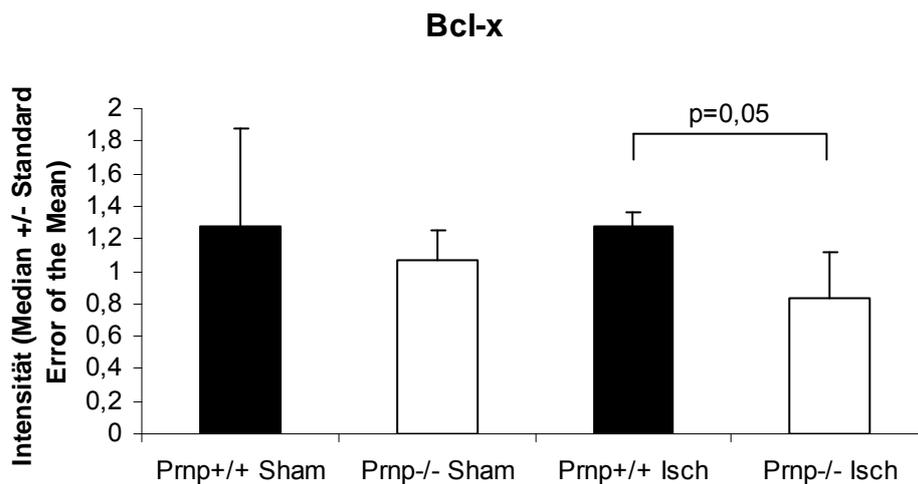


Abbildung 41: Bcl-x (Beschreibung im Text)

Bcl-x_L	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,94	0,81	1,11	0,99	-	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{-/-} Ischämie (p=0,08) ANOVA (p=0,08)
StabW	0,41	0,10	0,14	0,19	-	-
SEM	0,24	0,04	0,06	0,08	-	-

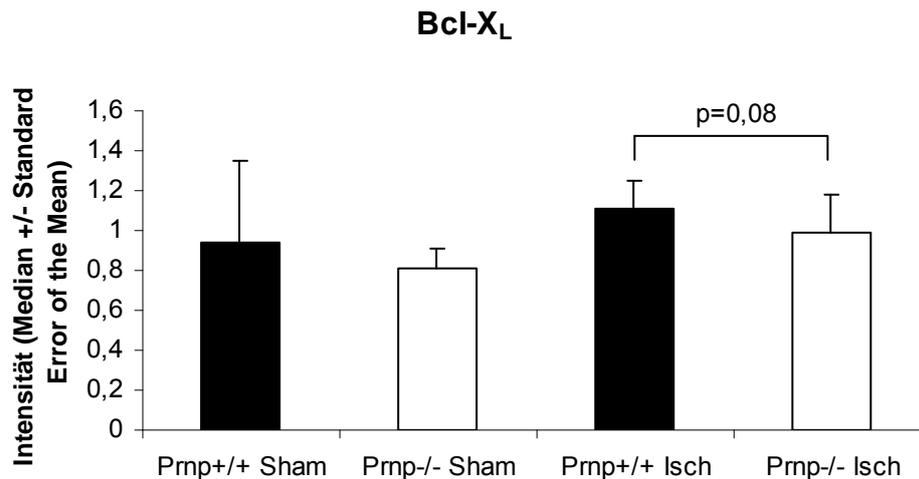


Abbildung 42: Bcl-x_L (Beschreibung im Text)

Zusammenfassung: Bcl-x und Bcl-x_L:

Nach Sham- und Ischämiebehandlung fanden sich in den Prnp^{+/+}-Tieren höhere Expressionslevel der Bax-antagonisierenden Proteine Bcl-x und Bcl-x_L als in den Prnp^{-/-}-Tieren (nach Ischämiebehandlung war der Unterschied bezüglich der Bcl-x-Expression signifikant und ergab einen Trend in Bezug auf die Bcl-x_L-Expression). Die Bcl-x-Expression war etwa gleich zwischen den Prnp^{+/+}-Ischämietieren und den Prnp^{+/+}-Shamtieren. Sie war etwas niedriger in den Prnp^{-/-}-Ischämietieren als in den Prnp^{-/-}-Shamtieren.

Die Bcl-x_L-Expression war in den Prnp^{+/+}-Tieren und in den Prnp^{-/-}-Tieren nach Ischämiebehandlung etwas höher als nach Shambehandlung.

In der ANOVA ergab sich sowohl bezüglich der Bcl-x- als auch bezüglich der Bcl-x_L-Expressionsunterschiede zwischen den vier Mausgruppen ein Trend.

2.1.3.2. DAPK (Klon DAPK 55)

DAPK ist eine Calcium/Calmodulin abhängige Serin/Threonin-Kinase. In der Maus konnten zwei Formen der DAPK identifiziert werden (DAPK- α und DAPK- β). Beide murinen DAPK-Formen wirken, im Gegensatz zur humanen DAPK, allerdings nicht pro-apoptotisch. Während die murine DAPK- α wenig Effekt auf TNF- α vermittelte Apoptose hat, besitzt die DAPK- β einen starken cytoprotektiven Effekt auf TNF- α behandelte Zellen. Dies kommt durch eine Inhibierung der Aktivität der Caspasen 3 und 9 sowie eine Hemmung der mitochondrialen Cytochrom C-Freisetzung zustande. Für die murine DAPK fanden sich folgende Intensitäten (Abbildung 43):

DAPK	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,18	0,87	1,18	1,10	-	Prnp ^{+/+} Sham > Prnp ^{-/-} Sham (p=0,08)
StabW	0,05	0,17	0,48	0,21	-	-
SEM	0,03	0,08	0,21	0,09	-	-

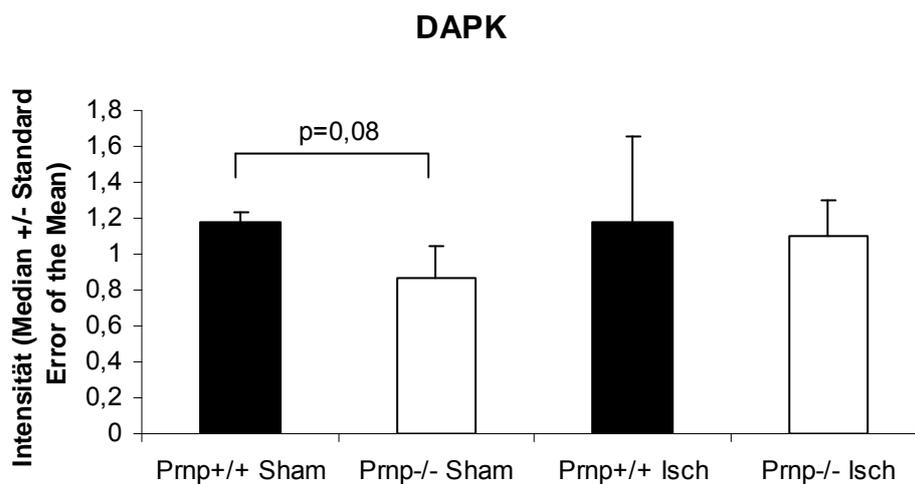


Abbildung 43: DAPK (Beschreibung im Text)

DAPK zeigte nach Shambehandlung in den Prnp^{+/+}-Mäusen eine stärkere Expression als in den Prnp^{-/-}-Mäusen (Trend). Nach Ischämiebehandlung war die DAPK-Expression in den Prnp^{+/+}-Mäusen geringfügig höher als in den Prnp^{-/-}-Mäusen. Bei den Prnp^{+/+}-Mäusen bestand kein Unterschied zwischen den Ischämietieren und den Shamtieren in Bezug auf die DAPK-Expression. Bei den Prnp^{-/-}-Mäusen wiesen die Ischämietiere etwas höhere DAPK-Level als die Shamtiere auf.

2.1.3.3. Cystatin A

Cystatin A ist ein Cystein-Protease-Inhibitor. Als anti-apoptotisches Protein schützt Cystatin A vor UV-induzierter Apoptose durch Hemmung der Caspase 3-Aktivität.

Für Cystatin A wurden folgende Intensitäten ermittelt (Abbildung 44):

Cystatin A	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,30	0,90	1,15	0,99	Prnp ^{+/+} Sham > Prnp ^{-/-} Sham (p=0,03)	-
StabW	0,05	0,21	0,86	0,17	-	-
SEM	0,03	0,10	0,38	0,07	-	-

Cystatin A

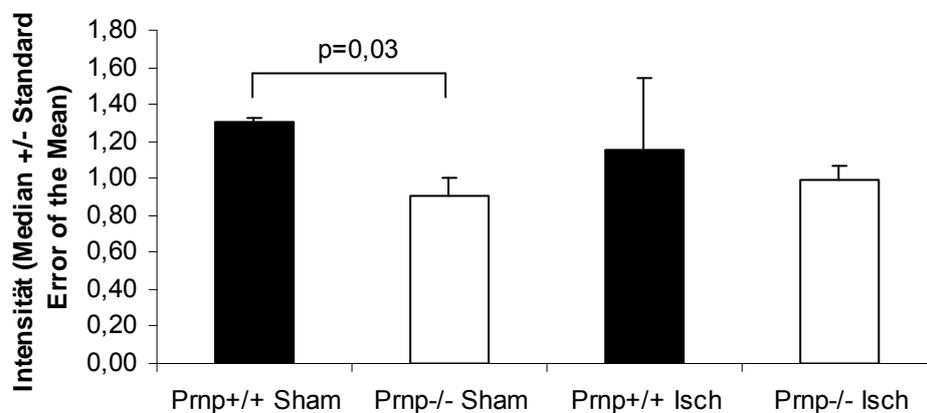


Abbildung 44: Cystatin A (Beschreibung im Text)

Cystatin A war nach Shambehandlung in den Prnp^{+/+}-Mäusen signifikant stärker exprimiert als in den Prnp^{-/-}-Mäusen. Nach Ischämie fanden sich etwas höhere Cystatin A-Level in den Prnp^{+/+}-Mäusen als in den Prnp^{-/-}-Mäusen. Bei den Prnp^{+/+}-Tieren waren die Cystatin A-Level nach Ischämiebehandlung etwas niedriger als nach Shambehandlung. Bei den Prnp^{-/-}-Tieren war Cystatin A in den Ischämietieren etwas stärker exprimiert als in den Shamtieren.

2.1.4. Proteine mit pro- und anti-apoptotischer Wirkung

Übersicht: Die Proteine DAXX (death domain associated protein xx) und Bcl-10 besitzen sowohl pro- als auch anti-apoptotische Einflüsse. Abbildung 45 stellt die Einflüsse von DAXX und Bcl-10 auf die Apoptose dar.

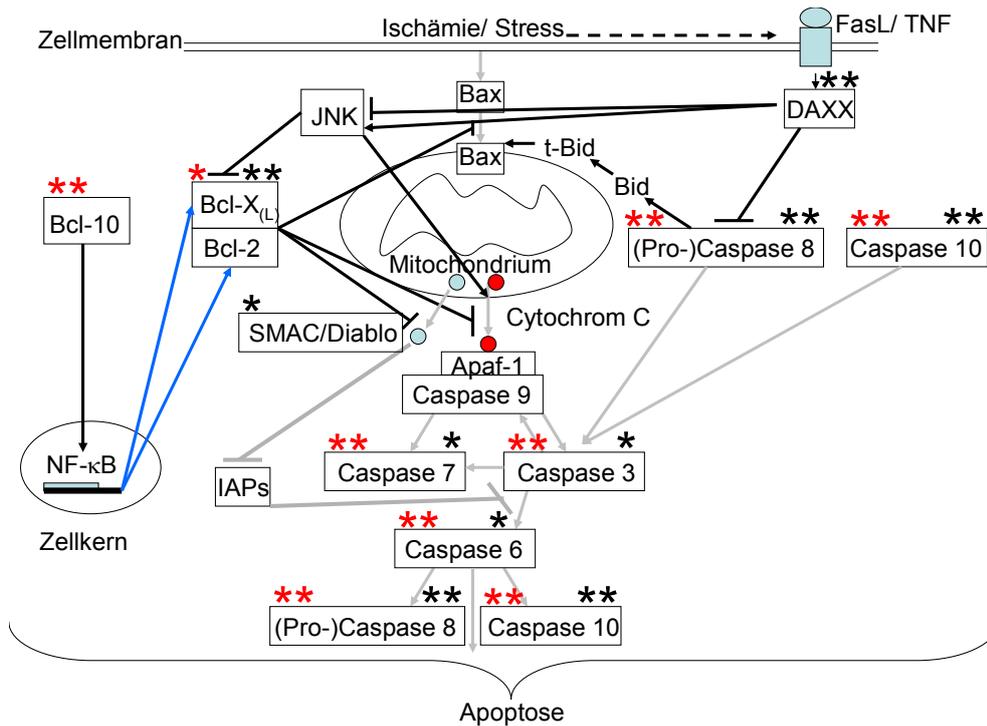


Abbildung 45: Einflüsse von DAXX und Bcl-10 auf die Apoptose-Caspase-Kaskade (*=Trend im t-Test; **=Signifikanz im t-Test; *=Trend in der ANOVA; **=Signifikanz in der ANOVA)



2.1.4.1. DAXX

Eine Überexpression von DAXX kann einerseits die FAS-vermittelte Apoptose verstärken und die Jun N-terminal Kinase (JNK) aktivieren.

Andererseits sensibilisiert eine Hemmung der DAXX-Synthese die Zellen gegenüber FAS- und Stress-induzierter Apoptose, die einhergeht mit Caspase-Aktivierung (unter anderem Caspasen 8 und 3), Cytochrom C-Freisetzung und JNK-Aktivierung.

Für DAXX ergaben sich folgende Intensitäten (Abbildung 46):

DAXX	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,19	0,98	1,19	1,23	Prnp ^{+/+} Sham > Prnp ^{-/-} Sham (p=0,04)	-
StabW	0,08	0,22	1,68	0,30	Prnp ^{-/-} Ischämie > Prnp ^{-/-} Sham (p=0,05)	-
SEM	0,05	0,10	0,75	0,13	-	-

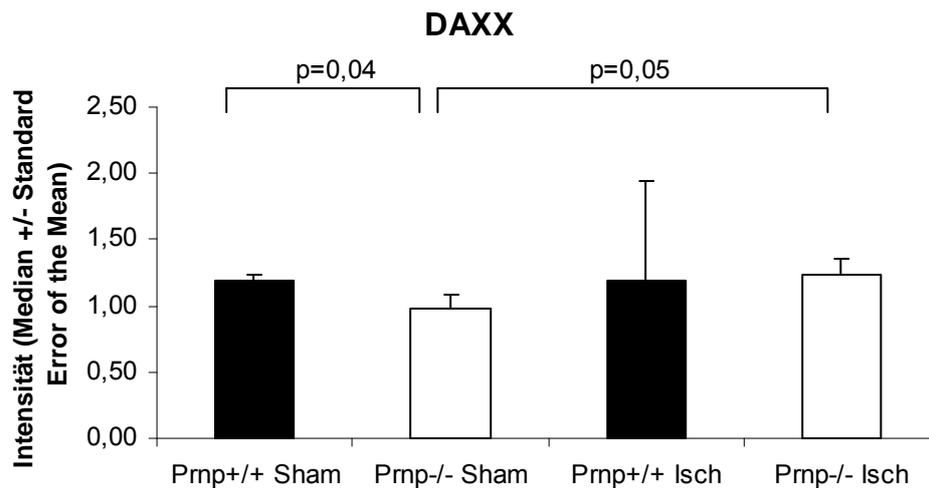


Abbildung 46: DAXX (Beschreibung im Text)

Die DAXX-Proteinlevel waren in den Prnp^{+/+}-Shammäusen signifikant höher als in den Prnp^{-/-}-Shammäusen. Nach Ischämiebehandlung zeigte sich wenig Unterschied zwischen den Prnp^{+/+}-Tieren und den Prnp^{-/-}-Tieren. In den Prnp^{-/-}-Ischämietieren fanden sich signifikant höhere DAXX-Level als in den Prnp^{-/-}-Shamtieren. Bei den Prnp^{+/+}-Tieren unterschied sich der DAXX-Expressionslevel zwischen den Sham- und Ischämietieren nicht.

2.1.4.2. Bcl-10

Bcl-10 kann über die Induktion des Transkriptionsfaktors NF-κB, welcher die Transkription pro- und anti-apoptotischer Proteine aktivieren kann, sowohl pro- als auch anti-apoptotische Effekte entfalten. Für Bcl-10 ergaben sich folgende Werte (Abbildung 47):

Bcl-10	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,19	0,83	1,15	0,95	ANOVA (p=0,02)	
StabW	0,27	0,19	0,04	0,16	-	
SEM	0,15	0,08	0,02	0,07	-	

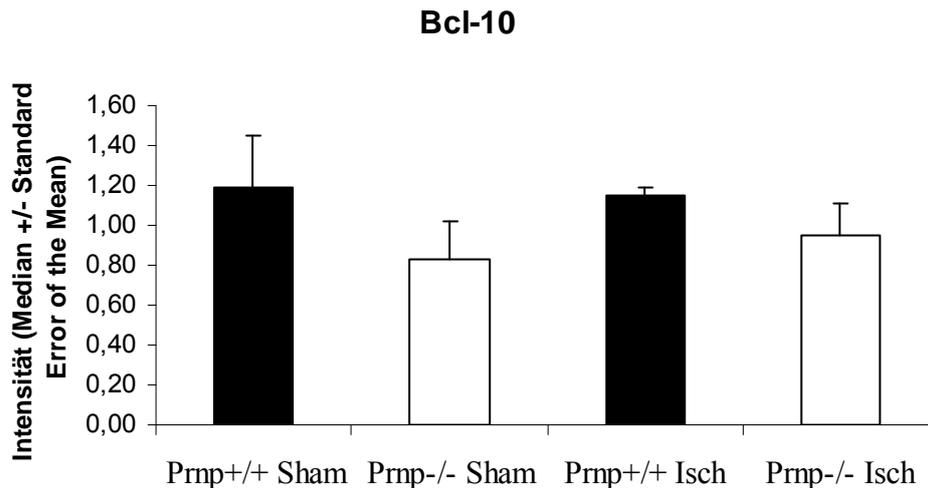


Abbildung 47: Bcl-10 (Beschreibung im Text)

Bcl-10 war nach Sham- und nach Ischämiebehandlung in den Prnp^{+/+}-Mäusen stärker exprimiert als in den Prnp^{-/-}-Mäusen. Nach Ischämiebehandlung stieg der Bcl-10-Level in den Prnp^{-/-}-Mäusen gegenüber dem Shamzustand leicht an, während er sich in den Prnp^{+/+}-Mäusen nach Ischämiebehandlung kaum gegenüber dem Shamzustand veränderte. In der ANOVA ergab sich eine Signifikanz in Bezug auf die unterschiedlichen Bcl-10-Expressionslevel in den vier Mausgruppen.

2.2. Zellzyklus-assoziierte Proteine

In dieser Arbeit wurden mehrere zellproliferationsfördernde und antiproliferative Proteine in Bezug auf ihre Expressionslevel untersucht. Speziell die Zellzyklus-Proteine des Cdk/Rb/E2F-Signalwegs (Abbildung 48) zeigten Auffälligkeiten beim Vergleich der vier Mausgruppen.

2.2.1. Zellproliferative Proteine

Übersicht: Zu den untersuchten proliferationsfördernden Proteinen des Cdk/Rb/E2F-Signalwegs gehören im Einzelnen die Phosphatase Cdc25, die „Cyclin Dependent Kinasen“ Cdk4 und Cdk6, die Proteine Cyclin D₁, Retinoblastom-phospho (Rbp) und Cyclin A.

Cdc25 aktiviert den Cdk4/Cdk6/Cyclin D₁-Komplex. Der aktivierte Cdk4/Cdk6/Cyclin D₁-Komplex phosphoryliert das Retinoblastom-Protein und aktiviert so den Transkriptionsfaktor E2F, der die Expression von Genen für DNA-Replikation und Zellproliferation einleitet. Eines der durch E2F aktivierten Gene ist das Cyclin A-Gen.

Abbildung 48 stellt die Zusammenhänge zwischen den untersuchten proliferationsfördernden Zellzyklusproteinen dar.

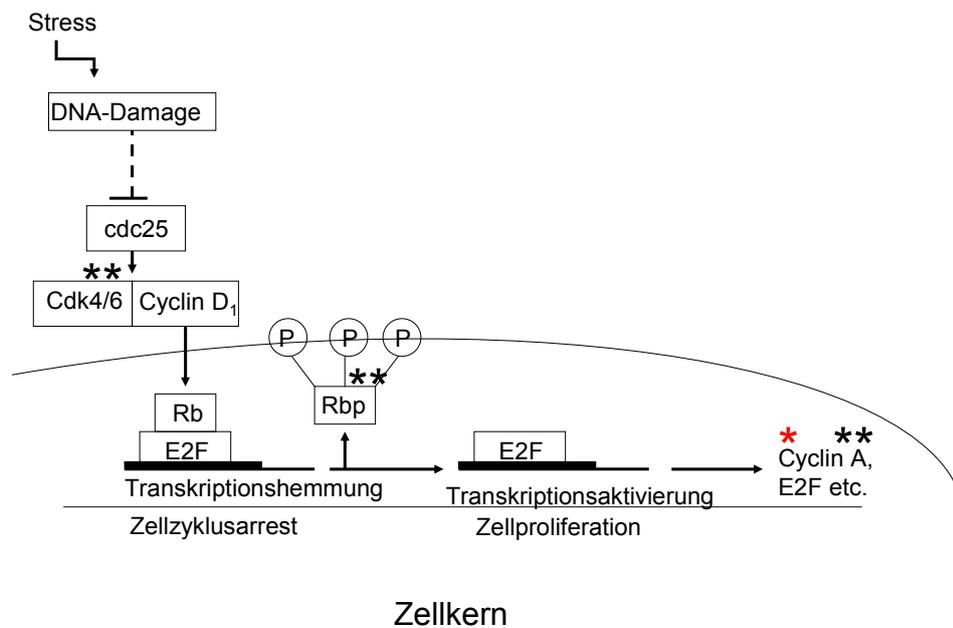
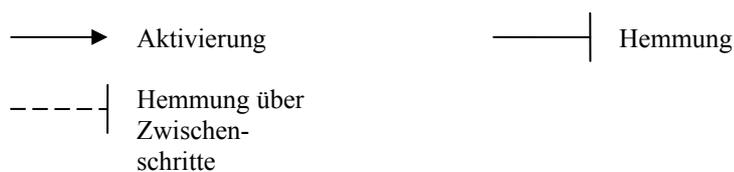


Abbildung 48: Einflüsse der untersuchten proliferationsfördernden Zellzyklusproteine auf den Cdk/Rb/E2F-Signalweg (*=Trend im t-Test; **=Signifikanz im t-Test; *=Trend in der ANOVA; **=Signifikanz in der ANOVA; P=phosphoryliert)



Die untersuchten zellproliferationsfördernden Proteine zeigten folgende Intensitäten (Abbildung 49, Abbildung 50, Abbildung 51, Abbildung 52, Abbildung 53, Abbildung 54, Abbildung 55):

Cdc25	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,77	1,15	1,25	0,97	-	-
StabW	0,44	0,43	1,51	0,11	-	-
SEM	0,26	0,19	0,68	0,05	-	-

Cdc25

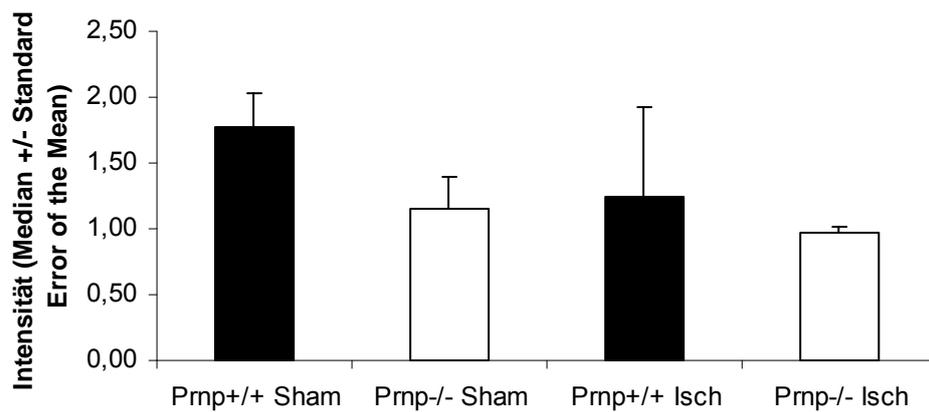


Abbildung 49: Cdc25 (Beschreibung im Text)

Cdk4	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,08	0,97	1,07	0,96	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{-/-} Ischämie (p=0,04)	
StabW	0,08	0,32	0,08	0,10	-	-
SEM	0,04	0,14	0,04	0,04	-	-

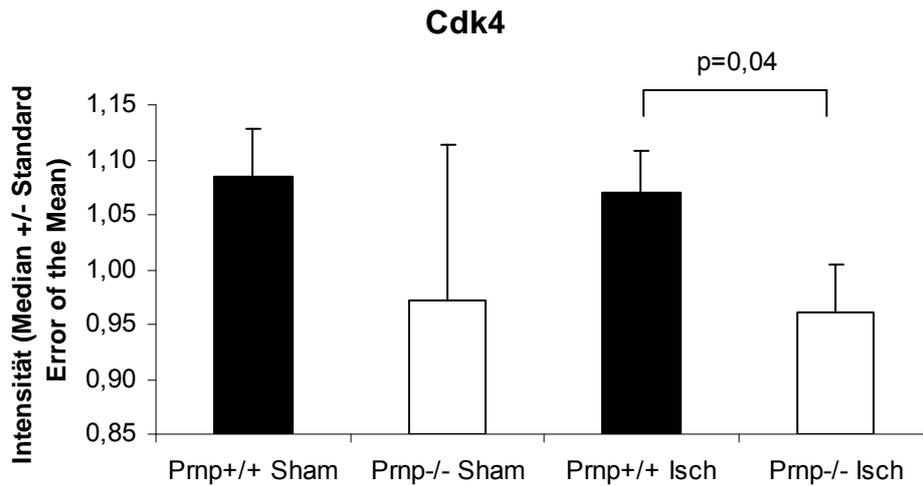


Abbildung 50: Cdk4 (Beschreibung im Text)

Cdk6	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	2,17	1,10	1,43	1,09	Prnp ^{+/+} Sham>Prnp ^{-/-} Sham (p=0,03)	-
StabW	0,35	0,45	1,80	3,03	-	-
SEM	0,20	0,20	0,80	1,36	-	-

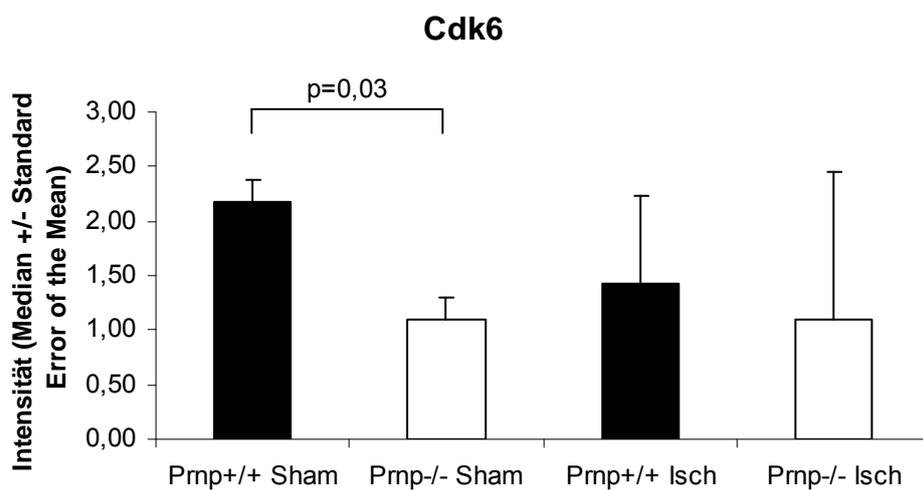


Abbildung 51: Cdk6 (Beschreibung im Text)

Cyclin D₁	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,11	1,24	0,97	0,91	-	-
StabW	2,17	2,06	0,19	0,24	-	-
SEM	1,25	0,92	0,09	0,11	-	-

Cyclin D₁

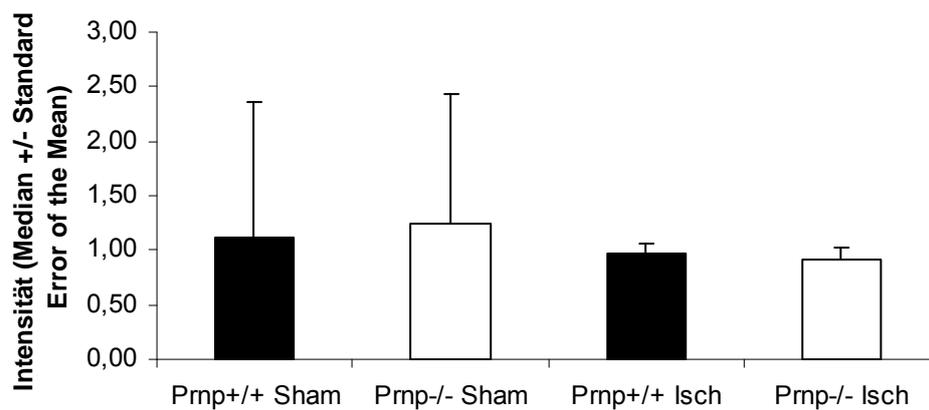


Abbildung 52: Cyclin D₁ (Beschreibung im Text)

Cyclin A	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,02	0,88	1,33	1,03	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{-/-} Ischämie (p=0,05)	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{+/+} Sham (p=0,1) ANOVA (p=0,09)
StabW	0,12	0,23	0,33	0,29	-	-
SEM	0,07	0,10	0,15	0,13	-	-

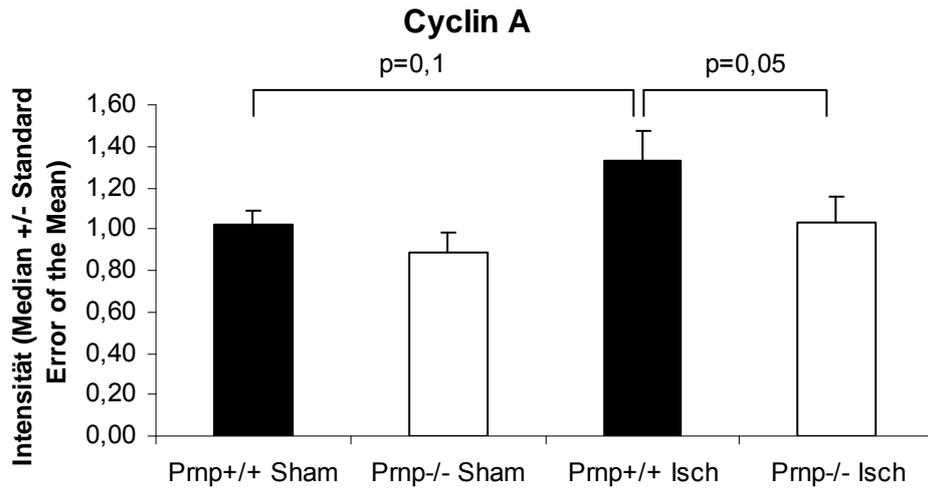


Abbildung 53: Cyclin A (Beschreibung im Text)

Retino- blastoma- phospho (Rbp)	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,02	0,91	0,62	0,62	Prnp ^{-/-} Sham > Prnp ^{-/-} Ischämie (p=0,05)	-
StabW	0,14	0,12	0,57	0,31	-	-
SEM	0,08	0,06	0,25	0,14	-	-

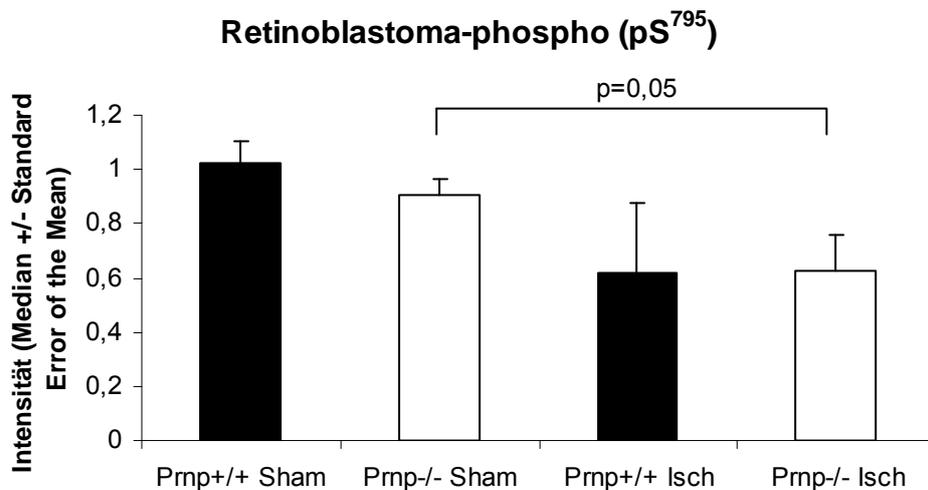


Abbildung 54: Retinoblastoma-phospho (Beschreibung im Text)

E2F	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,20	0,99	1,04	1,08	-	-
StabW	0,09	0,17	0,57	0,31	-	-
SEM	0,09	0,13	0,05	0,05	-	-

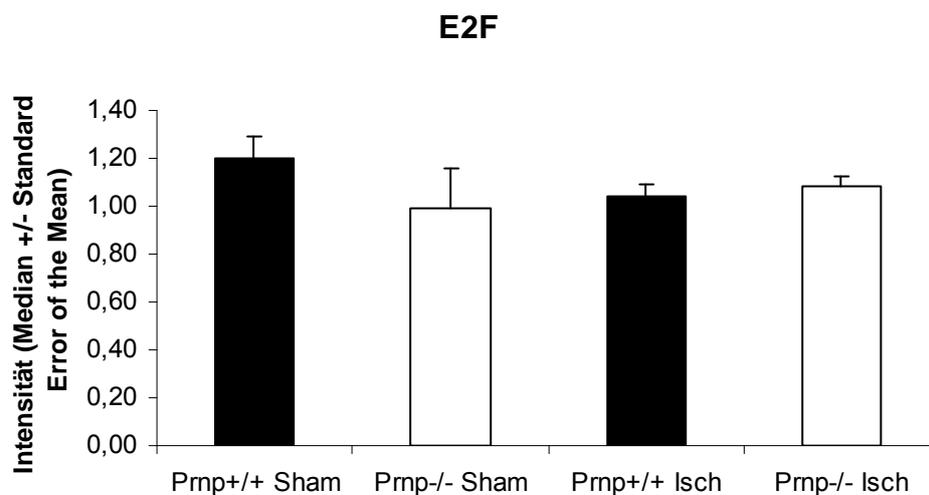


Abbildung 55: E2F (Beschreibung im Text)

Zusammenfassung: Zellproliferationsfördernde Proteine:

Cdc25, Cdk4/6, Rbp, E2F und Cyclin A waren nach Shambehandlung im Hirn der Prnp^{+/+}-Mäuse stärker exprimiert als im Hirn der Prnp^{-/-}-Mäuse (ein signifikanter Unterschied ergab sich bezüglich der Cdk6-Expression). Cyclin D₁ zeigte bei sehr hoher Standardabweichung nach Shambehandlung etwas höhere Proteinlevel in den Prnp^{-/-}-Mäusen als in den Prnp^{+/+}-Mäusen. Nach Ischämiebehandlung fanden sich im Hirn der Prnp^{+/+}-Tiere höhere Expressionslevel der Proteine Cdc25, Cdk4/6, Cyclin D₁ und Cyclin A als im Hirn der Prnp^{-/-}-Mäuse (signifikante Unterschiede ergaben sich bezüglich der Cdk4- und Cyclin A-Expression). Das Rbp und der Transkriptionsfaktor E2F zeigten nach Ischämie kaum Unterschiede zwischen Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäusen.

Cdc25, Cyclin D₁ und Rbp waren in den Shammäusen etwas stärker exprimiert als in den Ischämiemäusen (ein signifikanter Unterschied ergab sich bezüglich der Rbp-Expression zwischen den beiden Prnp^{-/-}-Mausgruppen).

Cdk4 wies in den Prnp^{+/+}- und in den Prnp^{-/-}-Gruppen kaum Unterschiede zwischen den Ischämie- und Shammäusen auf.

Cdk6 war in den Prnp^{+/+}-Shammäusen etwas stärker exprimiert als in den Prnp^{+/+}-Ischämiemäusen. In den Prnp^{-/-}-Mausgruppen zeigte Cdk6 kaum Unterschiede zwischen den Sham- und Ischämiemäusen.

E2F zeigte in den Prnp^{+/+}-Mäusen nach Shamoperation etwas höhere und in den Prnp^{-/-}-Mäusen etwas niedrigere Level als nach Ischämiebehandlung.

Cyclin A wies höhere Expressionslevel in den Ischämiemäusen als in den Shammäusen auf (Trend zwischen den beiden Prnp^{+/+}-Mausgruppen).

2.2.2. Antiproliferative Proteine

Übersicht: Von den antiproliferativen Proteinen des Cdk/Rb/E2F-Signalwegs wurden in dieser Arbeit die Kinasen Chk1, Chk2, das Protein p57^{kip2} und die Histondeacetylase 1 (HDAC 1) untersucht.

Die Kinasen Chk1/2 hemmen die Phosphatase Cdc25 und damit die Aktivierung des Cdk4/Cdk6/Cyclin D₁-Komplexes. Dies führt zu einer verminderten Phosphorylierung des Rb und hemmt so die Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F. Histondeacetylase 1 (HDAC 1) verhindert ebenfalls die Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F. P57^{kip2} hemmt den Cdk2/Cyclin E-Komplex, wodurch es zur Minderphosphorylierung des Rb-Proteins und zur Minderaktivierung von E2F kommt.

Abbildung 56 stellt die Einflüsse der untersuchten antiproliferativen Proteine auf den Cdk/Rb/E2F-Signalweg dar.

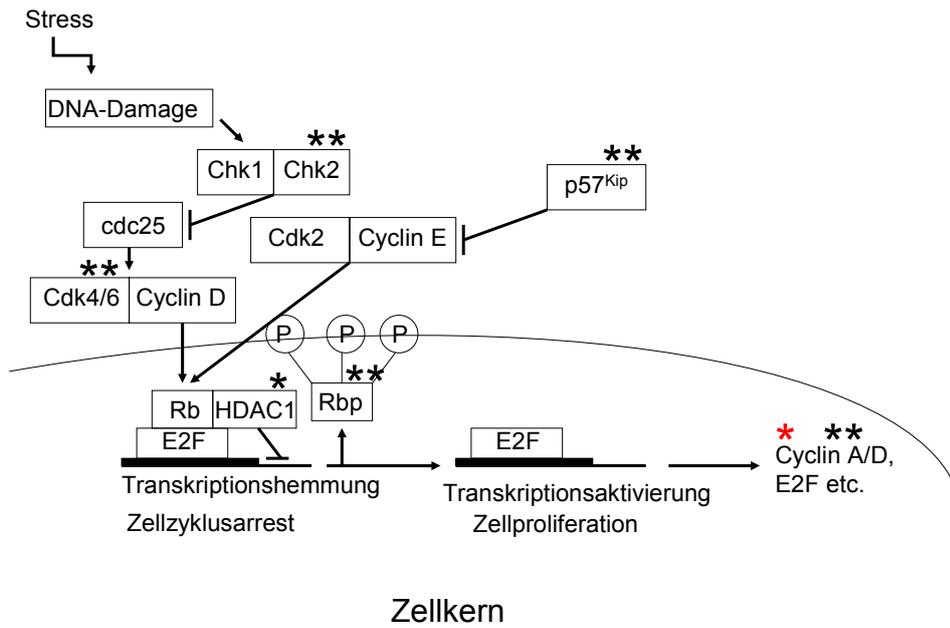


Abbildung 56: Einflüsse der antiproliferativen Proteine auf den Rb-E2F-Signalweg (*=Trend im t-Test; **=Signifikanz im t-Test; *=Trend in der ANOVA; **=Signifikanz in der ANOVA; P=phosphoryliert)

Aktivierung

 Hemmung

Für die untersuchten antiproliferativen Proteine wurden folgende Intensitäten ermittelt (Abbildung 57, Abbildung 58, Abbildung 59, Abbildung 60):

Chk1	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,77	0,91	1,01	0,94	-	-
StabW	0,29	0,60	0,20	0,16	-	-
SEM	0,17	0,27	0,09	0,07	-	-

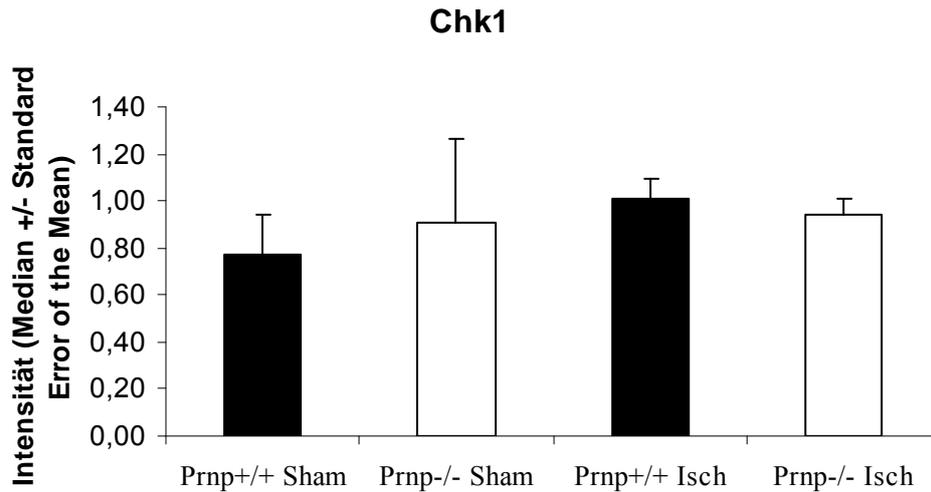


Abbildung 57: Chk1 (Beschreibung im Text)

Chk2	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,82	0,97	1,03	0,99	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{+/+} Sham (p=0,05)	-
StabW	0,07	0,40	0,18	0,18	-	-
SEM	0,04	0,18	0,08	0,08	-	-

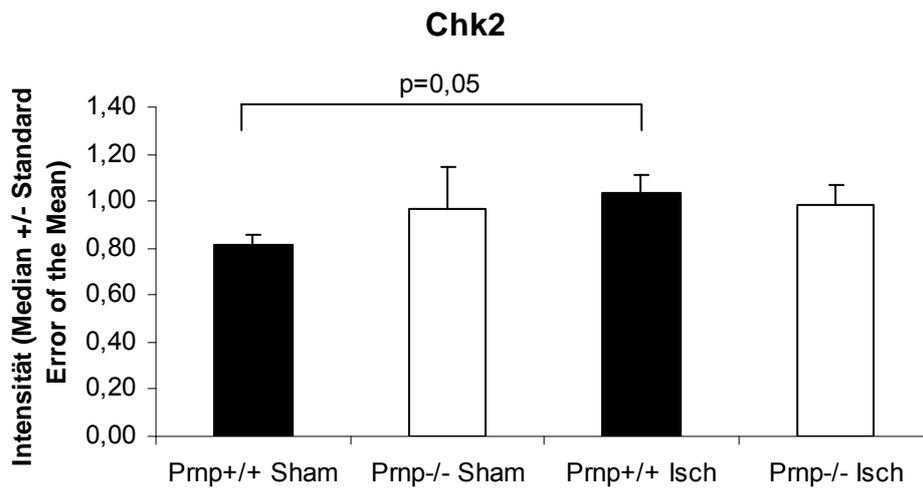


Abbildung 58: Chk2 (Beschreibung im Text)

p57 ^{kip2}	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham	Prnp ^{+/+} Ischämie	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend

		(N=5)	(N=5)			
Median	0,75	0,99	0,85	0,77	Prnp ^{-/-} Sham > Prnp ^{-/-} Ischämie (p=0,05)	-
StabW	0,25	0,24	0,18	0,16	-	-
SEM	0,15	0,11	0,08	0,07	-	-

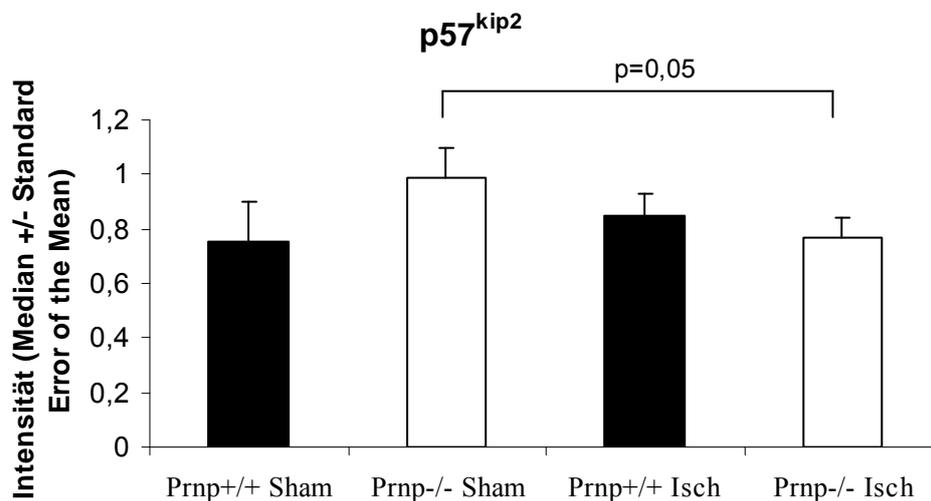


Abbildung 59: p57^{kip2} (Beschreibung im Text)

HDAC 1 (Histon Deacetylase 1)	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,94	1,01	0,94	1,06	-	Prnp ^{-/-} Ischämie > Prnp ^{+/+} Ischämie (p=0,06)
StabW	0,16	0,20	0,13	0,08	-	-
SEM	0,09	0,09	0,06	0,03	-	-

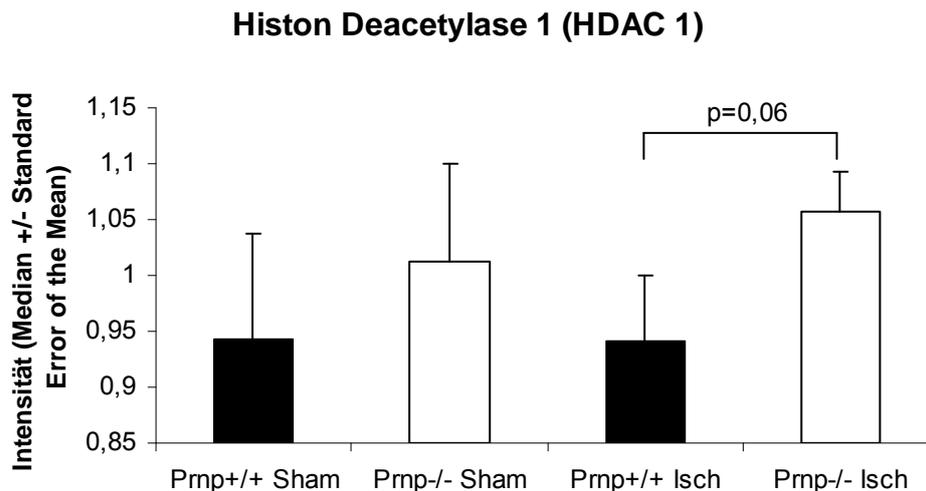


Abbildung 60: HDAC 1 (Beschreibung im Text)

Zusammenfassung: Antiproliferative Proteine:

Nach Shamoperation zeigten Chk1, Chk2, p57^{kip2} und HDAC 1 etwas höhere Level in den Prnp^{-/-}-Mäusen als in den Prnp^{+/+}-Mäusen.

Nach Ischämiebehandlung wies Chk1 geringfügig höhere Proteinlevel in den Prnp^{+/+}-Mäusen als in den Prnp^{-/-}-Mäusen auf.

Der Chk2-Expressionslevel unterschied sich nach Ischämiebehandlung zwischen Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäusen kaum.

P57^{kip2} wies nach Ischämiebehandlung in den Prnp^{+/+}-Tieren schwach höhere Proteinlevel als in den Prnp^{-/-}-Tieren auf.

HDAC 1 war unter Ischämiebedingungen im Hirn der Prnp^{-/-}-Mäuse etwas stärker exprimiert als im Hirn der Prnp^{+/+}-Mäuse (Trend).

Der Chk1-Expressionslevel war in den Prnp^{+/+}-Mäusen nach Ischämiebehandlung etwas höher als nach Shambehandlung und unterschied sich in den Prnp^{-/-}-Mäusen kaum zwischen Shamtieren und Ischämietieren.

Die Chk2-Expression war in den Prnp^{+/+}-Mäusen nach Ischämiebehandlung signifikant höher als unter Shambedingungen. Bei den Prnp^{-/-}-Mäusen fand sich wenig Unterschied zwischen Ischämie- und Shamtieren in Bezug auf die Chk2-Expression.

Die Prnp^{-/-}-Mäuse wiesen nach Ischämiebehandlung signifikant niedrigere p57^{kip2}-Level auf als unter Shambedingungen.

In den Prnp^{+/+}-Mäusen war der p57^{kip2}-Level nach Ischämiebehandlung etwas höher als nach Shambehandlung.

Der HDAC 1-Level unterschied sich wenig zwischen Sham- und Ischämietieren.

2.2.3. Proteine, die sowohl proliferativ als auch antiproliferativ wirken: C-Abl

C-Abl ist eine Tyrosin-Kinase, deren physiologische Funktion vieldeutig ist. Je nach intrazellulärer Lokalisation kann c-Abl proliferative/anti-apoptotische oder antiproliferative/pro-apoptotische Effekte auf die Zelle haben. Eine zytosolische Lokalisation hat überwiegend proliferative und anti-apoptotische Auswirkungen. Wird c-Abl in Folge von zellulärem Stress und DNA-Schädigung in den Zellkern transloziert, wirkt es dort antiproliferativ und pro-apoptotisch. Abbildung 61 stellt die mögliche Wirkung von c-Abl auf Zellproliferation und Apoptose dar.

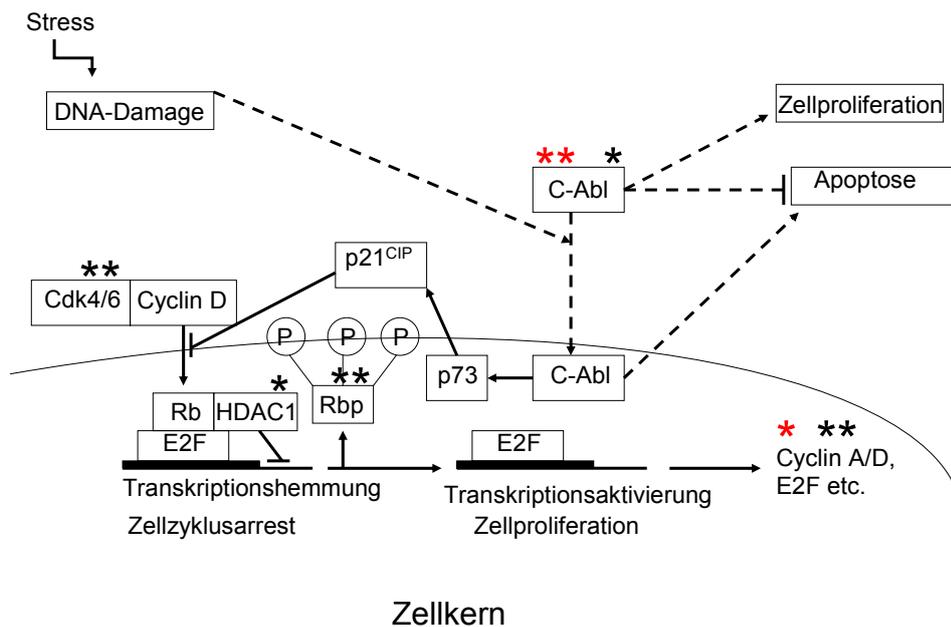
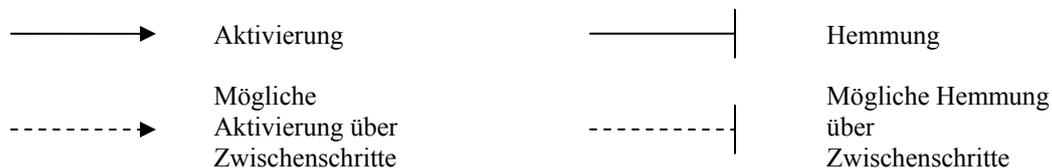


Abbildung 61: Mögliche Wirkung von c-Abl auf den Cdk/Rb/E2F-Signalweg, Zellproliferation und Apoptose (*=Trend im t-Test; **=Signifikanz im t-Test; *=Trend in der ANOVA; **=Signifikanz in der ANOVA; P=phosphoryliert)



C-Abl zeigte folgende Intensitäten (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.):

c-Abl	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,30	1,00	1,23	1,04	ANOVA (p=0,02)	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{-/-} Ischämie (p=0,06)
StabW	0,29	0,10	0,07	0,19	-	-
SEM	0,17	0,05	0,03	0,09	-	-

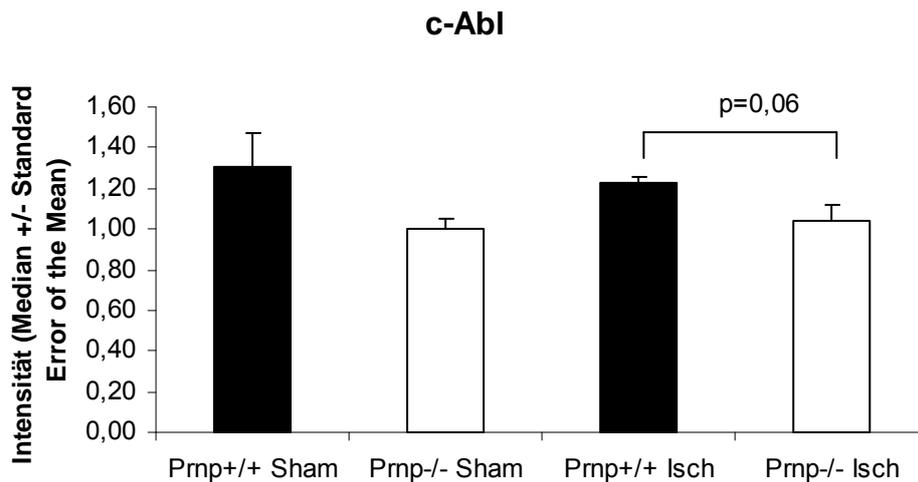


Abbildung 62: C-Abl (Beschreibung im Text)

C-Abl zeigte nach Sham- und nach Ischämiebehandlung im Hirn der Prnp^{+/+}-Mäuse höhere Expressionslevel als im Hirn der Prnp^{-/-}-Mäuse (Trend nach Ischämiebehandlung). Die Prnp^{+/+}-Mäuse wiesen nach Ischämiebehandlung geringfügig schwächere c-Abl-Level auf als nach Shambehandlung. Bei den Prnp^{-/-}-Mäuse ließ sich wenig Unterschied zwischen den Sham- und den Ischämietieren in Bezug auf die c-Abl-Expression feststellen. In der ANOVA ergab sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der c-Abl-Expression zwischen den vier Mausgruppen.

2.2.4. Proteine, die antiproliferativ und pro-apoptotisch wirken: p53

Übersicht: Der Transkriptionsfaktor p53 nimmt sowohl auf den Zellzyklus als auch auf die Bax-induzierte Apoptose stimulierenden Einfluss (siehe auch C. Ergebnisse, 2.1.2. Weitere pro-apoptotische Proteine). Bei DNA-Schäden kann es zudem die Proteinsynthese und den Zellzyklus anhalten. Dies erfolgt über eine Expressionssteigerung des Proteins p21^{CIP}, welches den Cdk4/Cdk6/Cyclin D₁-Komplex hemmt und so eine Hypophosphorylierung des Retinoblastom-Proteins sowie eine verminderte Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F bewirkt. Abbildung 63 stellt den p53-induzierten Signalweg dar.

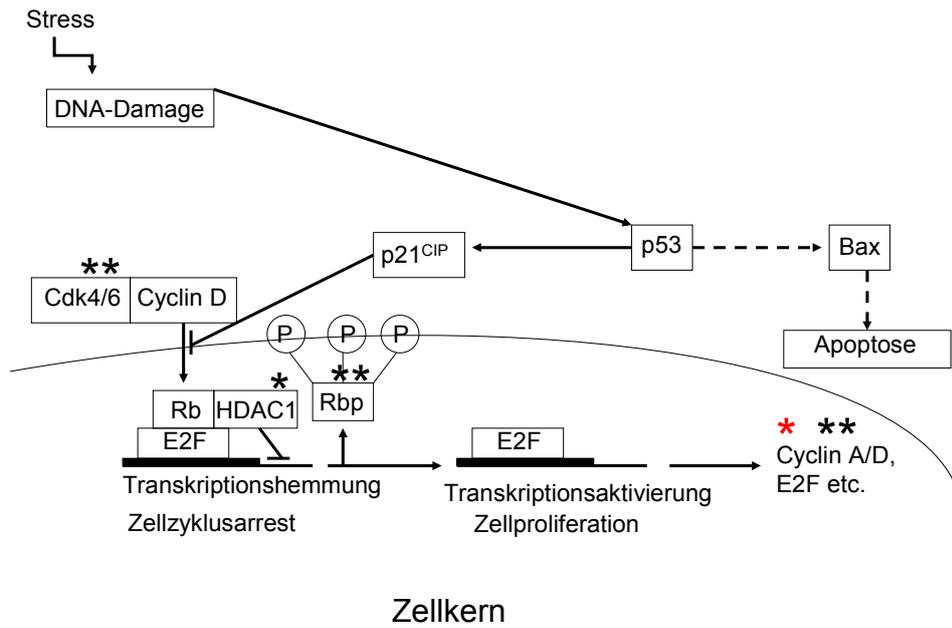
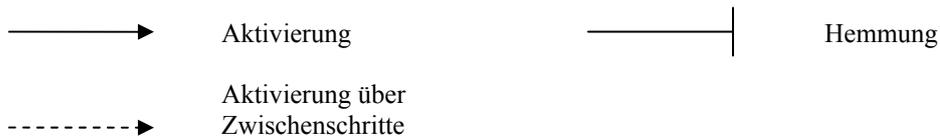


Abbildung 63: P53-induzierter Signalweg (*=Trend im t-Test; **=Signifikanz im t-Test; *=Trend in der ANOVA; **=Signifikanz in der ANOVA; P=phosphoryliert)



Für p53 ergaben sich folgende Intensitäten (Abbildung 64):

p53	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,87	0,82	0,77	0,80	-	-
StabW	0,09	0,28	0,16	0,22	-	-
SEM	0,05	0,13	0,07	0,10	-	-

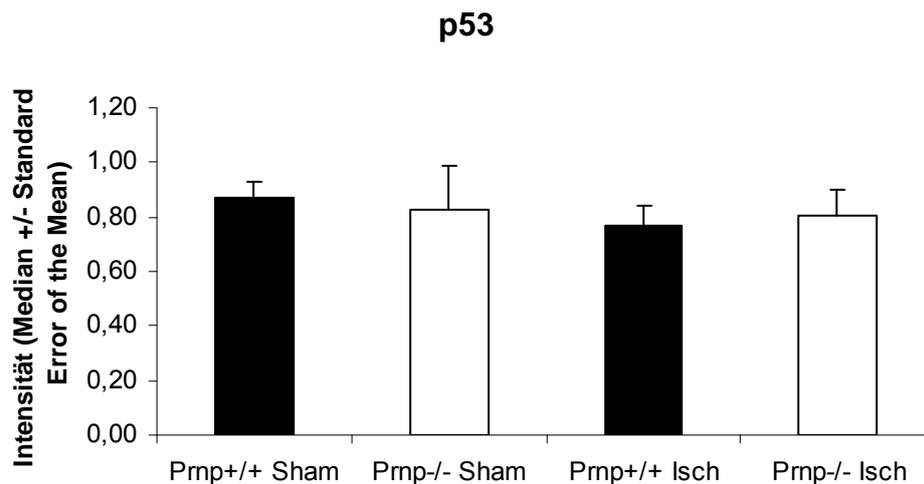


Abbildung 64: p53 (Beschreibung im Text)

In Bezug auf die p53-Expression zeigten sich nach Shambehandlung und nach Ischämiebehandlung kaum Unterschiede zwischen den Prnp^{+/+}-Mäusen und den Prnp^{-/-}-Mäusen. In den Prnp^{+/+}-Mäusen fanden sich nach Ischämie etwas niedrigere p53-Level als nach Shambehandlung. Bei den Prnp^{-/-}-Tieren unterschieden sich die p53-Level kaum zwischen den Shamtieren und den Ischämietieren.

2.3. Spezielle Proteine der neuronalen Signaltransduktion

2.3.1. NMDAR 2A

Der NMDA-Rezeptor ist ein ionotroper Rezeptor für den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat.

Bei Aktivierung fungiert er als unselektiver Kationen-Kanal, der vor allem Natrium- und Calciumionen in die Zelle einströmen und Kaliumionen ausströmen lässt. Der Calciumeinstrom durch den NMDA-Rezeptor spielt eine kritische Rolle in der synaptischen Plastizität, einem zellulären Mechanismus für Lernen und Gedächtnis.

Der NMDA-Rezeptor ist ein Heterodimer, bestehend aus je zwei obligatorischen NR1 und zwei regional unterschiedlich stark exprimierten NR2-Einheiten.

Die NR2-Untereinheiten binden Glutamat und existieren in den Isoformen NR2A-NR2D. Sie kontrollieren die elektrophysiologischen Eigenschaften des NMDA-Rezeptors. Die NR2A-Untereinheit findet sich hauptsächlich in reifen Neuronen.

Für die Proteinexpressionslevel der NR2A-Untereinheit des NMDA-Rezeptors wurden mit Hilfe der Protein-Microarrays folgende Intensitäten ermittelt (Abbildung 65):

NMDA-Rezeptor 2A	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,69	1,01	0,95	0,90	-	Prnp ^{-/-} Sham > Prnp ^{+/+} Sham (p=0,09)
StabW	0,09	0,24	0,20	0,29	-	-
SEM	0,05	0,11	0,09	0,13	-	-

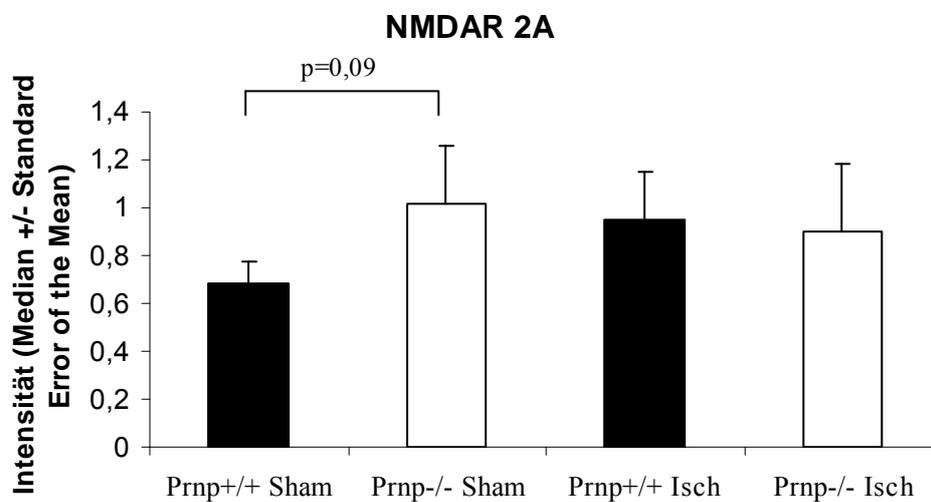


Abbildung 65: NMDAR 2A (Beschreibung im Text)

Die Untereinheit des NMDA-Rezeptors NR2A war in der Prnp^{-/-}-Shammausgruppe stärker exprimiert als in der Prnp^{+/+}-Shammausgruppe (Trend). Nach Ischämiebehandlung unterschieden sich die NR2A-Level nur wenig zwischen den Prnp^{-/-}-Mäusen und den Prnp^{+/+}-Mäusen. In den Prnp^{+/+}-Mäusen stieg der NR2A-Level nach Ischämiebehandlung gegenüber dem Shamzustand leicht an. In den Prnp^{-/-}-Mäusen fiel der NR2A-Level nach Ischämiebehandlung gegenüber dem Shamzustand leicht ab.

2.3.2. Glutaminsäuredecarboxylase

Glutaminsäuredecarboxylase ist ein Enzym, das die Umwandlung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat zum hemmenden Transmitter GABA (γ -Amino-Buttersäure) katalysiert.

Die Glutaminsäuredecarboxylase zeigte folgende Intensitäten (Abbildung 66):

Glutaminsäure-decarboxylase	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,94	1,04	0,92	0,99	-	Prnp ^{-/-} Ischämie > Prnp ^{+/+} Ischämie (p=0,08)
StabW	0,42	0,17	0,20	0,29	-	-
SEM	0,24	0,08	0,03	0,04	-	-

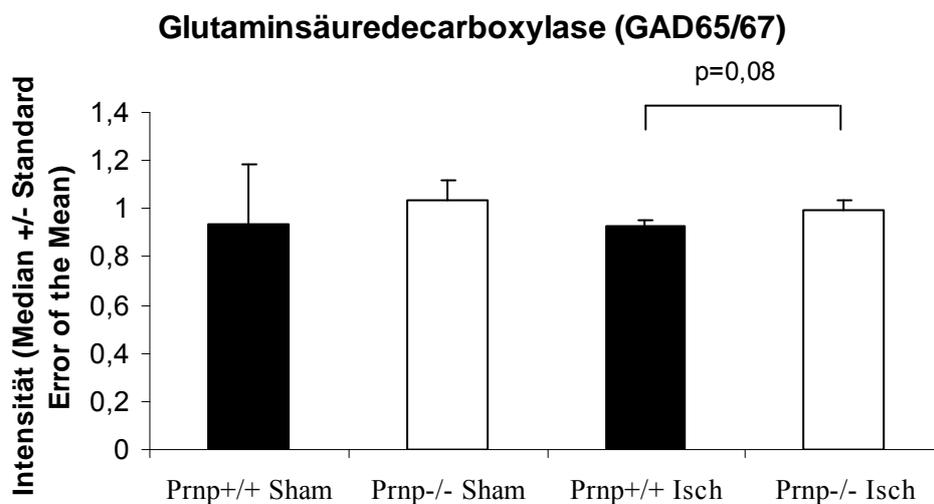


Abbildung 66: Glutaminsäuredecarboxylase (GAD65/67) (Beschreibung im Text)

Die Glutaminsäuredecarboxylase war sowohl nach Shambehandlung als auch nach Ischämiebehandlung (Trend) in den Prnp^{-/-}-Mäusen geringfügig stärker exprimiert als in den Prnp^{+/+}-Mäusen.

Zwischen den Sham- und Ischämietieren fanden sich kaum Unterschiede.

2.3.3. α 1-Syntrophin

α 1-Syntrophin ist ein Dystrophin-assoziiertes Adapterprotein. Dystrophin und seine assoziierten Proteine wurden ursprünglich in der Skelettmuskulatur als membranstabilisierender Proteinkomplex identifiziert. Dieser Proteinkomplex existiert auch in vielen Nicht-Muskelzellen, einschließlich neuronalen Synapsen, und kann dort als Gerüst für intrazelluläre Signaltransduktionswege fungieren. Es kann beispielsweise an Natriumionenkanäle binden und diese mit anderen Proteinen verknüpfen.

Im Hirngewebe ist der Wasserkanal Aquaporin 4 über einen α 1-Syntrophin-Anker in den perivaskulären Membrandomänen der Astrozyten verankert. In Folge von transientser

cerebraler Ischämie löst sich der AQP 4-Kanal von seinem $\alpha 1$ -Syntrophin-Anker, der selbst in der Membran verbleibt. Durch Deletion des $\alpha 1$ -Syntrophingens und vermindertes Auftreten perivaskulärer AQP 4-Kanäle kann die Entstehung eines Hirnödems nach transients cerebraler Ischämie abgeschwächt werden.

Für $\alpha 1$ -Syntrophin fanden sich folgende Intensitäten (Abbildung 67):

$\alpha 1$ -Syntrophin	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,90	1,08	0,95	1,16	Prnp ^{-/-} Ischämie > Prnp ^{+/+} Ischämie (p=0,03)	ANOVA (p=0,06)
StabW	0,20	0,17	0,06	0,22	-	-
SEM	0,12	0,08	0,03	0,10	-	-

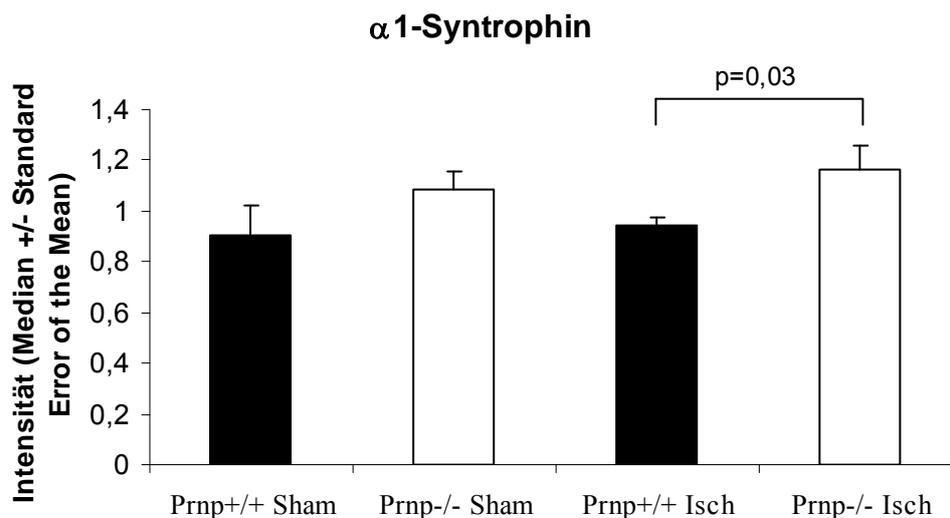


Abbildung 67: $\alpha 1$ -Syntrophin (Beschreibung im Text)

$\alpha 1$ -Syntrophin wies nach Ischämie- und nach Shambehandlung in den Prnp^{-/-}-Mäusen höhere Proteinlevel als in den Prnp^{+/+}-Mäusen auf (signifikanter Unterschied nach Ischämiebehandlung). Bei den Prnp^{-/-}-Mäusen fanden sich nach Ischämie geringfügig höhere $\alpha 1$ -Syntrophin-Level als nach Shamoperation. Bei den Prnp^{+/+}-Mäusen unterschieden sich Sham- und Ischämietiere kaum in Bezug auf ihre $\alpha 1$ -Syntrophin-Level. In der ANOVA zeigte sich ein Trend in Bezug auf die unterschiedliche $\alpha 1$ -Syntrophin-Expression in den vier Mausgruppen.

2.3.4. Synuclein- α

Synuclein- α ist ein im Hirn exprimiertes präsynaptisches Protein, dessen Aggregation zu unlöslichen Fibrillen mit dem M. Parkinson, der multiplen Systematrophie und der Lewy-Body-Demenz assoziiert ist. Diesem Protein wird eine toxische Wirkung auf bestimmte Nervenzellen, vor allem auf dopaminerge Neurone der Substantia nigra, zugeschrieben, in denen es in Form von Protofibrillen als Mitverursacher von oxidativem Stress und daraus resultierendem neuronalen Zelltod angesehen wird.

Für Synuclein- α wurden folgende Intensitäten ermittelt (Abbildung 68):

Synuclein- α	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,88	0,97	0,86	1,01	Prnp ^{-/-} Ischämie > Prnp ^{+/+} Ischämie (p=0,05) ANOVA (p=0,005)	
StabW	0,12	0,12	0,06	0,08	-	-
SEM	0,07	0,05	0,03	0,03	-	-

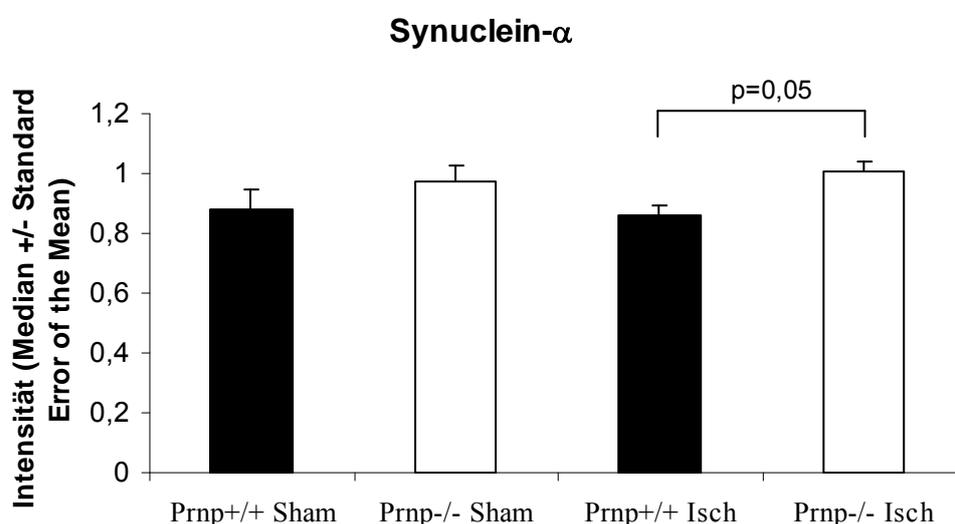


Abbildung 68: Synuclein- α (Beschreibung im Text)

Die Prnp^{-/-}-Mäuse zeigten nach Shambehandlung und nach Ischämiebehandlung höhere Synuclein- α -Level als die Prnp^{+/+}-Mäuse (Signifikanz nach Ischämiebehandlung). Wenig Unterschied war zwischen ischämie- und shambehandelten Tieren festzustellen. In der

ANOVA ergab sich ein hoch signifikanter Unterschied in Bezug auf die Synuclein- α -Expression zwischen den vier Mausgruppen.

2.4. Proteine des Zytoskeletts

2.4.1. α -Tubulin

α -Tubulin ist ein globuläres Protein. Zusammen mit dem ähnlich strukturierten β -Tubulin bildet es ein Dimer, welches den Grundbaustein der Mikrotubuli bildet. Mikrotubuli sind Komponenten des zytoskelettären Netzwerks und essentiell an der Stabilisierung der Zellform und der Zellpolarität beteiligt. Sie stellen die Basis für den gerichteten Transport zytoplasmatischer Bestandteile im Rahmen der Endo-, Trans- und Exozytose dar. Außerdem sind Mikrotubuli an der Regulation und Koordination von Zellbewegungen und Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Adhäsion beteiligt. Ferner bilden sie den Kernspindelapparat aus, der die Schwesterchromatiden in der Mitose voneinander trennt und sie zu den beiden gegenüberliegenden Zellpolen transportiert. Möglicherweise existiert ein Zusammenhang zwischen Mikrotubuli-Depolymerisation und endothelialer Barrierefunktionsstörung.

Für α -Tubulin wurden folgende Intensitäten ermittelt (Abbildung 69):

α -Tubulin	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,70	1,01	0,83	0,97	-	Prnp ^{-/-} Ischämie > Prnp ^{+/+} Ischämie (p=0,06) ANOVA (p=0,08)
StabW	0,13	0,17	0,17	0,21	-	-
SEM	0,07	0,08	0,08	0,09	-	-

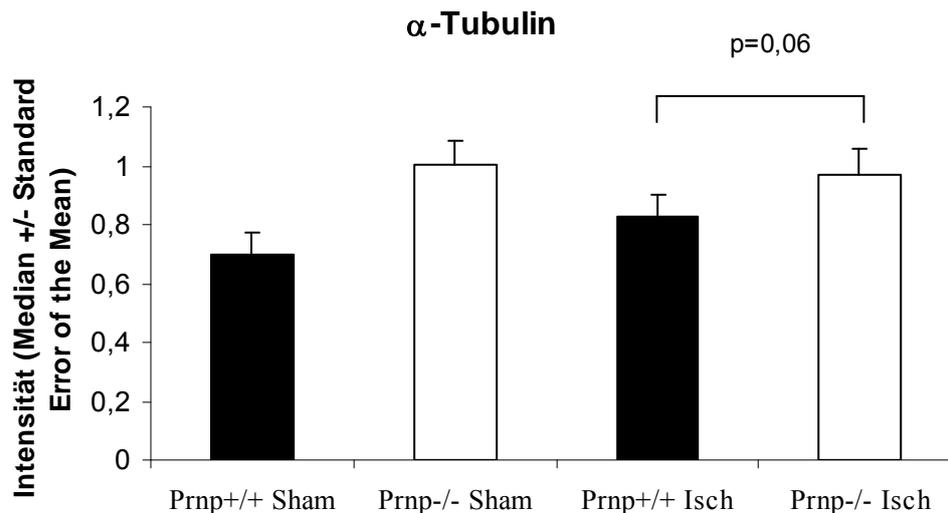


Abbildung 69: α -Tubulin (Beschreibung im Text)

α -Tubulin war nach Shambehandlung und nach Ischämiebehandlung (Trend) in den Prnp^{-/-}-Mäusen stärker exprimiert als in den Prnp^{+/+}-Mäusen. In den Prnp^{+/+}-Mäusen stieg der α -Tubulin-Level nach Ischämiebehandlung leicht gegenüber dem Shamzustand an, in den Prnp^{-/-}-Mäusen unterschied er sich kaum zwischen ischämie- und shambehandelten Tieren. Auch in der ANOVA ergab sich ein Trend für die unterschiedlichen Expressionslevel von α -Tubulin zwischen den vier Mausgruppen.

2.4.2. MAP1 und MAP1b

MAPs sind Mikrotubuli-Assoziierte Proteine. Die Hochmolekularproteine MAP1 und MAP1b zählen zu den strukturellen MAPs, die zur Ausbildung und Organisation der Mikrotubulstruktur beitragen. Sie sind an der Verbindung der Mikrotubuli mit anderen Zellorganellen, Intermediärfilamenten und Mikrofilamenten beteiligt.

Außerdem induzieren sie die Polymerisation von Tubulinmolekülen und stabilisieren die Mikrotubulstruktur.

MAP1 und MAP1b zeigten folgende Intensitäten (Abbildung 70, Abbildung 71):

MAP1	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,66	0,82	1,00	0,81	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{+/+} Sham (p=0,05)	-
StabW	0,11	0,21	0,04	0,15	-	-
SEM	0,06	0,09	0,02	0,07	-	-

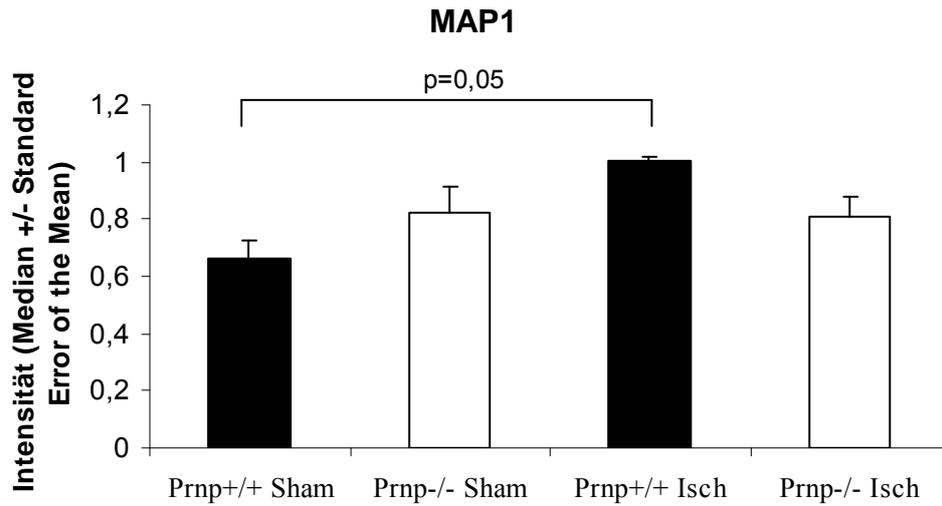


Abbildung 70: MAP1 (Beschreibung im Text)

MAP1b	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,72	0,82	1,21	0,83	-	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{+/+} Sham (p=0,06)
StabW	0,28	0,50	0,46	0,57	-	-
SEM	0,16	0,22	0,21	0,25	-	-

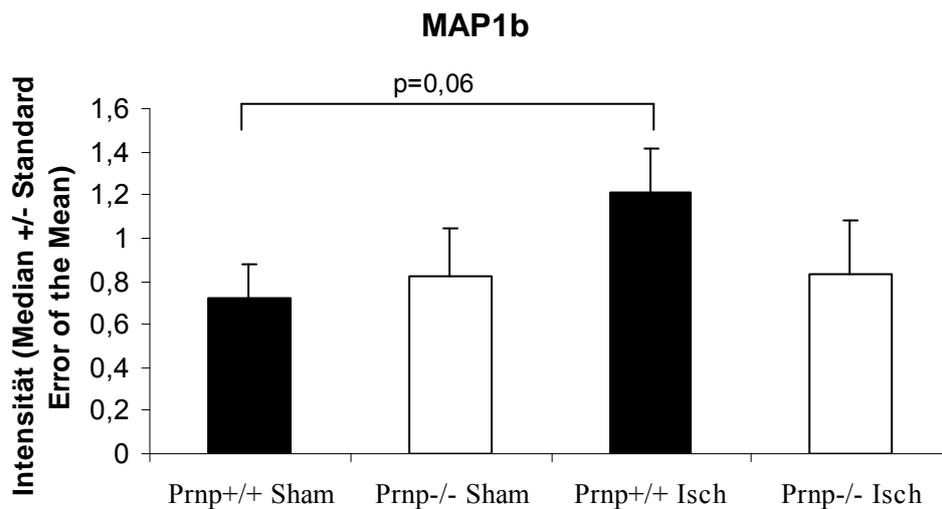


Abbildung 71: MAP1b (Beschreibung im Text)

Die Prnp^{+/+}-Mäuse wiesen nach Ischämiebehandlung eine höhere MAP1-Expression (Signifikanz) und MAP1b-Expression (Trend) als nach Shambehandlung auf. In den Prnp^{-/-}-Mäusen fand sich wenig Unterschied zwischen den sham- und den ischämiebehandelten Tieren. Nach Shambehandlung zeigten die Prnp^{-/-}-Mäuse etwas höhere MAP1/MAP1b-Expressionslevel als die Prnp^{+/+}-Mäuse. Nach Ischämie wiesen die Prnp^{+/+}-Mäuse etwas höhere MAP1/MAP1b-Expressionslevel als die Prnp^{-/-}-Mäuse auf.

2.4.3. OP18/Stathmin

OP18/Stathmin ist ein Tubulin-bindendes Protein, welches durch die Phosphorylierung an vier Serinresten reguliert wird. Es besitzt einen Mikrotubuli-destabilisierenden Effekt, der durch Serin-Phosphorylierung inhibiert wird. Die Serin-Phosphorylierung von Stathmin kann unter Anderem über den ERK1/2-Signalweg beeinflusst werden.

Besonders konzentriert findet es sich in Neuronen. Hier scheint es über verschiedene extrazellulär regulierte Signaltransduktionswege in die Funktion, Proliferation und Differenzierung von Neuronen involviert zu sein.

Für OP18/Stathmin fanden sich folgende Intensitäten (Abbildung 72):

OP18/ Stathmin	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,78	0,89	0,93	0,86	-	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{+/+} Sham (p=0,1)
StabW	0,07	0,19	0,12	0,10	-	-
SEM	0,04	0,09	0,05	0,05	-	-

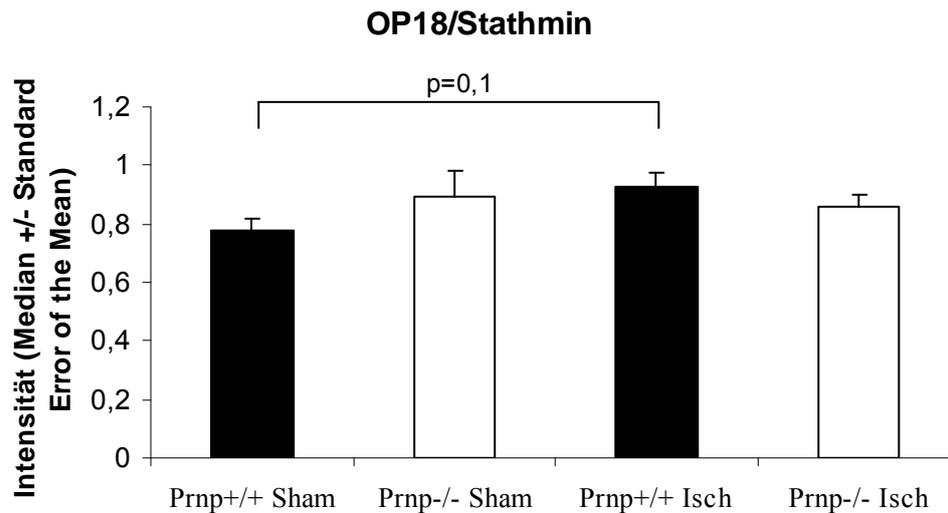


Abbildung 72: OP18/Stathmin (Beschreibung im Text)

Die Prnp^{+/+}-Mäuse zeigten unter Ischämiebedingungen höhere OP18/Stathmin-Expressionslevel als unter Shambedingungen (Trend). Bei den Prnp^{-/-}-Mäusen fand sich wenig Unterschied zwischen Sham- und Ischämie-Mäusen in Bezug auf die OP18/Stathmin-Expression. Nach Shambehandlung wiesen die Prnp^{-/-}-Mäuse etwas höhere OP18/Stathmin-Proteinlevel als die Prnp^{+/+}-Mäuse auf. Nach Ischämie war die OP18/Stathmin-Expression in den Prnp^{+/+}-Mäusen geringfügig höher als in den Prnp^{-/-}-Mäusen.

2.4.4. Neurofilament 200

Neurofilamente sind wesentliche Bestandteile des Zytoskeletts neuronaler Zellen. Sie fungieren als strukturstabilisierende Intermediärfilamente für Neurone und Synapsen und gewährleisten einen großen Axondurchmesser, der für eine schnelle axonale Signalfortleitung erforderlich ist. Besonders reichlich finden sie sich in großlumigen myelinisierten Axonen.

Es ist wahrscheinlich, dass Neurofilamente die Funktion anderer Zytoskelett-Proteine, wie der Mikrotubuli, beeinflussen können.

Für Neurofilament 200 fanden sich folgende Intensitäten (Abbildung 73):

Neurofilament 200	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,04	1,02	0,91	0,93	Prnp ^{+/+} Sham > Prnp ^{+/+} Ischämie (p=0,02)	-
StabW	0,05	0,07	0,05	0,19	-	-
SEM	0,03	0,03	0,02	0,08	-	-

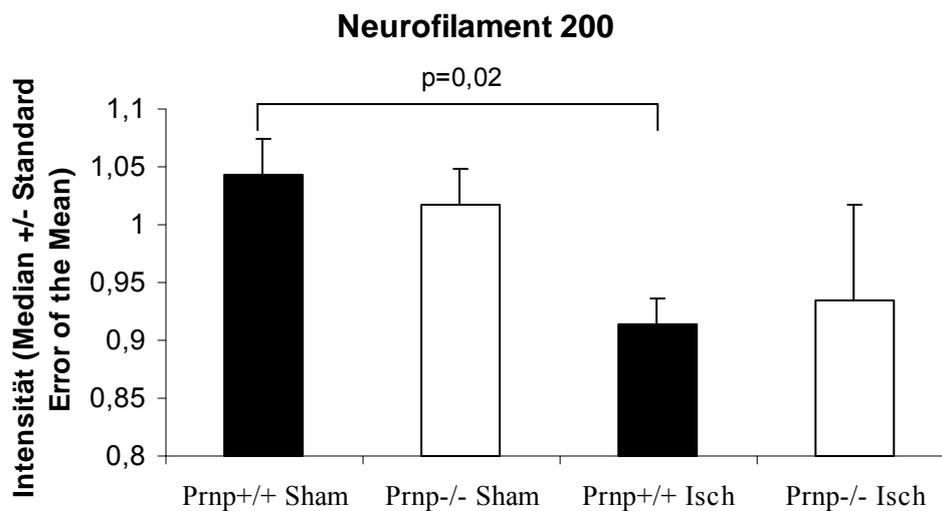


Abbildung 73: Neurofilament 200 (Beschreibung im Text)

Neurofilament 200 zeigte niedrigere Proteinlevel in den Ischämietieren als in den Shamtieren (signifikanter Unterschied zwischen in den beiden Prnp^{+/+}-Mausgruppen). Die Neurofilament 200-Level unterschieden sich zwischen den Prnp^{+/+}- und den Prnp^{-/-}-Mäuse nach Sham- und Ischämiebehandlung kaum voneinander.

2.4.5. P120CTN

Das Catenin P120CTN (Cadherin-associated Protein) ist ein Cadherin-bindendes Protein. Cadherine sind Calcium-abhängige homodimere Zell-Zell-Adhäsions-Rezeptoren. Catenine verbinden die intrazellulären Enden der Cadherine mit dem Aktin-Zytoskelett. Das Catenin P120CTN spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Cadherin-Funktion. Es ist ein Substrat der Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Src und an der Regulation der Zell-Zell-Adhäsion sowie an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt.

Das Catenin p120CTN zeigte folgende Intensitäten (Abbildung 74):

p120 CTN	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,31	1,18	1,09	1,32	-	Prnp ^{+/+} Sham > Prnp ^{+/+} Ischämie (p=0,08)
StabW	0,07	0,16	0,15	0,22	-	-
SEM	0,04	0,07	0,07	0,10	-	-

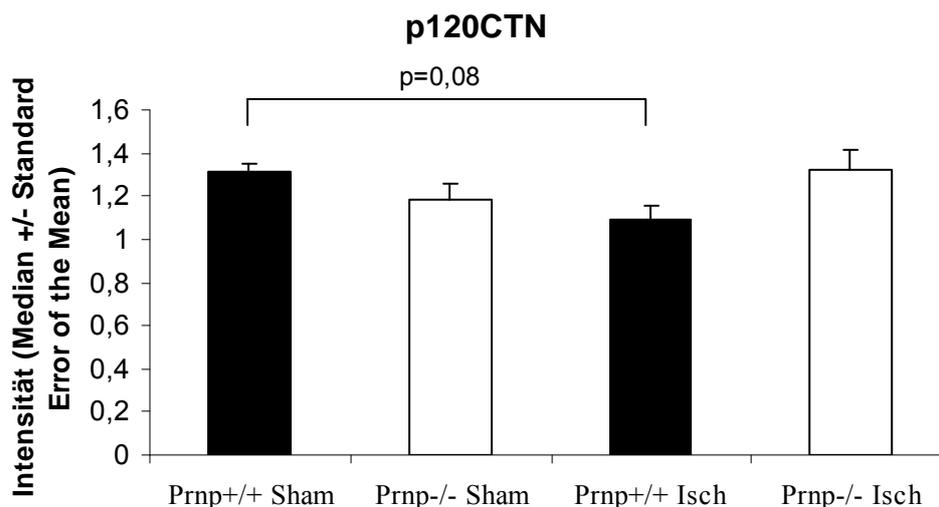


Abbildung 74: p120CTN (Beschreibung im Text)

P120CTN war im Hirn der Prnp^{+/+}-Shammäuse stärker exprimiert als im Hirn der Prnp^{+/+}-Ischämiemäuse (Trend). Bei den Prnp^{-/-}-Mausgruppen fand sich ein höherer p120CTN-Level in den Ischämietieren als in den Shamtieren. Nach Shambehandlung wiesen die Prnp^{+/+}-Mäuse etwas höhere p120CTN-Level als die Prnp^{-/-}-Mäuse auf. Nach Ischämiebehandlung zeigten die Prnp^{-/-}-Tiere etwas höhere p120CTN-Level als die Prnp^{+/+}-Tiere.

2.4.6. Connexin 32

Connexine sind Transmembranproteine. Sie bilden die Gap-junctions in der Zellmembran, die den direkten Austausch von Molekülen bis zu einer Größe von 1 kDa zwischen benachbarten Zellen ermöglichen. Ein Connexin besteht aus vier Transmembrandomänen mit zwei extrazellulären Schleifen, die sich aus anti-parallelen β -Faltblättern zusammensetzen. Je sechs Connexin-Moleküle bilden zusammen eine Pore, ein Connexon. Zwei Connexone benachbarter Zellmembranen lagern sich zu einem Gap-junction-Kanal zusammen. Connexin 32 besitzt ein Molekulargewicht von 32 kDa und bildet die Gap-junctions der Oligodendrozyten, hochspezialisierter neuronaler Gliazellen. Connexin 32 wies folgende Intensitäten auf (Abbildung 75):

Connexin 32	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,96	1,10	0,94	0,96	Prnp ^{-/-} Sham>Prnp ^{+/+} Sham	Prnp ^{-/-} Sham>Prnp ^{-/-}

					(p=0,03)	Ischämie (p=0,08)
StabW	0,06	0,11	0,16	0,13	-	-
SEM	0,04	0,05	0,07	0,06	-	-

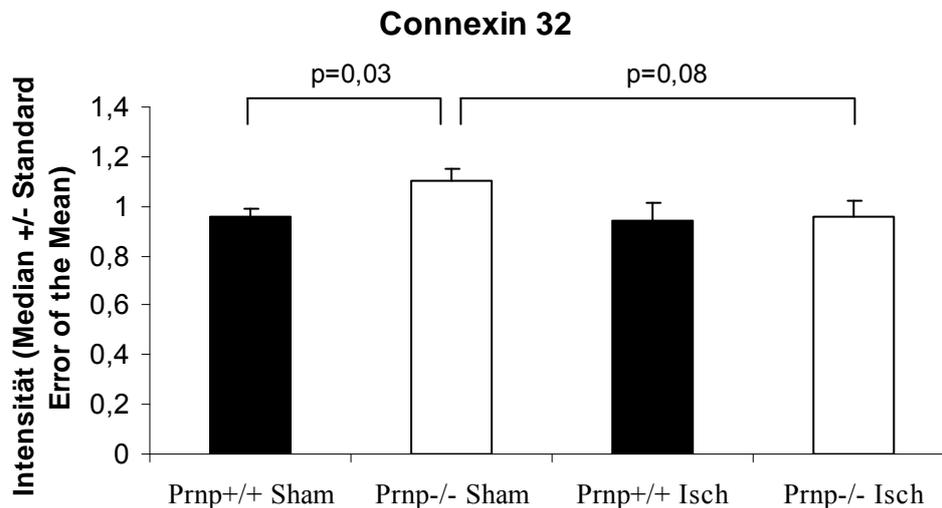


Abbildung 75: Connexin 32 (Beschreibung im Text)

Connexin 32 war in den Prnp^{-/-}-Shammäusen signifikant stärker exprimiert als in den Prnp^{+/+}-Shammäusen. Nach Ischämiebehandlung existierten kaum Unterschiede zwischen den Prnp^{+/+}- und den Prnp^{-/-}-Mäusen in Bezug auf ihre Connexin 32-Expression. In den Prnp^{-/-}-Mäusen fiel die Connexin 32-Expression nach Ischämiebehandlung gegenüber dem Shamzustand leicht ab (Trend). In den Prnp^{+/+}-Mäusen fand sich wenig Unterschied zwischen den shambehandelten und den ischämiebehandelten Tieren.

2.5. Proteine der Signaltransduktion

2.5.1. Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin

Im Rahmen von Signaltransduktionsprozessen werden Proteine durch Proteinkinasen an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten phosphoryliert. Durch Phosphorylierung können die Proteine aktiviert oder inaktiviert werden. Serin ist die am häufigsten phosphorylierte Aminosäure, danach folgen Threonin und Tyrosin in absteigender Reihenfolge. Das Verhältnis der Phosphorylierung von Serin zu Threonin zu Tyrosin beträgt 1800 : 200 : 1.

Transkriptionsfaktoren wie p53, CREB und NF-κB werden durch Phosphorylierung über Signaltransduktionskaskaden aktiviert.

Durch Ischämie kommt es zu einem intrazellulären Calciumanstieg, einem ATP-Abfall und zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, wodurch es zur Aktivierung verschiedener Proteinkinasen und zur Proteinphosphorylierung kommt.

Phosphoserin, -threonin und -tyrosin sind Marker für das gesamte Ausmaß der Phosphorylierung von Proteinen sowie der Aktivierung verschiedener Signalwege.

Für Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin wurden folgende Intensitäten ermittelt (Abbildung 76, Abbildung 77, Abbildung 78):

Phosphoserin	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,63	0,73	0,97	1,21	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{+/+} Sham (p=0,05) ANOVA (p=0,05)	Prnp ^{-/-} Ischämie > Prnp ^{-/-} Sham (p=0,08)
StabW	0,14	0,10	0,19	0,36	-	-
SEM	0,08	0,04	0,08	0,16	-	-

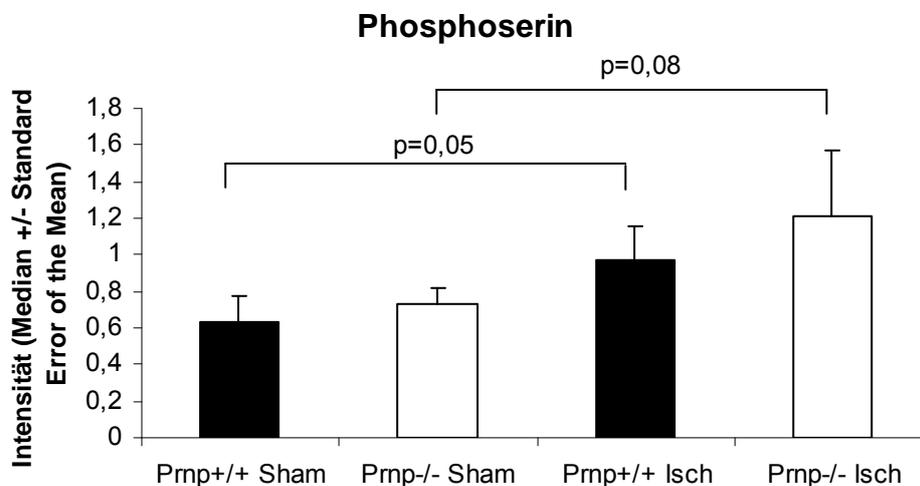


Abbildung 76: Phosphoserin (Beschreibung im Text)

Phosphothreonin	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,77	0,85	0,98	0,99	-	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{+/+} Sham

						(p=0,07)
StabW	0,14	0,13	0,29	0,35	-	-
SEM	0,08	0,06	0,13	0,16	-	-

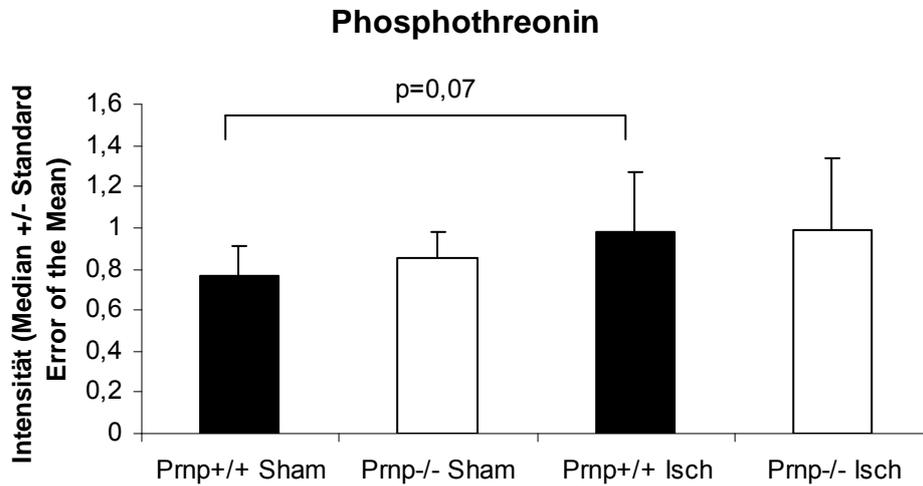


Abbildung 77: Phosphothreonin (Beschreibung im Text)

Phospho-tyrosin	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,69	0,85	0,90	0,92		ANOVA (p=0,06)
StabW	0,24	0,11	0,04	0,19	-	-
SEM	0,14	0,05	0,02	0,09	-	-

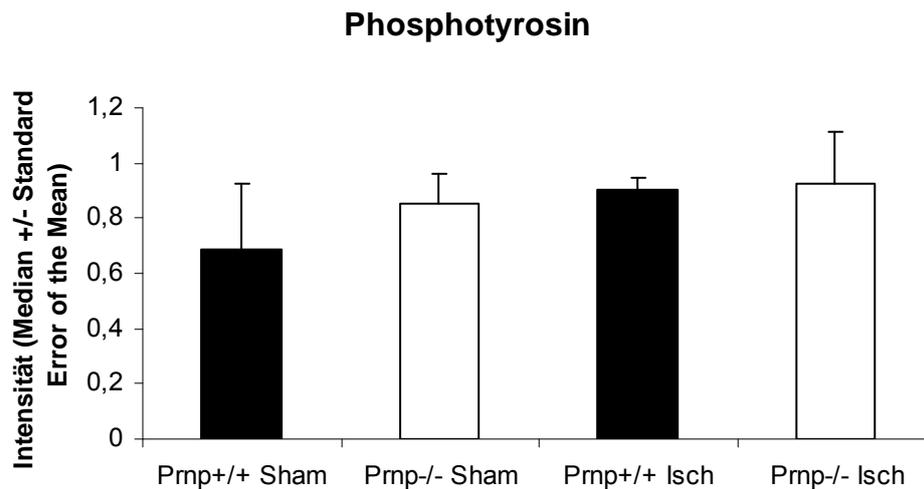


Abbildung 78: Phosphotyrosin (Beschreibung im Text)

Zusammenfassung: Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin:

In den Prnp^{+/+}-Mäusen und in den Prnp^{-/-}-Mäusen wurden nach Ischämiebehandlung höhere Phosphoserin-Level (Signifikanz bzw. Trend), Phosphothreonin-Level (Trend in den Prnp^{+/+}-Mäusen) und Phosphotyrosin-Level als nach Shambehandlung gefunden. Die Phosphoserin-Level waren nach Shamoperation und nach Ischämie in den Prnp^{-/-}-Tieren etwas höher als in den Prnp^{+/+}-Tieren. Phosphothreonin und Phosphotyrosin zeigten nach Shambehandlung in den Prnp^{-/-}-Mäusen etwas höhere Level als in den Prnp^{+/+}-Mäusen. Nach Ischämie fanden sich sehr geringe Unterschiede zwischen den Prnp^{+/+}-Mäusen und den Prnp^{-/-}-Mäusen in Bezug auf die Phosphothreonin- und Phosphotyrosin-Expression. In der ANOVA ergaben sich eine Signifikanz in Bezug auf die Phosphoserin-Expressionsunterschiede und ein Trend in Bezug auf die Phosphotyrosin-Expressionsunterschiede zwischen den vier Mausgruppen.

2.5.2. PKC

Übersicht: PKCs sind Serin/Threonin-Kinasen. Sie sind Bestandteil sämtlicher intrazellulärer Signaltransduktionswege. PKC γ wird nur in den Neuronen des Gehirns und des Rückenmarks exprimiert. Bei cerebraler Ischämie oder anderem Zellstress kommt es über Aktivitätssteigerung des NMDA-Rezeptors, über Calciueinstrom und ROS-Bildung zur Expressions- und Aktivitätssteigerung der PKCs β und γ . Umgekehrt verstärkt die PKC direkt und indirekt über die Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Src die NMDA-Rezeptor-Aktivität (Abbildung 79). Eine verminderte PKC-Aktivität während eines ischämischen Ereignisses sowie eine erhöhte PKC-Aktivität in der Reperusionsperiode wirken neuroprotektiv.

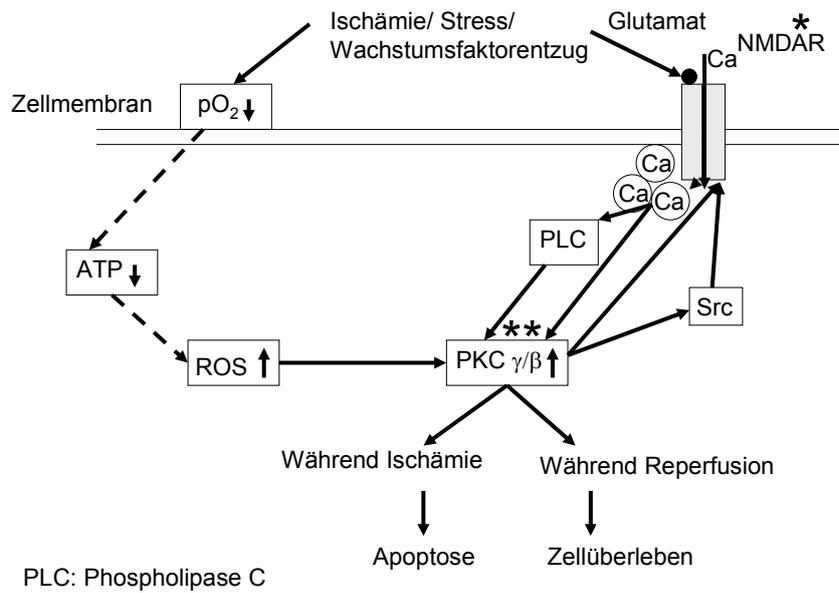


Abbildung 79: PKC γ - und PKC β -Signalweg (Trend=* im t-Test; Signifikanz=** im t-Test)



PKC β und PKC γ zeigten folgende Intensitäten (Abbildung 80, Abbildung 81):

PKC β	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,78	0,92	0,97	0,92	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{+/+} Sham (p=0,01)	-
StabW	0,03	0,21	0,09	0,15	-	-
SEM	0,02	0,09	0,04	0,07	-	-

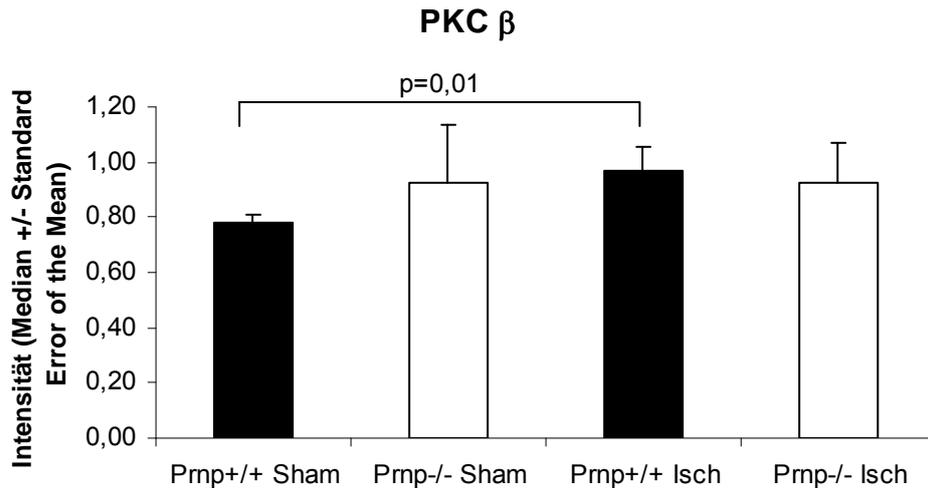


Abbildung 80: PKC β (Beschreibung im Text)

PKC γ	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,71	0,84	0,92	0,88	Prnp ^{+/+} Ischämie > Prnp ^{+/+} Sham (p=0,04)	-
StabW	0,03	0,21	0,09	0,15	-	-
SEM	0,02	0,09	0,04	0,07	-	-

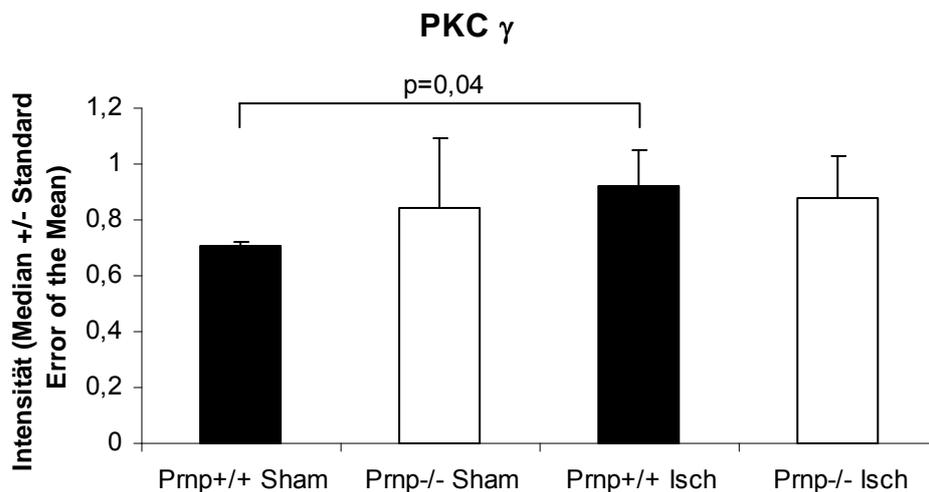


Abbildung 81: PKC γ (Beschreibung im Text)

Zusammenfassung: Proteinkinasen C β und C γ:

Die Prnp^{+/+}-Mäuse wiesen nach Ischämiebehandlung signifikant höhere PKC β- und γ-Level als nach Shambehandlung auf. Bei den Prnp^{-/-}-Mäusen fanden sich kaum Unterschiede in der

PKC β - und γ -Expression zwischen den Sham- und Ischämietieren. Die PKC β - und γ -Expression war nach Shambehandlung in den Prnp^{+/+}- Mäusen etwas niedriger als in den Prnp^{-/-}-Mäusen und glich sich nach Ischämiebehandlung etwa der Expression der Prnp^{-/-}-Mäuse an.

2.5.3. ERK1/2

Übersicht: Bei zellulärem Stress, NMDA-Rezeptor-Aktivierung und intrazellulärer Calciumerhöhung kommt es zur ERK1/2-Phosphorylierung und -Aktivierung. ERK1/2 ist für die Phosphorylierung und Aktivierung vieler Transkriptionsfaktoren zuständig (Abbildung 82). ERK1/2 kann höchstwahrscheinlich neuroprotektive und neurotoxische Effekte haben.

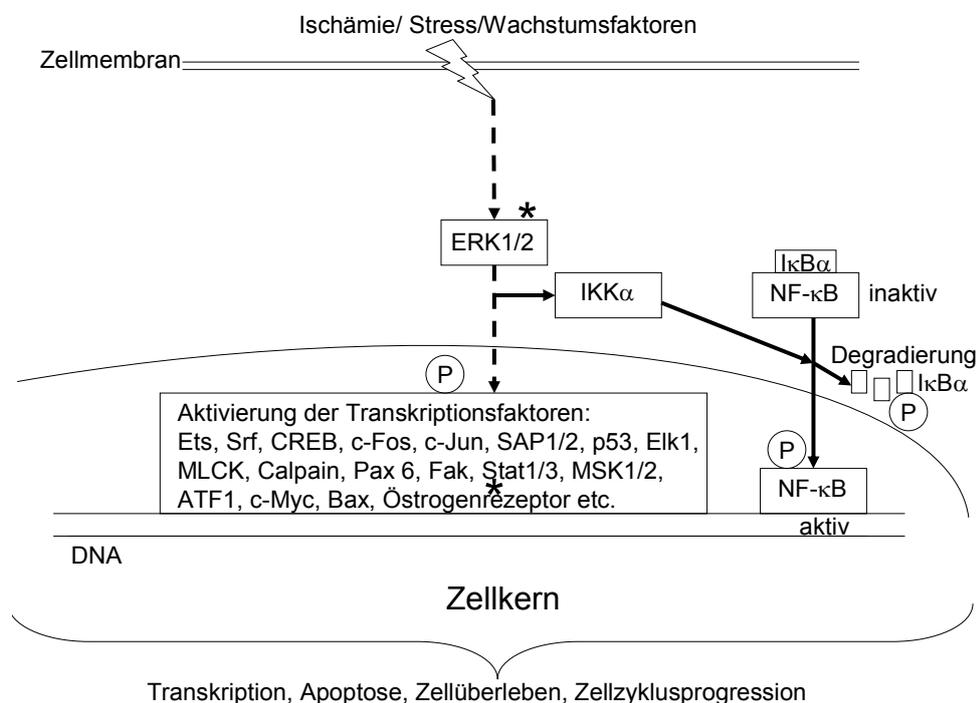
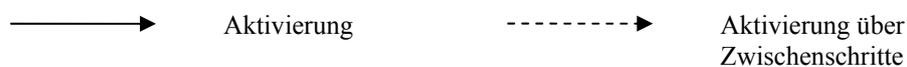


Abbildung 82: ERK1/2-Signalweg (*=Trend im t-Test)



Für die Protein-Level der ERK1/2, der ERK1 und der aktivierten (diphosphorylierten) ERK ergaben sich folgende Intensitäten (Abbildung 83, Abbildung 84, Abbildung 85):

MAP-Kinase (ERK1 ERK2) +	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,38	1,42	0,96	1,07	-	-
StabW	0,32	0,27	0,45	0,36	-	-
SEM	0,18	0,12	0,20	0,16	-	-

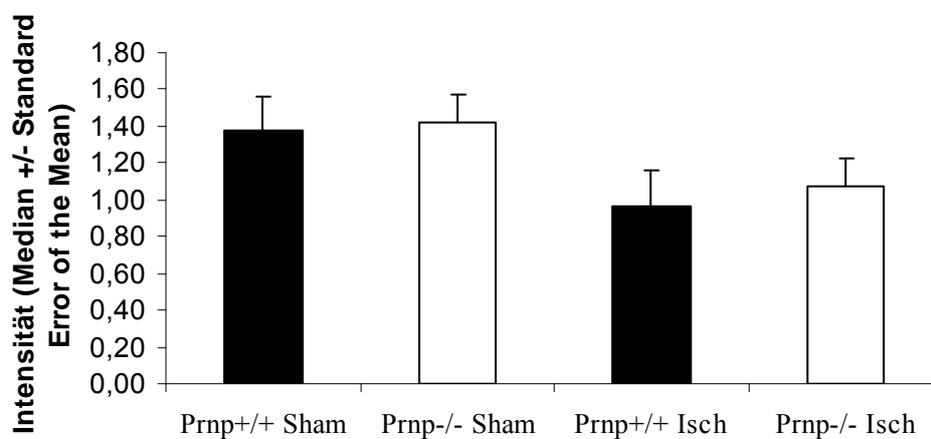
ERK1 + ERK2

Abbildung 83: MAP-Kinase (ERK1 + ERK2) (Beschreibung im Text)

In Bezug auf die ERK1- und ERK2-Gesamtexpression zeigte sich wenig Unterschied zwischen den shambehandelten Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäusen. Nach Ischämie fanden sich in den Prnp^{-/-}-Mäusen geringfügig höhere Level als in den Prnp^{+/+}-Mäusen. In den Prnp^{+/+}- und den Prnp^{-/-}-Mäusen waren die ERK1/ERK2-Gesamtlevel nach Ischämie etwas niedriger als nach Shamoperation.

MAP-Kinase (ERK1)	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,17	1,14	0,95	1,00	-	Prnp ^{-/-} Sham > Prnp ^{-/-} Ischämie

						(p=0,07)
StabW	0,11	0,10	0,29	0,14	-	-
SEM	0,06	0,05	0,13	0,06	-	-

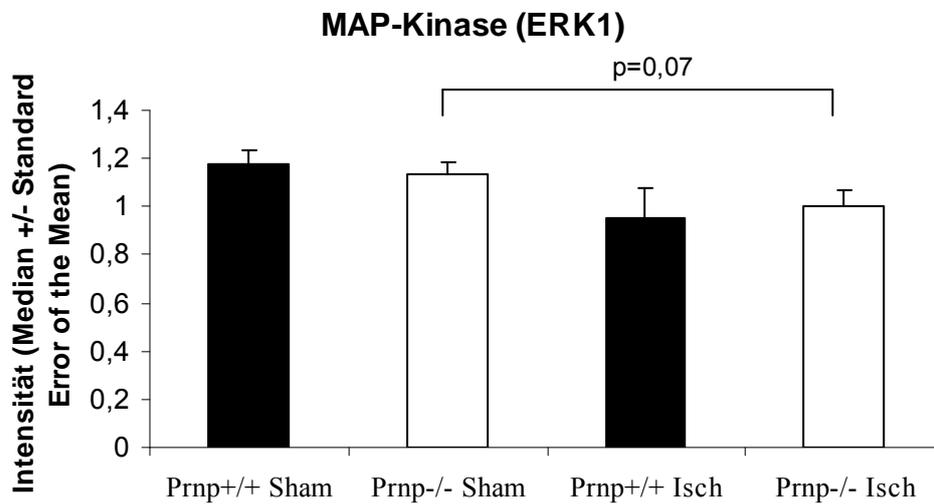


Abbildung 84: MAP-Kinase (ERK1) (Beschreibung im Text)

In den Prnp^{+/+}-Mäusen und in den Prnp^{-/-}-Mäusen fanden sich nach Shambehandlung höhere ERK1-Level als nach Ischämiebehandlung (Trend zwischen den Prnp^{-/-}-Mausgruppen). Zwischen den Prnp^{+/+}-Mäusen und den Prnp^{-/-}-Mäusen existierten weder nach Shamoperation noch nach Ischämie große Unterschiede in Bezug auf die ERK1-Expression.

Aktivierte MAP-Kinase-diphospho (Aktivierte ERK1/2)	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,74	0,69	0,30	0,79	-	Prnp ^{-/-} Ischämie > Prnp ^{+/+} Ischämie (p=0,07)
StabW	0,21	1,16	0,36	0,24	-	-
SEM	0,12	0,52	0,16	0,11	-	-

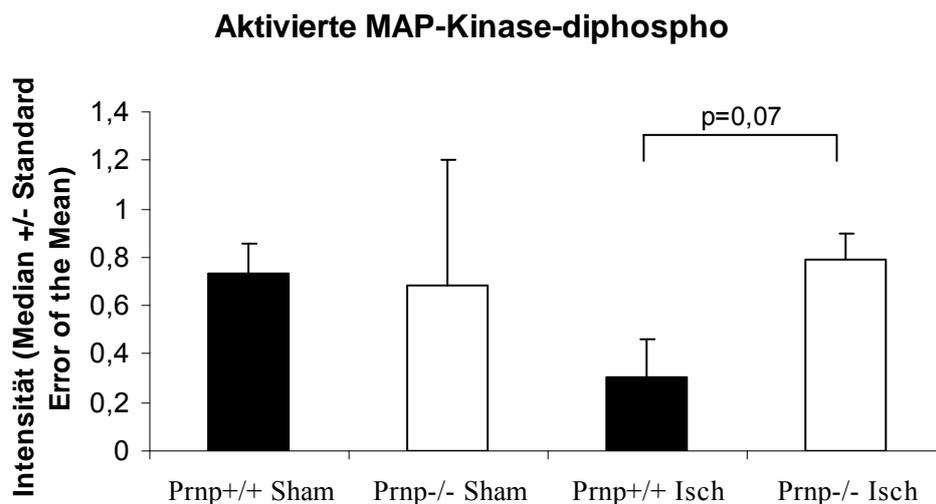


Abbildung 85: Aktiviert MAP-Kinase-diphospho (Beschreibung im Text)

Die diphosphorylierte aktivierte MAP-Kinase zeigte unter Ischämiebedingungen in den Prnp^{-/-}-Mäusen höhere Level als in den Prnp^{+/+}-Mäusen (Trend). Nach Shambehandlung unterschieden sich die Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäuse wenig voneinander in Bezug auf ihre MAP-Kinase-diphospho-Expression.

In den Prnp^{+/+}-Mäusen fiel der MAP-Kinase-diphospho-Level nach Ischämie gegenüber dem Shamzustand leicht ab. Bei den Prnp^{-/-}-Mäusen stieg der MAP-Kinase-diphospho-Level nach Ischämie gegenüber dem Shamzustand leicht an.

2.5.4. NF- κ B und I κ B

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der in allen Zell- und Gewebetypen exprimiert wird. Er ist entscheidend an der Regulation der zellulären Antwort auf Stress, Cytokine, freie Radikale und UV-Strahlung beteiligt. Ferner ist er in die Regulation der zellulären Immunantwort sowie in die Entstehung von synaptischer Plastizität und Gedächtnis involviert. Gehemmt wird die NF- κ B-Aktivität durch Bindung an seinen Inhibitor I κ B α . I κ B α wird durch die aktivierte I κ B α -Kinase (IKK α) an zwei Serinresten phosphoryliert, was zur Inaktivierung und Degradierung von I κ B führt. Die IKK α -Aktivität wird unter Anderem durch den ERK1/2- und den PKB/Akt-Signalweg induziert. Auf diesem Weg kann der Transkriptionsfaktor NF- κ B über den ERK1/2 und den PKB/Akt-Signalweg aktiviert werden (Abbildung 82, Abbildung 89). NF- κ B und I κ B wiesen folgende Intensitäten auf (Abbildung 86, Abbildung 87):

NF-κB	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,75	1,26	0,94	0,81	-	-
StabW	0,03	0,51	0,17	0,20	-	-
SEM	0,02	0,23	0,07	0,09	-	-

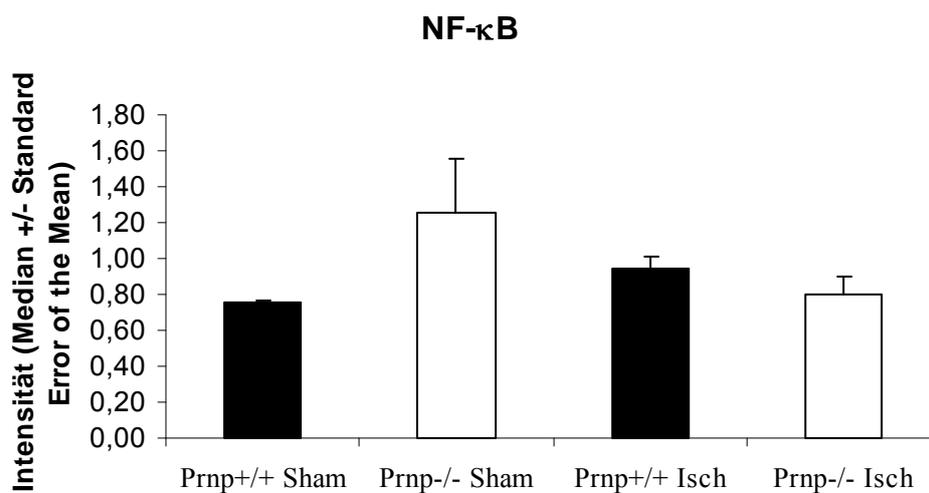


Abbildung 86: NF-κB (Beschreibung im Text)

NF-κB war nach Shambehandlung in den Prnp^{-/-}-Mäusen stärker exprimiert als in den Prnp^{+/+}-Mäusen, nach Ischämiebehandlung waren die NF-κB-Level in den Prnp^{+/+}-Tieren geringfügig höher als in den Prnp^{-/-}-Tieren. In den Prnp^{+/+}-Tieren stieg NF-κB nach Ischämie leicht gegenüber dem Shamzustand an, in den Prnp^{-/-}-Tieren fiel NF-κB nach Ischämie leicht gegenüber dem Shamzustand ab.

κB	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,03	0,94	0,94	1,00	-	-
StabW	0,21	0,16	0,15	0,16	-	-
SEM	0,12	0,07	0,07	0,07	-	-

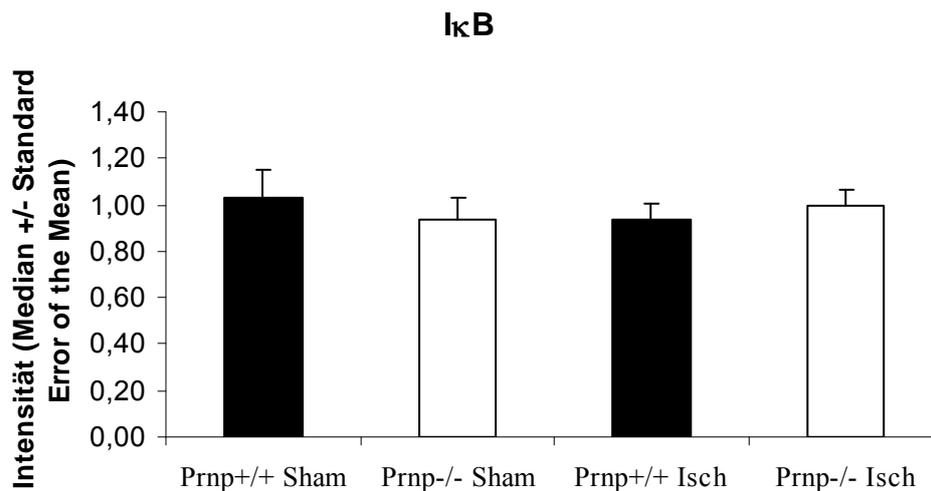


Abbildung 87: IκB (Beschreibung im Text)

IκB war nach Shambehandlung in den Prnp^{+/+}-Mäusen geringfügig stärker exprimiert als in den Prnp^{-/-}-Mäusen. Nach Ischämie fanden sich geringfügig höhere IκB-Level in den Prnp^{-/-}-Mäusen als in den Prnp^{+/+}-Mäusen. In den Prnp^{+/+}-Mäusen fiel der IκB-Level nach Ischämie leicht gegenüber dem Shamzustand ab, in den Prnp^{-/-}-Mäusen stieg der IκB-Level nach Ischämiebehandlung geringfügig gegenüber dem Shamzustand an.

2.5.5. Östrogenrezeptor

Der Östrogenrezeptor ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Bindung an das weibliche Sexualhormon Östrogen vom Zytoplasma in den Kern transloziert und aktiviert wird. Der Östrogenrezeptor ist insofern von Interesse, da sich weibliche Prnp^{-/-}-Mäuse in ihrer Reaktion auf transiente Ischämie von ihren männlichen Artgenossen unterscheiden.

Der Östrogenrezeptor zeigte folgende Intensitäten (Abbildung 88):

Östrogenrezeptor	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,96	1,01	0,90	1,10	-	Prnp ^{-/-} Ischämie > Prnp ^{+/+} Ischämie (p=0,08)
StabW	0,10	0,18	0,07	0,23	-	-
SEM	0,06	0,08	0,03	0,10	-	-

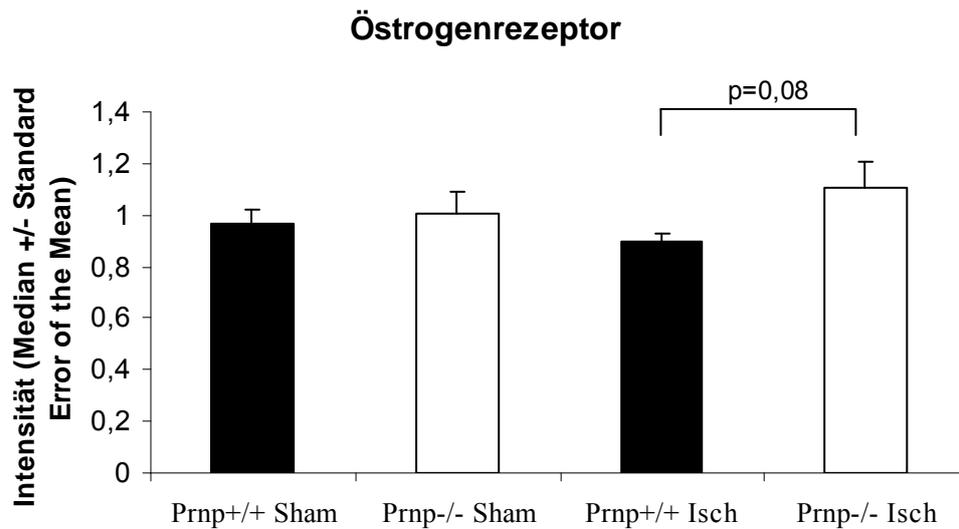


Abbildung 88: Östrogenrezeptor (Beschreibung im Text)

Nach Ischämiebehandlung zeigte sich in den Prnp^{-/-}-Mäusen ein höherer Östrogenrezeptor-Level als in den Prnp^{+/+}-Mäusen (Trend). Nach Shambehandlung bestand wenig Unterschied zwischen den Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäusen. Die Östrogenrezeptor-Level stiegen in den Prnp^{-/-}-Mäusen nach Ischämiebehandlung leicht gegenüber dem Shamzustand an. In den Prnp^{+/+}-Mäusen fielen sie nach Ischämiebehandlung leicht gegenüber dem Shamzustand ab.

2.5.6. PKB/Akt

Übersicht: Die Serin/Threonin-Proteinkinase PKB (Akt) wird über Phosphorylierung an einem Serinrest (Serin⁴⁷³) und einem Threonin-Rest (Threonin³⁰⁸) aktiviert. PKB/Akt kann über die Aktivierung der IKK α den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren und über die Induktion der Transkription anti-apoptotischer Gene (Bcl-x_L, AIP, A1) das Zellüberleben begünstigen. Ferner fördert PKB/Akt transkriptionsunabhängig durch Phosphorylierung und Hemmung des pro-apoptotischen Proteins Bad das Zellüberleben (Abbildung 89).

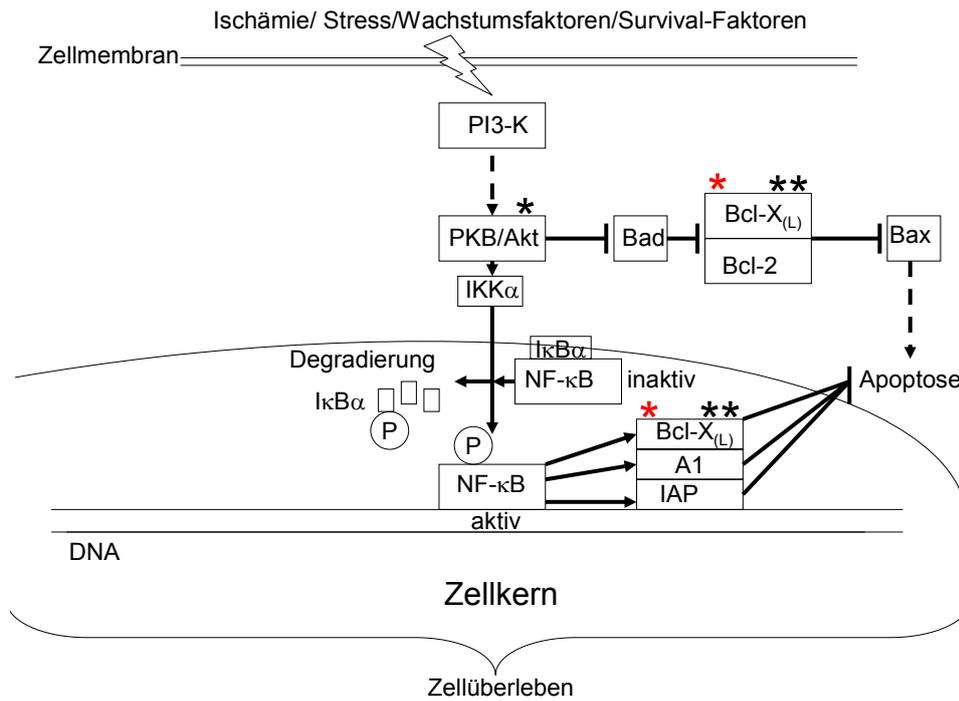
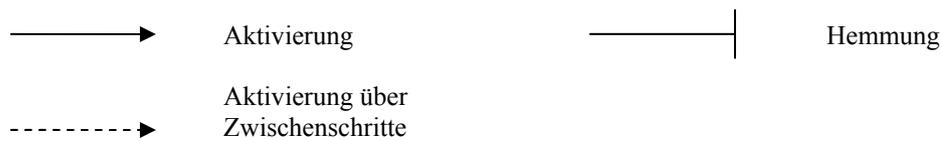


Abbildung 89: PKB/Akt-Signalweg (*=Trend im t-Test; **=Signifikanz im t-Test; *=Trend in der ANOVA; **=Signifikanz in der ANOVA; P=phosphoryliert)



Für die PKB/Akt-Gesamtexpression bzw. für die aktivierten Isoformen der PKB/Akt wurden folgende Intensitäten ermittelt (Abbildung 90, Abbildung 91, Abbildung 92):

PKB/Akt	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,89	1,03	0,98	1,04	-	-
StabW	0,13	0,17	0,12	0,10	-	-
SEM	0,07	0,08	0,05	0,04	-	-

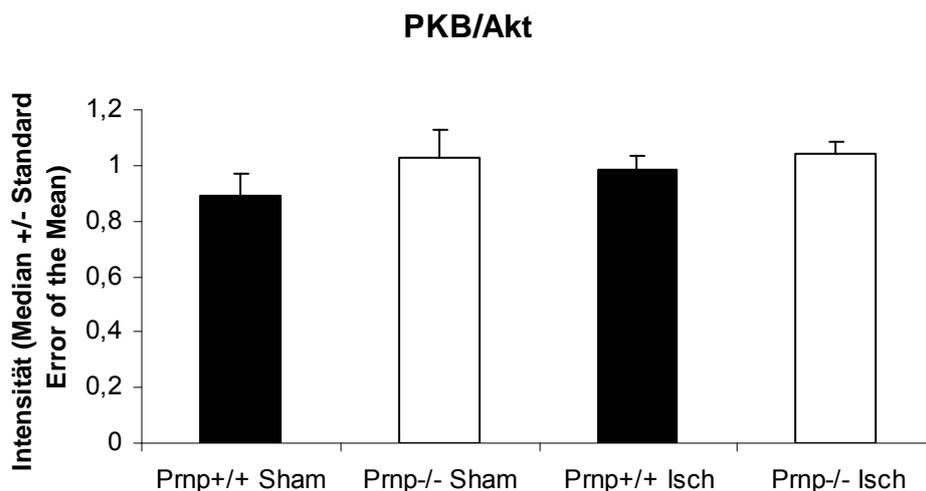


Abbildung 90: PKB/Akt (Beschreibung im Text)

Die PKB/Akt-Gesamtexpression zeigte nach Shambehandlung und nach Ischämiebehandlung in den Prnp^{-/-}-Tieren etwas höhere Level als in den Prnp^{+/+}-Tieren. In den Prnp^{+/+}-Tieren fanden sich nach Ischämie leicht höhere PKB/Akt-Level als nach Shamoperation. In den Prnp^{-/-}-Mäusen existierten kaum Unterschiede zwischen den Ischämietieren und den Shamtieren.

PKB-phosphoserin-473 (pS⁴⁷³)	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,56	0,76	0,85	1,03	-	Prnp ^{-/-} Sham > Prnp ^{+/+} Sham (p=0,09)
StabW	0,14	0,13	0,29	0,35	-	-
SEM	0,08	0,06	0,13	0,16	-	-

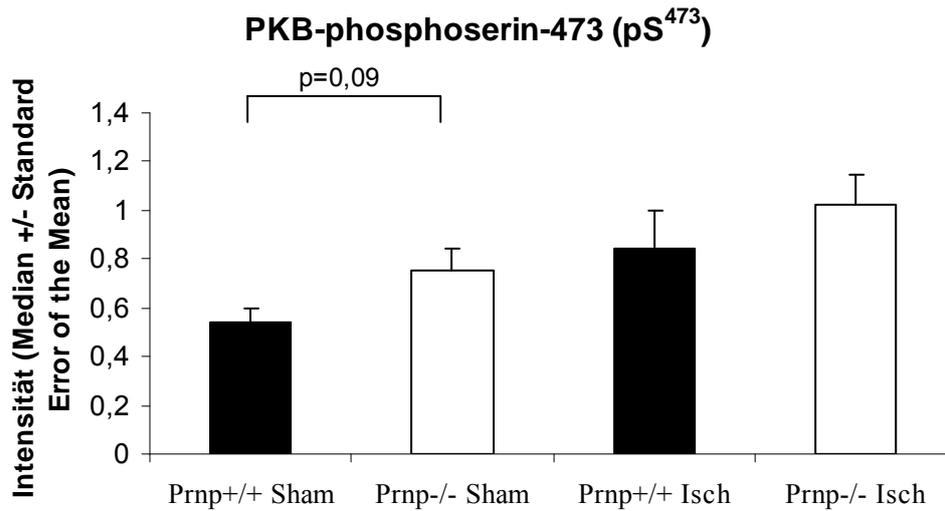


Abbildung 91: PKB-phosphoserin-473 (pS⁴⁷³) (Beschreibung im Text)

In den Prnp^{-/-}-Mäusen waren die PKB-phosphoserin-473-Level nach Shamoperation und nach Ischämie höher als in den Prnp^{+/+}-Mäusen (Trend nach Shambehandlung). In den Prnp^{+/+}-Mäusen und in den Prnp^{-/-}-Mäusen fanden sich etwas höhere PKB-phosphoserin 473-Level nach Ischämie als nach Shamoperation.

PKB-phosphothreonin-308 (pT³⁰⁸)	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,81	0,84	0,92	0,94	-	-
StabW	0,14	0,23	0,17	0,13	-	-
SEM	0,08	0,10	0,08	0,06	-	-

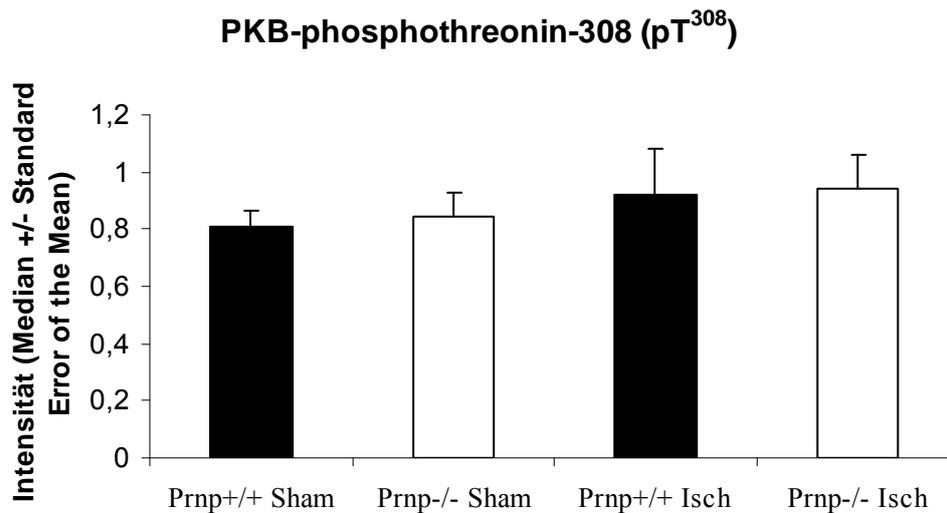


Abbildung 92: PKB-Phosphothreonin-308 (pT³⁰⁸) (Beschreibung im Text)

PKB-phosphothreonin zeigte in den Prnp^{+/+}-Mäusen und in den Prnp^{-/-}-Mäusen etwas höhere Level nach Ischämie- als nach Shambehandlung. Zwischen den Prnp^{+/+}-Mäusen und den Prnp^{-/-}-Mäusen fand sich wenig Unterschied.

2.5.7. JNK

Übersicht: Der JNK-Signalweg wird durch Zellstressoren wie oxidativen Stress, Glutamatfreisetzung, Wachstumsfaktorentzug, TNF-Stimulation, DNA-Schädigung, UV-Strahlung etc. aktiviert und führt über die Phosphorylierung vieler Transkriptionsfaktoren sowie über Hemmung der anti-apoptischen Proteine Bcl-x_L und Bcl-2 zur Apoptose (Abbildung 93).

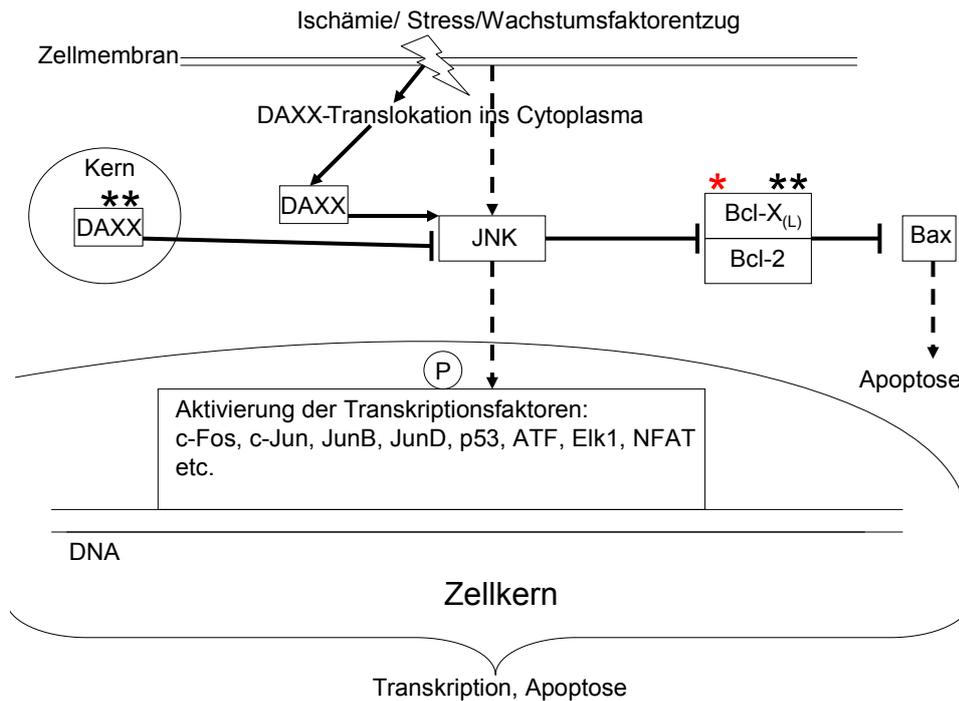
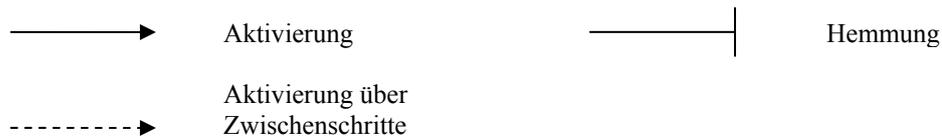


Abbildung 93: JNK-Signalweg (*=Trend im t-Test; **=Signifikanz im t-Test; *Trend in der ANOVA; **=Signifikanz in der ANOVA; P=phosphoryliert)



Für die JNK sowie für ihre aktivierte Isoform ergaben sich folgende Intensitäten (Abbildung 94, Abbildung 95):

JNK	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	1,22	1,34	0,98	1,04	-	-
StabW	0,14	0,20	0,17	0,23	-	-
SEM	0,08	0,09	0,08	0,10	-	-

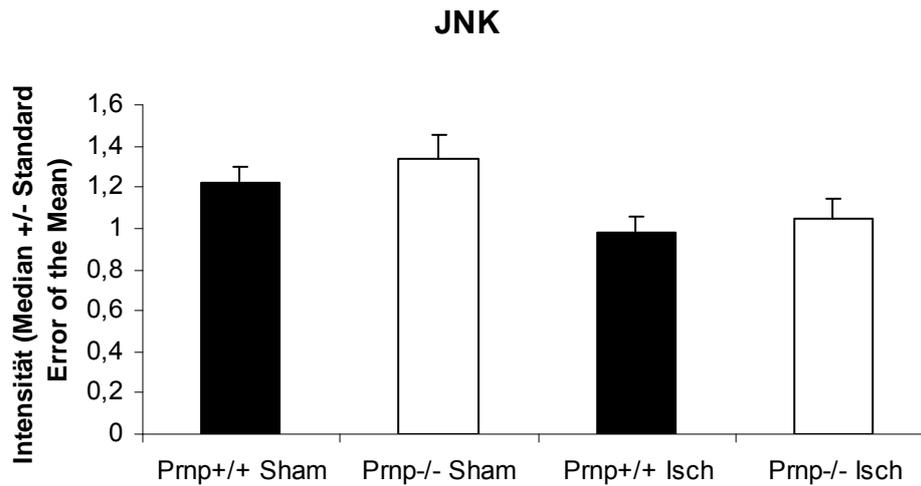


Abbildung 94: JNK (Beschreibung im Text)

Die JNK-Gesamtexpression war nach Ischämie und nach Shamoperation in den Prnp^{-/-}-Mäusen geringfügig höher als in den Prnp^{+/+}-Mäusen. Sowohl in den Prnp^{+/+}-Mäusen als auch in den Prnp^{-/-}-Mäusen fanden sich nach Shamoperation höhere JNK-Gesamtlevel als nach Ischämiebehandlung.

Aktivierte JNK	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,68	1,09	0,88	0,98	-	-
StabW	0,13	0,51	0,23	0,22	-	-
SEM	0,07	0,23	0,10	0,10	-	-

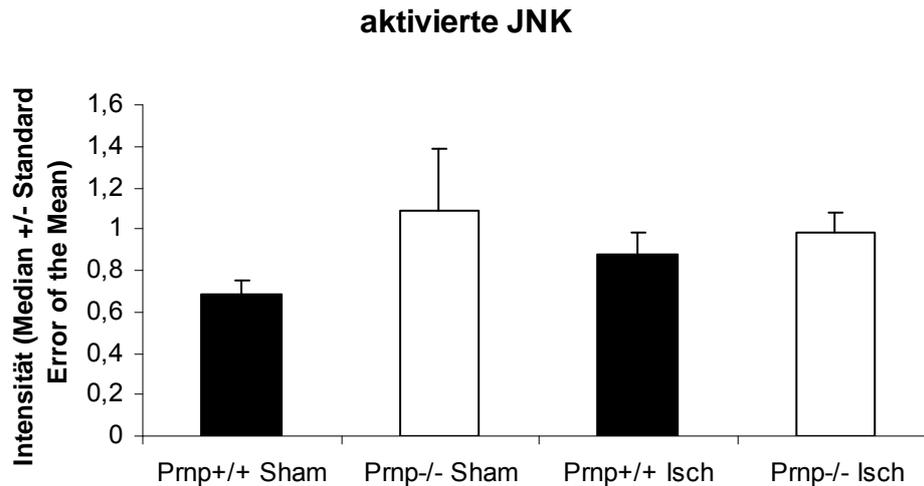


Abbildung 95: Aktivierte JNK (Beschreibung im Text)

Die JNK-Aktivität war nach Sham- und nach Ischämiebehandlung in den Prnp^{-/-}-Mäusen etwas höher als in den Prnp^{+/+}-Mäusen. In den Prnp^{+/+}-Mäusen stieg die JNK-Aktivität nach Ischämie leicht gegenüber dem Shamzustand an. In den Prnp^{-/-}-Mäusen fiel die JNK-Aktivität nach Ischämiebehandlung leicht gegenüber dem Shamzustand ab.

2.5.8. Proteinphosphatasen

Proteinphosphatasen können Proteine dephosphorylieren und sie dadurch je nach Protein aktivieren oder deaktivieren.

Die Map-Kinase-Phosphatase-1 kann die aktivierten ERKs1/2 inaktivieren.

Die Proteinphosphatase-1 α ist eine Serin/Threonin-Proteinphosphatase, die an der Regulation der Zellzyklusprogression, der Zellproliferation, der neuronalen Signaltransduktion und vielen anderen zellulären Prozessen beteiligt ist. Sie kann unter Anderem das pro-apoptische Protein Bad dephosphorylieren, es dadurch aktivieren und so die Bax-induzierte Apoptose begünstigen (zu „Bad“ siehe Abbildung 89).

Die Map-Kinase-Phosphatase-1 und die Proteinphosphatase-1 α zeigten folgende Intensitäten (Abbildung 96, Abbildung 97):

Map-Kinase-Phosphatase-1 (MKP-1)	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,96	0,94	0,97	1,08	Prnp ^{-/-} Ischämie > Prnp ^{-/-} Sham (p=0,03) ANOVA (p=0,05)	
StabW	0,06	0,05	0,08	0,08	-	-
SEM	0,04	0,02	0,04	0,04	-	-

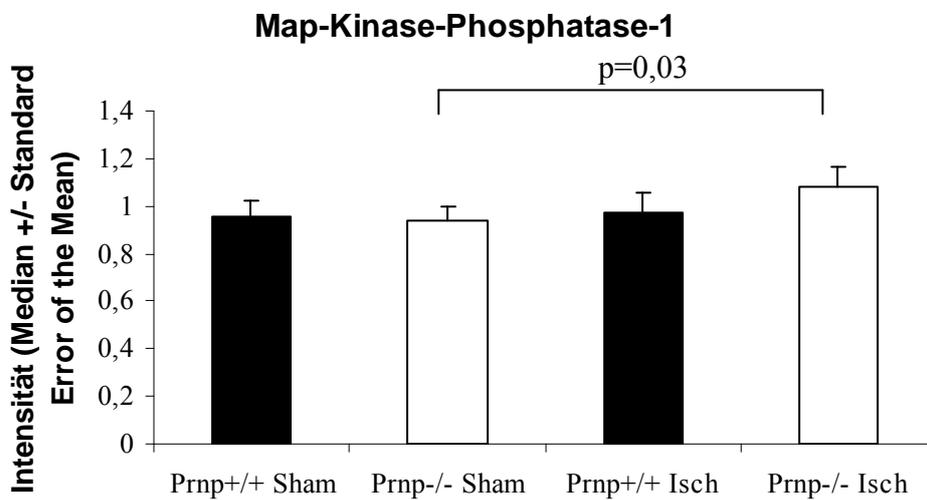


Abbildung 96: Map-Kinase-Phosphatase-1 (MKP-1) (Beschreibung im Text)

Protein-phosphatase-1α	Prnp ^{+/+} Sham (N=3)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Prnp ^{+/+} Ischämie (N=5)	Prnp ^{-/-} Ischämie (N=5)	Signifikanz	Trend
Median	0,99	0,94	0,90	1,06		Prnp ^{-/-} Ischämie > Prnp ^{-/-} Sham (p=0,06) ANOVA

						(p=0,09)
StabW	0,09	0,09	0,09	0,09	-	-
SEM	0,05	0,04	0,04	0,04	-	-

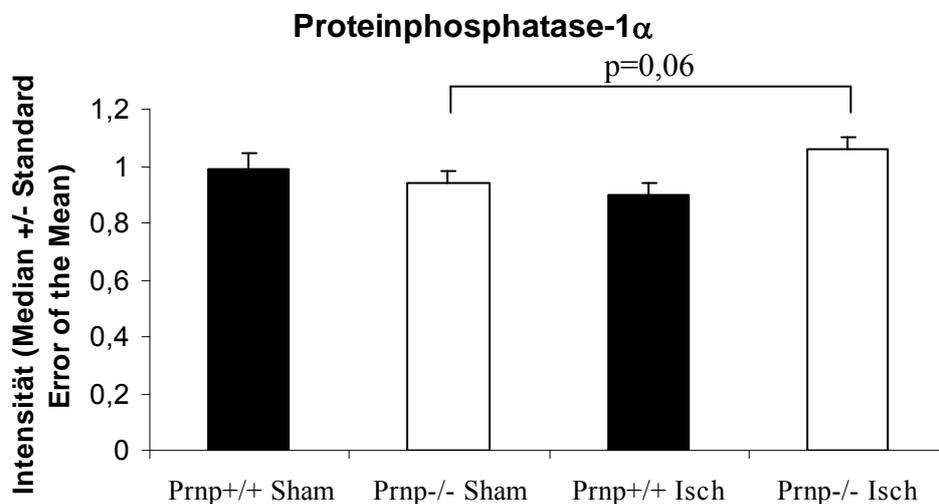


Abbildung 97: Proteinphosphatase-1 α (Beschreibung im Text)

Zusammenfassung: Phosphatasen:

Nach Ischämiebehandlung waren die MAP-Kinase-Phosphatase-1 und die Proteinphosphatase-1 α in den Prnp^{-/-}-Mäusen etwas stärker exprimiert als in den Prnp^{+/+}-Mäusen. Nach Shambehandlung zeigte sich wenig Unterschied zwischen den Prnp^{+/+}-Mäusen und den Prnp^{-/-}-Mäusen in Bezug auf die Expression beider Phosphatasen. In den Prnp^{-/-}-Tieren fand sich nach Ischämiebehandlung ein Anstieg beider Phosphatasen gegenüber dem Shamzustand (signifikanter Anstieg der MAP-Kinase-Phosphatase-1-Expression, Trend bezüglich der Proteinphosphatase-1 α -Expressionsunterschiede). In den Prnp^{+/+}-Tieren war der MAP-Kinase-Phosphatase-1-Level nach Shamoperation etwa gleich hoch wie nach Ischämiebehandlung. Der Proteinphosphatase-1 α -Level war in den Prnp^{+/+}-Ischämietieren etwas niedriger als in den Prnp^{+/+}-Shamtieren.

In der ANOVA stellten sich die Expressionsunterschiede der MAP-Kinase-Phosphatase zwischen den vier Mausgruppen signifikant, die Expressionsunterschiede der Proteinphosphatase-1 α als Trend dar.

3. Westernblots

3.1. Bcl-x

Anhand der Microarray-Daten war eine Beeinflussung der pro- und anti-apoptischen Proteine bereits vor Ischämie deutlich erkennbar (Caspasen, DAXX, DAPK und Cystatin A). Das für die Hemmung der Bax-induzierten Apoptose sehr bedeutsame Protein Bcl-x zeigte im Array allerdings erst nach Ischämie eine signifikant stärkere Expression in den Prnp^{+/+}- als in den Prnp^{-/-}-Mäusen. In der Zusammenschau der Microarray-Ergebnisse ist zu hypothesieren, dass sich bereits die Basalwerte (Ausgangswerte) der Bcl-x-Expression zwischen Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Shammäusen unterscheiden, woraus ein Einfluss des Prionproteins auf das „Calcium-Signaling“ abgeleitet werden könnte. Deswegen wurden mit Hilfe der Westernblot-Methodik ergänzende Untersuchungen der Bcl-x-Expression in Shamtieren durchgeführt: Der Westernblot erlaubt aufgrund seiner genaueren Auftrennung der Proteine in ihr Molekulargewicht eine spezifischere Aussage und auch eine bessere Quantifizierung.

Dafür wurden die kontralateralen Hemisphären der Shamtiere, die für die Microarray-Untersuchungen verwendet worden waren, herangezogen (N=5). Der Westernblot wurde mit demselben Anti-Bcl-x-Antikörper, der auch für die Microarray-Untersuchungen verwendet worden war, durchgeführt. Das Protein Bcl-x zeigte sich bei einem Molekulargewicht von 26-30 kDa als deutliche Doppelbande (Abbildung 98). Unspezifische Bindungen waren nicht zu verzeichnen. Um die Meßgenauigkeit zu steigern, wurde jeder Westernblot zweifach durchgeführt. Es zeigten sich nahezu identische Ergebnisse: In den Prnp^{-/-}-Tieren wurde eine verminderte Bcl-x-Intensität gefunden. Für die weitere Auswertung wurde mit den Mittelwerten der Intensitäten aus beiden Westernblots (Abbildung 98) gearbeitet.

Die Intensität ist eine dimensionslose Größe, die im mittleren Helligkeitsbereich (d.h. weder unter noch überentwickelter Westernblot) gut mit der Proteinkonzentration korreliert. Sie erlaubt daher einen relativen Vergleich der beiden Gruppen. Allerdings könnten Fehlerquellen, wie z.B. ungleiche Beladung und Füllung der Geltaschen oder Unregelmäßigkeiten im Gellauf, die Ergebnisse verzerren. Um zu überprüfen, wieviel Hirnlysat tatsächlich pro Lane für die Detektion vorliegt, wurde der Westernblot mit einem Antikörper gegen das ubiquitär vorkommende β -Aktin (Molekulargewicht 42 kDa) als Marker für die Proteinmenge reinkubiert. Nachfolgende Abbildung zeigt die gleichmäßige Detektion von β -Aktin in allen Lanes (Abbildung 98).

Bcl-x-Westernblots

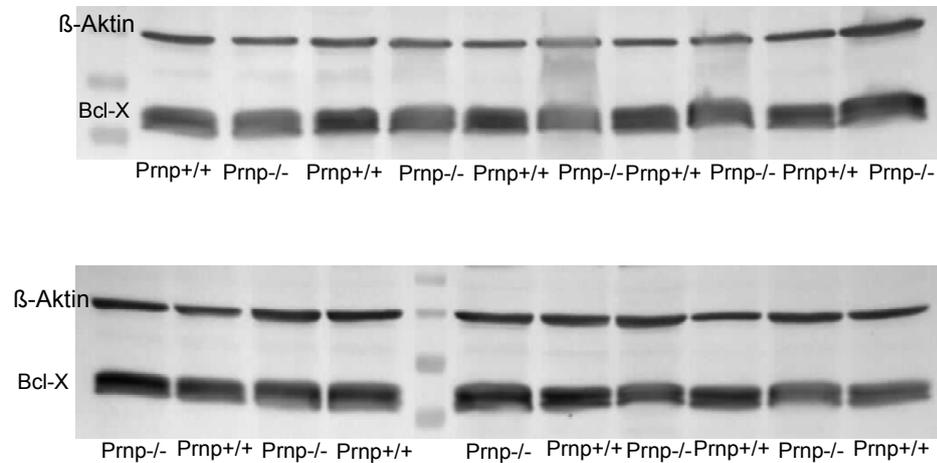


Abbildung 98: Bcl-x-Westernblot in zweifacher Ausfertigung

Die auf β -Aktin bezogenen mittleren Intensitäten der Bcl-x-Doppelbanden ergaben eine signifikant höhere Konzentration von Bcl-x in den $\text{Prnp}^{+/+}$ -Shamtieren als in den $\text{Prnp}^{-/-}$ -Shamtieren (Abbildung 99):

Bcl-x	$\text{Prnp}^{+/+}$ Sham (N=5)	$\text{Prnp}^{-/-}$ Sham (N=5)	Signifikanz
Median	1,02	0,84	$\text{Prnp}^{+/+}\text{Sham} > \text{Prnp}^{-/-}\text{Sham}$ (p=0,04)
StabW	0,19	0,15	
SEM	0,09	0,07	

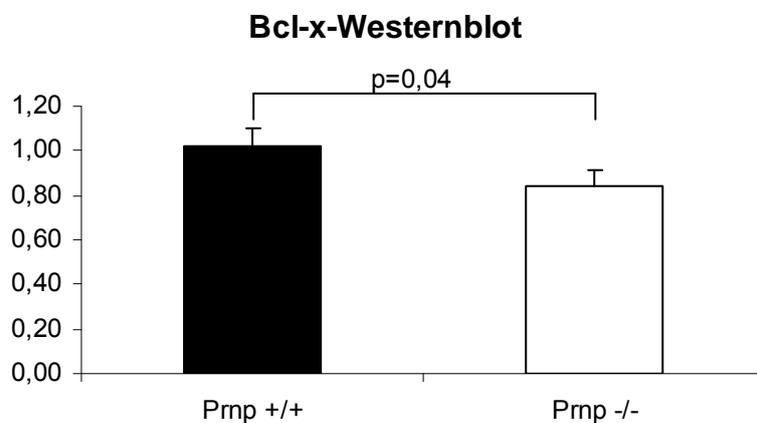


Abbildung 99: Bcl-x-Westernblot: Intensität (Median +/- Standard Error of the Mean)

3.2. NMDAR 2A

Der NMDA-Rezeptor ist für die in vorliegender Arbeit entwickelte Hypothese des Wirkungsmechanismus des Prionproteins von zentraler Bedeutung (siehe D. Diskussion, 3.3.1. NMDA-Rezeptor). Da die Unterschiede bezüglich der NR2A-Untereinheit-Expression im Screeningverfahren mittels Microarrays allerdings nur einen statistischen Trend zeigten (s.o.), wurden hier zur genaueren Quantifizierung der Unterschiede zwischen den Shammausgruppen ergänzende Westernblots angefertigt. Hierfür wurden die kontralateralen Hemisphären der Shamtiere, die für die Microarray-Untersuchungen verwendet worden waren, herangezogen (N=5). Für den Westernblot wurde der Anti-NR2A-Antikörper verwendet, der auch auf den Microarrays zur Proteindetektion benutzt worden war. Die NR2A-Untereinheit war bei einem Molekulargewicht von 180 kDa zu detektieren. Ergänzend erfolgte die Reinkubation der Westernblots mit einem Antikörper gegen β -Aktin (Molekulargewicht 42 kDa) als Marker für die eingesetzte Proteinmenge (Abbildung 100).

NR2A-Westernblots

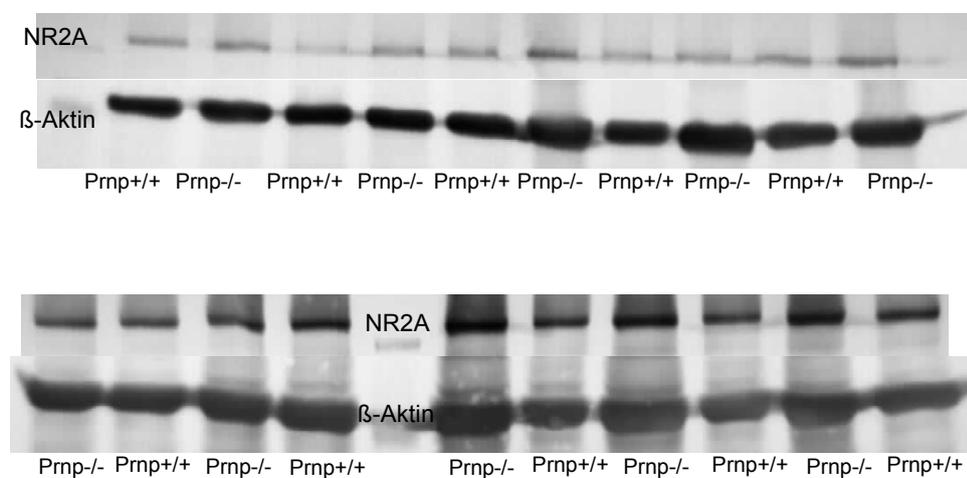


Abbildung 100: NMDAR 2A-Westernblot in zweifacher Ausfertigung

Für die NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR2A wurden nach Bezug auf β -Aktin folgende Intensitäten ermittelt (Westernblot in zweifacher Ausfertigung) (Abbildung 101):

NMDAR2A-Westernblot	Prnp ^{+/+} Sham (N=5)	Prnp ^{-/-} Sham (N=5)	Signifikanz
Median	0,78	1,17	Prnp ^{-/-} Sham>Prnp ^{+/+} Sham (p=0,02)
StabW	0,22	0,36	
SEM	0,10	0,16	

NR2A-Westernblot

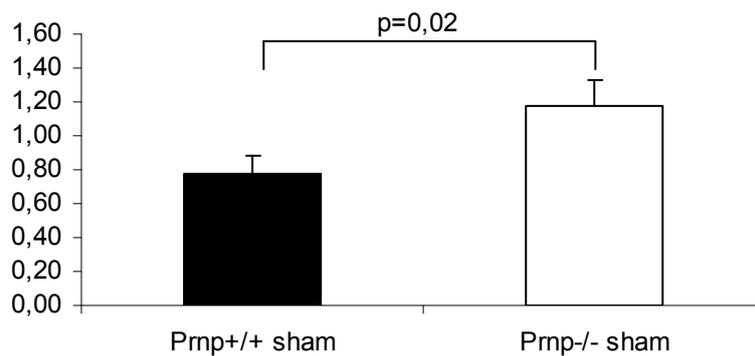


Abbildung 101: NR2A-Westernblot: Intensität (Median +/- Standard Error of the Mean)

Der Westernblot bestätigte den mit Hilfe der Microarrays gefundenen Trend und zeigte signifikant höhere NR2A-Proteinlevel im Hirnlysat der Prnp^{-/-}-Shammäuse als im Hirnlysat der Prnp^{+/+}-Shammäuse.

D. Diskussion

1. Diskussion der Methodik

Das murine Ischämiemodell

Über die Funktion des Prionproteins und insbesondere die damit verbundenen Auswirkungen auf den Organismus bestehen derzeit nur vage Vorstellungen. Umso wichtiger war es, in dieser Arbeit ein Modell zu wählen, das die Unterschiede zwischen Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäusen besonders deutlich hervorzuheben vermag. Bisherige Versuche am Mausmodell legten nahe, dass das Prionprotein einen neuroprotektiven Effekt sowohl in vivo bei ischämischer, traumatischer, hypoxischer und epilepsiebedingter Hirnschädigung als auch in vitro bei Serumentzug-induzierter Apoptose besitzt (Hoshino et al., 2003; Kuwahara et al., 1999; McLennan et al., 2004; Spudich et al., 2005; Walz et al., 1999; Walz et al., 2002; Weise et al., 2004; Weise et al., 2006; Kim et al., 2004; Nishimura et al., 2007; Sakudo et al., 2003a). Allen genannten Arten der Hirnschädigung gemeinsam ist der oxidative Stress als molekularer Mechanismus des Zelluntergangs. Er führt - ausgehend von einer zunächst vergleichbaren Primärläsion - zur unterschiedlichen Ausprägung der Sekundärläsion in Abhängigkeit des Prionproteins.

Anknüpfend an die in der Literatur beschriebenen Effekte wurde deshalb das murine Ischämiemodell gewählt. Während der Reperfusionphase nach transienter Ischämie kommt es bei Ausbildung des Sekundärschadens zu oxidativem Stress bzw. Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS). Folge sind unter anderem die Bax-induzierte und Caspase-gesteuerte Apoptose sowie die Aktivierung etlicher weiterer Signalwege, in denen das Prionprotein von Bedeutung sein könnte (siehe D. Diskussion, Abbildung 102). Im Gegensatz zur transienten Ischämie würde die permanente Ischämie vor allem über den Mechanismus der Exzitotoxizität und Nekrose zum raschen Zelltod führen, der natürlich die Untersuchung von Signalwegen limitiert (Graham and Chen, 2001; Plesnila, 2004). Tatsächlich beobachteten Weise et al. auch größere Unterschiede der Läsionsvolumina zwischen Prnp^{-/-}- und Prnp^{+/+}-Mäusen nach transienter Ischämie/Reperfusion als nach permanenter Ischämie (Weise et al., 2006), was ebenfalls gut zu der Hypothese einer durch das Prionprotein beeinflussten verzögerten Apoptose passen würde.

Ischämie und Reperfusionszeit

In vorliegender Arbeit wurden zwei unterschiedliche Reperfusionszeiten benutzt:

1. Das Modell der kurzen transienten cerebralen Ischämie (1 Stunde) mit langer Reperfusionzeit (24 Stunden) wurde für einen regionalen histologischen Vergleich der Hirninfarkt volumina zwischen Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäusen gewählt.

Wenige Stunden nach einem ischämischen Schaden zeigt sich zunächst ein Ödem im betroffenen Gewebe. Die Zellkerne und das Zytoplast sind nur diskret vergrößert, einige auch etwas abgeblasst. Durch eine längere postischämische Phase werden jedoch die zellulären Vorgänge wie Pyknose oder Karyorhexis histologisch deutlich abgrenzbar. Nekrotische Zellen sind in der Kernfärbung verblasst. Die Nissl-Substanz ist aufgelöst. Nach der gewählten Zeit von 24 h Reperfusion zeigt sich eine eindeutige Demarkierung des Infarktgebietes in Kernfärbungen. Die Nissl-Färbung vermag dabei Neurone besonders gut darzustellen.

2. Das Modell der kurzen transienten cerebralen Ischämie (1 Stunde) mit mäßig langer Reperfusionzeit (4 Stunden) wurde zur Untersuchung des molekularen Mechanismus der Apoptose- und Signalwegs-assoziierten Neuroprotektion durch das Prionprotein in Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäusen gewählt. Viele Signalwege, wie z.B. der ERK1/2- oder der JNK-Signalweg werden unter Ischämiebedingungen im Bereich von Minuten aktiviert. Die ERK-Aktivität zeigt bei einem multiphasischen Verlauf der Aktivitätskurve ein erstes Aktivitätsmaximum nach etwa 15 Minuten Reperfusion und ein zweites nach 24 bis 72 Stunden. Die JNK weist ihr erstes Aktivitätsmaximum ebenfalls nach etwa 15 Minuten bis zwei Stunden Reperfusion auf und steigt erneut nach etwa 72 Stunden an (Sugino et al., 2000). Die Kinase PKB/Akt zeigt ihr Aktivitätsmaximum nach etwa 30-minütiger bis 4-stündiger Reperfusion, die Caspase 3 erst nach etwa 36- bis 48-stündiger Reperfusion (Ouyang et al., 1999). Spudich et al. beobachteten hierzu passend, dass die Proteinlevel der aktivierten JNK und der aktivierten Caspase 3 nicht nach 3-stündiger und nicht nach 24-stündiger Reperfusion, sondern erst nach einer Reperusionsperiode von 72 Stunden einen signifikanten Unterschied zwischen Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäusen aufwiesen (Spudich et al., 2005). Man erhält folglich je nach Reperusionszeit unterschiedliche Ergebnisse.

Ein optimaler Zeitpunkt für die Untersuchung der Signalwege stellt daher einen Kompromiss unter den favorisierten Signalwegen dar.

Für die geplante Untersuchung wurde eine Reperusionszeit von 4 Stunden gewählt, um vor allem die Veränderungen durch den beginnenden Sekundärschaden optimal erfassen zu können. Die Kinasen PI3K, JNK und ERK werden dabei allerdings eher

unterschätzt, zumal auch ein Phosphorylierungsdefizit in den nekrotischen Bereichen auftritt.

Analyse mittels eines Microarray

Es sind eine Vielzahl von möglichen Prionprotein-Interaktionen beschrieben worden. Eine gleichzeitige Untersuchung aller Kandidaten, z.B. mittels ELISA oder Westernblottechnik, erfordert zum einen den Einsatz von großen Mengen an Lysat, zum anderen sind diese technisch in der benötigten Anzahl sehr aufwendig und kostspielig. Die geringe Menge des zur Verfügung stehenden Hirnlysats (ca. 100 µl) erforderte daher eine Miniaturisierung. Eine gleichzeitige Analyse vieler verschiedener Proteine erlaubt die Untersuchung mittels eines Microarrays. Im Gegensatz zu den mittlerweile weit verbreiteten „DNA-Chips“ ergeben sich bei der Untersuchung von Proteinen jedoch einige Probleme: Eine Antikörper-vermittelte Reaktion wie im Sandwich-ELISA erfordert eine optimale Abstimmung von Primär- und Sekundärantikörper. Eine Beziehung zwischen der Proteinkonzentration und der Färbeintensität muss dabei jeweils neu evaluiert werden. In dem hier verwendeten Verfahren des Microarrays wird diese Problematik durch ein direktes „Capturing“ umgangen. Die Proteine werden bereits vorweg, d.h. vor dem Auftragen auf den Array, direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen gelabelt und dann von in Überzahl vorliegenden membrangebundenen hochspezifischen Antikörpern „festgehalten“ („Capturing“). Eine gleichzeitige Prozessierung einer Referenzprobe reduziert dabei eventuelle Abweichungen durch unterschiedliche Prozessierung oder Behandlungsfehler.

Für die Untersuchung wurden Protein-Microarrays benutzt, die zugleich die Analyse der Expressionslevel von 224 verschiedenen Proteinen aus den Bereichen Apoptose, Zellzyklus, Neurobiologie, Zytoskelett und Signaltransduktion in Prnp^{+/+}-Maushirnen und Prnp^{-/-}-Maushirnen unter Sham- und unter Ischämie/Reperfusion-Bedingungen erlauben.

Es handelt sich hierbei jedoch um ein semiquantitatives Screeningverfahren, das dazu dient, möglichst viele interessante Proteine, die in den neuroprotektiven Prionprotein-Signalweg involviert sein könnten, zu identifizieren. Viele der auf dem Protein-Microarray befindlichen Proteine (B. Material und Methodik, 3.1.2. Antikörper auf einem Microarray) wurden bereits in Vorarbeiten mit dem Prionprotein in Zusammenhang gebracht und werden nachfolgend detaillierter diskutiert.

Ein wesentlicher Vorteil der Protein-Microarrays gegenüber DNA- und m-RNA-Arrays ist die direkte Bestimmung der Menge eines Proteins, die nicht zwangsläufig mit dem

entsprechenden m-RNA-Level korrelieren muss (Gygi et al., 1999). Ein weiterer Vorteil der Protein-Expressions-Arrays ist die Möglichkeit der genaueren Untersuchung von Signalwegen, da hier im Gegensatz zu DNA- und m-RNA-Arrays eine Unterscheidung zwischen strukturellen Veränderungen oder Modifikationen wie z.B. Spaltung, sowie zwischen phosphorylierten und nicht phosphorylierten Proteinen möglich ist und damit Aussagen über deren Aktivitäten gemacht werden können.

Experimentelles Design und Limitationen

Aufgrund der Komplexität des Verfahrens mit der Notwendigkeit einer Prozessierung in einem engen Zeitfenster sowie der Problematik der zeitgleichen Zucht und Operation der Littermates erfolgte für die Protein-Microarrays eine Einschränkung auf nur wenige Tiere (4 Gruppen zu je 5 Tieren). Dadurch können nur wenige wirklich auffällige Veränderungen nachgewiesen werden, die dann später in detaillierteren Studien weiter untersucht werden könnten. Die hier verwendete Methodik hat daher zum Ziel, „Kandidaten“ für die Vermittlung der neuroprotektiven Wirkung des Prionproteins zu identifizieren.

Durch die Protein-Konzentrationsbestimmung wurde der Einsatz gleicher Proteinkonzentrationen bestmöglich gesichert. Durch mehrere Rechenschritte (Mittelwert der jeweils doppelt auf einem Array vorhandenen Antikörper-Dots, Abzug des Hintergrunds, Bezug auf eine mitlaufende Referenzprobe) wurden verschiedene äußere Störfaktoren minimiert, um optimale Ergebnisse zu erhalten. Durch einfache Betrachtung der Werte von „housekeeping“-Proteinen lässt sich die Genauigkeit des Verfahrens abschätzen: So zeigt z.B. das ubiquitär vorhandene Aktin eine Standardabweichung von nur 9,67 %. Darin sind alle möglichen Ungenauigkeiten einschließlich der Proteinbestimmung, der Laborarbeit, Proteindegradation, Inkubationszeiten, dem Microarray selbst, der Fluoreszenzmessung und eine geringe biologische Variabilität von Aktin enthalten. Die Validität bestätigte sich auch durch die ergänzend durchgeführten Westernblots spezieller interessanter Proteine, die im Microarray Unterschiede zwischen den Mausgruppen gezeigt hatten.

Die Aussagekraft der Daten wird dadurch limitiert, dass die gemessenen Hirnlysate zugleich Nekrose, Penumbra und normales Hirn beinhalteten. Besonders problematisch erscheint dabei, dass sich das Nekrosevolumen erwartungsgemäß zwischen den Prnp^{+/+}-Mäusen und den Prnp^{-/-}-Mäusen unterscheidet (C. Ergebnisse, 1. Histologie). Im Bereich einer Nekrose sind durch Degradation und Substratmangel niedrigere Proteinlevel und Kinaseaktivitäten als im restlichen Hirn zu erwarten. Daraus ergibt sich bei einem großen Nekrosevolumen unter Umständen eine Unterschätzung der gemessenen Werte im vitalen Gewebe. Geringe

Unterschiede zwischen den Ischämietieren und den Shamtieren beziehungsweise zwischen der Prnp^{+/+}-Ischämiegruppe und der Prnp^{-/-}- Ischämiegruppe sind daher stets mit gewisser Vorsicht zu interpretieren. Als weiterer wichtiger Punkt ist zu beachten, dass unterschiedliche Reaktionen verschiedener Zelltypen zu erwarten sind (z.B. Apoptose in Neuronen bei gleichzeitiger Aktivierung und Proliferation der Microglia), welche die Interpretation eines Reaktionsschemas erschweren.

Zur Interpretation wurden zwei statistische Verfahren herangezogen: Zum einen wurde der (kritischere) t-Test für den paarweisen Vergleich der Gruppen verwendet. Hierbei wird der prinzipielle Fehler begangen, dass die betrachteten Proteine einem gemeinsamen Einfluss unterliegen könnten. Zum anderen wurde eine multivariate Testung (Analysis of Variance) durchgeführt, die jeden Parameter in der Gesamtheit aller Werte vergleicht. Der potentielle Fehler ist hier umgekehrt eine fälschlicher Weise unterstellte Zusammengehörigkeit. Erfreulicherweise führen aber beide Testverfahren zu weitestgehend kongruenten Interpretationen, so dass hier nicht näher auf die Details eingegangen werden muss.

Die vorliegende Arbeit gibt trotz gewisser Einschränkungen einen umfangreichen und aufschlussreichen Einblick in die Auswirkungen der Expression des Prionproteins auf molekularer Ebene unter Normal- und Ischämiebedingungen.

2. Histologie: Größe und Verteilungsmuster des Infarkts in Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäusen

Nach transientser Okklusion der A. cerebri media zeigten die Prnp^{-/-}-Mäuse signifikant größere Infarkt volumina und ein signifikant stärkeres Hirnödem als die Prnp^{+/+}-Mäuse. Sowohl in den Prnp^{+/+}- als auch in den Prnp^{-/-}-Mäusen waren die Basalganglien, der insuläre Kortex, der piriforme Kortex, der somatosensorische Kortex sowie der peri- und ektorhinale Kortex vom Infarkt betroffen - allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Die befallenen Areale befanden sich alle im Versorgungsgebiet der A. cerebri media, das in den Prnp^{-/-}-Mäusen deutlich stärker als in den Prnp^{+/+}-Mäusen betroffen war.

Unmittelbar nach Abgang aus der A. carotis interna gibt die A. cerebri media als erstes die Aa. centrales anterolaterales ab. Es handelt sich dabei um mehrere senkrecht verlaufende dünne Arterien, die vor allem die Basalganglien (Striatum und Pallidum) sowie einen Teil von Capsula interna und Thalamus versorgen. Daraus erklärt sich der fast immer nachweisbare Infarktkern in den Basalganglien, der durch Nekrose gekennzeichnet war. Im Gegensatz dazu war der motorische Kortex, der teils von Ästen der A. cerebri media (Rumpf, vordere

Extremität und Kopfbereich) und teils von Ästen der A. cerebri anterior (Bein- und Fußbereich) versorgt wird, als Grenzzonengebiet, wenn überhaupt, nur geringfügig vom Infarkt betroffen. Am deutlichsten waren die Unterschiede zwischen den Prnp^{-/-}- und den Prnp^{+/+}-Mäusen jedoch im piriformen, insulären und somatosensorischen Kortex. Hier zeigte sich die Ausbildung des sekundären Infarktschadens mit Ödem und Apoptose in den Prnp^{-/-}-Mäusen deutlich stärker als in den Prnp^{+/+}-Mäusen. Dass speziell diese Kortexareale stark vom neuroprotektiven Effekt des Prionproteins profitierten, könnte an einer hohen Dichte hochdifferenzierter und empfindlicher Nervenzellen liegen. Die Gefäßversorgung ist als Endstromgebiet der A. cerebri media hier zudem besonders kritisch.

Diese Ergebnisse passen gut zu den publizierten Daten bei transienter Ischämie und Reperfusion (Spudich et al., 2005; Weise et al., 2004; Weise et al., 2006; McLennan et al., 2004). Es ist allerdings kritisch zu hinterfragen, ob dem Effekt eine unterschiedliche Gefäßversorgung zugrunde liegen könnte. McLennan et al. stellten dazu bei ihren Hypoxie/Ischämie-Studien den Circulus arteriosus Willisii und beide Arteriae cerebri mediae mit Latex-Tinte in je vier Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäusen des gleichen Stammes dar und fanden keine Unterschiede in der Vaskularisation (McLennan et al., 2004). Ein weiteres Argument gegen eine unterschiedliche Vaskularisation als Ursache der unterschiedlichen Infarkt volumina stellt die Tatsache dar, dass nur Teile des Versorgungsgebietes der A. cerebri media betroffen waren (die Kern- und Endstromgebiete), während sich ausgerechnet in den Grenzzonen kein wesentlicher Unterschied darstellte.

3. Protein-Microarrays

3.1. Signalwege aus dem Bereich der Apoptose

Da dem Prionprotein eine anti-apoptotische Wirkung auf Bax- und Serumentzug-induzierte Apoptose zugeschrieben wird, ist die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung der Expressionslevel pro- und anti-apoptotischer Proteine von besonderer Bedeutung (Bounhar et al., 2001; Roucou et al., 2003; Diarra-Mehrpour et al., 2004; Kuwahara et al., 1999; Li and Harris, 2005; Roucou et al., 2005; Gains et al., 2006; Kim et al., 2004; Sakudo et al., 2003a). Ischämie führt über verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden zur Apoptose (ergänzend als Übersicht dargestellt in Abbildung 102) [zusammengefasst in (Lipton, 1999; Saikumar et al., 1998; Graham and Chen, 2001; Won et al., 2002)].

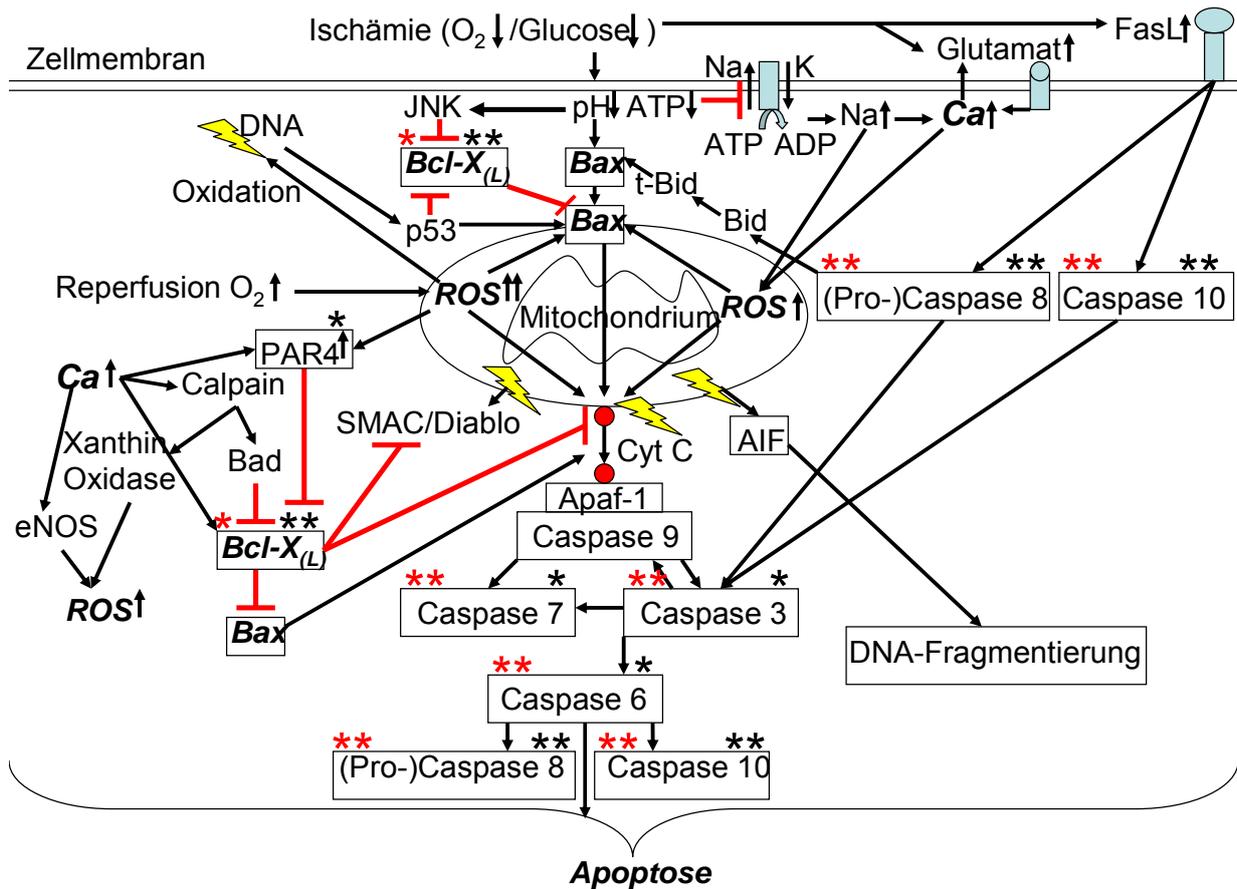


Abbildung 102: Apoptose-Induktion durch Ischämie (*=Trend im t-Test; **=Signifikanz im t-Test; *=Trend in der ANOVA; **=Signifikanz in der ANOVA) (Beschreibung im Text)



Bei Ischämie kommt es durch den Substrat- und Sauerstoffmangel zu einem intrazellulären ATP-Abfall und einem Abfall des intrazellulären pH-Wertes. Dies hat eine verminderte Aktivität der transmembranösen Na⁺/K⁺-ATPase und eine Depolarisation der Zellmembran zur Folge. Es kommt zu einem Einstrom von Natriumionen in die Zelle, einem Ausstrom von Kaliumionen und durch subsequente Aktivitätsminderung des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers zu einer intrazellulären Calciumerhöhung. Das Membranpotential bricht zusammen.

Daraus resultiert auch ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials. Dies führt zu einer Unterbrechung und Entkopplung des Elektronentransports an der mitochondrialen Atmungskette, was mit einer verstärkten Entstehung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) einhergeht. Die Entstehung freier Sauerstoffradikale wird insbesondere begünstigt, wenn den (vor-)geschädigten Mitochondrien in der

Reperfusionssphase plötzlich wieder viel Sauerstoff zur Verfügung steht (Reperfusionsschaden). Reaktive Sauerstoffradikale führen zu einer Peroxidation von Proteinen und Lipiden, wodurch es zur weiteren Schädigung der besonders empfindlichen Mitochondrien-Membran kommt.

Die resultierende Störung der mitochondrialen Membranintegrität und -permeabilität führt zur Freisetzung von pro-apoptischen Proteinen wie Cytochrom C, SMAC/Diablo und AIF aus den Mitochondrien. Die Cytochrom C-Freisetzung führt zu einer subsekventen Caspase 9-Aktivierung, daraus folgender Aktivierung der Caspasen 3, 6, 7, 8 und 10 und schließlich zur Apoptose (intrinsische Apoptose-Kaskade).

Der Abfall des intrazellulären pH-Wertes sowie eine p53-Aktivierung durch oxidative DNA-Schädigung induzieren eine Konformationsänderung und Translokation des pro-apoptischen Proteins Bax an die Mitochondrien-Membran, wodurch es ebenfalls zu einer Freisetzung von Cytochrom C, AIF und SMAC/Diablo aus der Mitochondrien-Membran sowie zur Apoptose-Caspase-Aktivierung (s.o.) kommt (intrinsische Apoptose-Kaskade).

Das bei Ischämie hochregulierte Protein Fas-Ligand (FasL) aktiviert bei Bindung an den Fas-Rezeptor die Caspasen 8 und 10, was zur subsekventen Aktivierung der Caspasen 3, 6 und 7 und damit zur Apoptose führt (extrinsische Apoptose-Kaskade).

Die Caspase 8 stimuliert über Aktivierung von Bid zu t-Bid wiederum die Bax-induzierte Apoptose.

Der pH-Abfall führt außerdem zur Aktivierung der JNK, die das anti-apoptische Protein Bcl-x_(L) hemmt und dadurch Bax-induzierte Apoptose verstärkt.

Durch neuronale Membrandepolarisation kommt es daneben zur erhöhten präsynaptischen Freisetzung von Glutamat. Glutamat aktiviert postsynaptische ionotrope Calcium-Rezeptoren. Subsequenter intrazellulärer Calciumüberschuss führt zur mitochondrialen Depolarisation und Aktivierung oxidativer Enzyme wie der NO-Synthetase (e-NOS) und der Xanthinoxidase (Exzitotoxizität). Dies mündet schließlich ebenfalls über eine gesteigerte Produktion freier Radikale (ROS) in die Apoptose (s.o.).

Starker intrazellulärer Calciumanstieg aktiviert außerdem über die Proteinphosphatase Calcineurin das pro-apoptische Protein Bad. Bad hemmt daraufhin das anti-apoptische Protein Bcl-x_L. Daneben aktiviert intrazellulärer Calciumüberschuss auch das pro-apoptische Protein PAR4, das die Expression der anti-apoptischen Proteine Bcl-x_(L) und Bcl-2 hemmt.

3.1.1. Pro-apoptotische Proteine

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Prnp^{+/+}-Mäuse bereits ohne Ischämie signifikant höhere Level der pro-apoptotischen Initiatorcaspasen Procaspase 8 und Caspase 10 aufwiesen als Prnp^{-/-}-Mäuse (t-Test). In der ANOVA zeigten sich zudem signifikante Unterschiede in der Expression der Caspasen 3, 6, 7, 8, 10 und Procaspase 8 zwischen den vier Mausgruppen. Während sich im t-Test bei den Caspasen 3, 6, 7, 8 und 9 zwar im Einzelnen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Prnp^{+/+}-Mäusen und den Prnp^{-/-}-Mäusen fanden, zeigten die Apoptose-Caspasen (Caspasen 3, 6, 7, 8, 9, 10 und Procaspase 8) in der Summe jedoch sowohl ohne Ischämie als auch nach Ischämie eine hoch signifikant stärkere Expression in den Prnp^{+/+}-Mäusen als in den Prnp^{-/-}-Mäusen. Zu diesen Caspasen existieren derzeit leider keine direkt vergleichbaren Literaturangaben bezüglich der Prnp^{+/+}- und der Prnp^{-/-}-Ischämiemäuse.

Die Proteinlevel der aktivierten Caspase 3 waren jedoch in den Prnp^{+/+}-Ischämiemäusen und den Prnp^{-/-}-Ischämiemäusen etwa gleich hoch. Dazu ist anzumerken, dass bisherige Publikationen über eine unterschiedliche Caspase 3-Aktivität in Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäusen nach Ischämie/Reperfusion berichteten: In den Experimenten von Spudich et al. war die Caspase 3-Aktivität erst nach einer Reperfusionsdauer von 72 Stunden in den Prnp^{-/-}-Mäusen signifikant höher als in den Prnp^{+/+}-Mäusen (Spudich et al., 2005). Das bestätigten auch Weise et al., die nach 6-stündiger Reperfusion noch keinen Unterschied in der Caspase 3-Aktivität messen konnten. Hier ließ sich erst nach 24-stündiger Reperfusion in den Prnp^{-/-}-Mäusen eine signifikant stärkere Caspase 3-Aktivität als in den Prnp^{+/+}-Mäusen beobachten (Weise et al., 2006). Somit wäre also nach der in dieser Arbeit verwendeten 4-stündigen Reperfusion auch kein Anstieg zu erwarten - die Literatur wird bestätigt.

Die hier gefundenen höheren Expressionswerte der Apoptose-Caspasen in den Prnp^{+/+}-Mäusen sowohl bereits im Shamzustand als auch nach Ischämiebehandlung ist in Anbetracht des postulierten neuroprotektiven Effekts des Prionproteins zunächst überraschend. Allerdings muss eine höhere Caspase-Expression nicht zugleich mit einer höheren Caspase-Aktivität einhergehen, wie der Vergleich der aktiven und inaktiven Form der Caspase 3 nach Ischämie zeigt.

Einen möglichen Erklärungsansatz für die postulierte anti-apoptotische Wirkung des Prionproteins trotz höherer Caspase-Expression stellt die Beobachtung dar, dass die Prnp^{+/+}-Mäuse in dieser Arbeit auch gleichzeitig eine höhere Expression anti-apoptotischer Proteine

und somit sogar stärkere Schutzmechanismen gegenüber Caspase-Aktivierung als die Prnp^{-/-}-Mäuse aufwiesen (siehe D. Diskussion, 3.1.2. Anti-apoptotische Proteine).

Der Vergleich zwischen Sham- und Ischämiezustand zeigte erwartungsgemäß einen Anstieg der Apoptose-Caspasen 6, 7 und Procaspase 8 nach der Ischämiebehandlung. Dabei konnte in den Prnp^{-/-}-Mäusen ein fast doppelt so starker Anstieg der Apoptose-Caspasen nach Ischämiebehandlung als in den Prnp^{+/+}-Mäusen beobachtet werden, nämlich:

Caspase 6: 18 % in den Prnp^{-/-} - vs. 10 % in den Prnp^{+/+}-Mäusen

Caspase 7: 14 % in den Prnp^{-/-} - vs. 3 % in den Prnp^{+/+}-Mäusen

Procaspase 8: 27 % in den Prnp^{-/-} - vs. 15 % in den Prnp^{+/+}-Mäusen

Diese Ergebnisse passen gut zu dem größeren Infarktvolume in den Prnp^{-/-}-Mäusen. Man könnte mutmaßen, dass hier die verstärkte Apoptose den sekundären Infarktschaden reflektiert. Um diese Hypothese zu erhärten, wären jedoch weiterführende Studien erforderlich, die vor allem auch eine protrahierte Reperfusionzeit verwenden, da hierbei die Unterschiede noch deutlicher ausfallen dürften. Allerdings dürfen die Caspasen nicht isoliert, sondern müssen in Zusammenhang mit anderen Proteinen, die auf die Apoptose Einfluss nehmen, betrachtet werden (siehe unten).

Ebenso wie die Caspasen stiegen auch die pro-apoptotischen Proteine PAR4 und AIF in den Prnp^{-/-}-Mäusen nach Ischämie stärker gegenüber dem Shamzustand an als in den Prnp^{+/+}-Mäusen. Der PAR4-Anstieg nach Ischämie (um 13 %) zeigte in den Prnp^{-/-}-Mäusen einen statistischen Trend. PAR4 wird durch Glutamat-induzierte intrazelluläre Calciumerhöhung sowie durch reaktive Sauerstoffradikale (ROS) bei transienter cerebraler Ischämie aktiviert und hemmt die Transkription der anti-apoptotischen Proteine Bcl-x_L und Bcl-2 (siehe Abbildung 102). PAR4 wird nach transienter cerebraler Ischämie vor allem in kortikalen Neuronen in der Penumbra des Infarkts exprimiert (Culmsee et al., 2001; Mattson et al., 2000). Die frühe Hochregulation von PAR4 nach transienter Ischämie und Reperfusion spielt möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Induktion von ischämischen neuronalen Zelltod (Culmsee et al., 2001; Mattson et al., 2000). Die stärkere postischämische PAR4-Hochregulation in den Prnp^{-/-}-Mäusen könnte damit zu ihrer erhöhten cerebralen Ischämie-Anfälligkeit, insbesondere der Kortex-Areale, beigetragen haben (siehe auch D. Diskussion, 2. Histologie: Größe und Verteilungsmuster des Infarkts in Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäusen).

Insgesamt zeigten praktisch alle untersuchten pro-apoptotischen Proteine dieselbe Tendenz, das heißt einen höheren Basallevel in den Prnp^{+/+}-Shammäusen als in den Prnp^{-/-}-Shammäusen, aber nach Ischämiebehandlung einen, im Verhältnis zum Shamzustand, stärkeren Anstieg in den Prnp^{-/-}-Mäusen als in den Prnp^{+/+}-Mäusen. Es ist daher zumindest von einem „Ungleichgewicht“ Apoptose-assoziiierter Faktoren in den Prnp^{-/-}-Mäusen auszugehen. Der Einfluss des Prioproteins scheint auf dieser Ebene „multifaktoriell“ zu sein. Dies könnte auch die in vorangegangenen Arbeiten beobachtete erhöhte Anfälligkeit von Prnp^{-/-}-Zellen gegenüber durch Serumentzug-induzierter Apoptose erklären (Kim et al., 2004; Kuwahara et al., 1999; Nishimura et al., 2007; Roucou et al., 2005; Sakudo et al., 2003a; Sakudo et al., 2003b). Denn Serumentzug führt wahrscheinlich ebenso wie Ischämie über erhöhten oxidativen Stress (ROS), mitochondriale Depolarisation, Aktivierung von Caspasen (insbesondere der Caspasen 3 und 6) und Glutamat-induzierte intrazelluläre Calciumüberladung zum Zelltod (Atabay et al., 1996; Isahara et al., 1999; LeBlanc et al., 1999; Liu and Zhu, 1999). Die Vorgänge bei Serumentzug-induzierter Apoptose beruhen möglicherweise wesentlich auf einem signifikanten PAR4-Anstieg (Chan et al., 1999), so dass der PAR4- und Caspase-Anstieg in den Prnp^{-/-}-Zellen für Apoptose durch Substratmangel prädestinieren dürfte. Da PAR4 speziell die Transkription der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_(L) hemmt, passt hierzu, dass eine artifizielle Bcl-2- und Bcl-x_(L)-Überexpression die Prnp^{-/-}-Zellkulturen vor durch Serumentzug-induzierter Apoptose schützen konnte (Kuwahara et al., 1999; Nicolas et al., 2007; Sakudo et al., 2003a).

Neben einer stärkeren postischämischen Hochregulation pro-apoptotischer Proteine zeigten die Prnp^{-/-}-Mäuse in vorliegender Arbeit auch eine deutlich geringere Expression anti-apoptotischer Proteine, verglichen mit den Prnp^{+/+}-Mäusen, was sich gut mit der Hypothese eines „Ungleichgewichts“ Apoptose-assoziiierter Faktoren in den Prnp^{-/-}-Mäusen vereinbaren ließe (siehe folgendes Kapitel).

3.1.2. Anti-apoptotische Proteine

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die anti-apoptotischen Proteine DAPK und Cystatin A bereits im Shamzustand in den Prnp^{+/+}-Mäusen höhere Level als in den Prnp^{-/-}-Mäusen aufwiesen (Signifikanz für Cystatin A; statistischer Trend für DAPK). Es gibt Hinweise darauf, dass die DAPK durch intrazelluläre Calciumerhöhung aktiviert wird und bei oxidativem Stress die Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien sowie die Caspasen 9 und 3 hemmen kann (Jin et al., 2001; Jin and Gallagher, 2003). Bezüglich Cystatin A wurde postuliert, dass es über eine Hemmung der Caspase 3 anti-apoptotisch wirken kann (Jones et

al., 1998; Takahashi et al., 2007). Beide Proteine könnten somit in den Prnp^{+/+}-Mäusen als „Gegenspieler“ der hier ebenfalls stärker exprimierten Caspasen fungieren und über eine verstärkte Caspase-Hemmung zur Herabsetzung der Apoptose-Empfindlichkeit der Prnp^{+/+}-Mäuse führen.

In Bezug auf die DAPK- und Cystatin A-Expression fand sich nach Ischämie kein signifikanter Unterschied mehr zwischen Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäusen, was eine Beeinflussung der Apoptose-assoziierten Proteine insbesondere vor Ischämieeintritt nahelegt.

Das für Ischämie- und Serumentzug-induzierte Apoptose besonders bedeutende anti-apoptotische Protein Bcl-x_(L) zeigte im Shamzustand in den Microarrays eine etwas (aber nicht signifikant) stärkere Expression in den Prnp^{+/+}-Shammäusen. Ergänzend wurden die Bcl-x-Level in den beiden Shamgruppen mit Hilfe der präziseren Westernblot-Analysen verglichen. In beiden Serien konnte hier in den Prnp^{+/+}-Shammäusen eine signifikant stärkere Bcl-x-Expression als in den Prnp^{-/-}-Shammäusen nachgewiesen werden.

Auch nach Ischämie wiesen die Prnp^{+/+}-Mäuse signifikant höhere Bcl-x-Level als die Prnp^{-/-}-Mäuse auf (statistischer Trend für Bcl-x_(L)). In der ANOVA ergab sich sowohl für die Bcl-x- als auch für die Bcl-x_(L)-Expressionsunterschiede zwischen den vier Mausgruppen ein Trend. Die signifikant geringere postischämische Bcl-x-Expression in den Prnp^{-/-}-Mäusen passt gut zu dem stärkeren PAR4-Anstieg nach Ischämie in den Prnp^{-/-}-Mäusen, da PAR4 die Bcl-x_(L)-Transkription hemmt.

Bcl-x_(L) inhibiert die Ischämie-induzierte Apoptose durch Hemmung der Translokation von Bax an die Mitochondrien-Membran sowie durch Hemmung der Freisetzung von Cytochrom C und anderen pro-apoptotischen Proteinen aus der geschädigten Mitochondrien-Membran. Dies hat eine Inhibierung der Apoptose-Caspasen zur Folge (siehe C Ergebnisse, Abbildung 40).

In Zellkulturexperimenten konnte bereits gezeigt werden, dass eine artifizielle Überexpression des Proteins Bcl-2, das über dieselben Angriffspunkte wie Bcl-x_(L) anti-apoptotisch wirken kann, die Prnp^{-/-}-Zelle vor durch Serumentzug induzierter Apoptose schützen konnte (Kuwahara et al., 1999; Nicolas et al., 2007). Ein derartiger Mechanismus ließe sich daher auch für Bcl-x_(L) postulieren. Weiterhin wurde beschrieben, dass eine Vorbehandlung mit TNF- α die Prnp^{-/-}-Zellen resistent gegenüber Serumentzug-induzierter Apoptose machte - bedingt durch eine Hochregulation von Bcl-2 und Bcl-x_(L) (Sakudo et al., 2003a).

Somit könnte die in vorliegender Arbeit gefundene signifikant höhere Bcl-x_(L)-Expression der Prnp^{+/+}-Mäuse eine entscheidende Rolle für ihre höhere Resistenz gegenüber Ischämie und Serumentzug trotz höherer Caspase-Expression spielen.

Möglicherweise hat die unterschiedliche Bcl-x_(L)-Expression in Prnp^{-/-}- und Prnp^{+/+}-Mäusen noch weitere Bedeutung: In einer interessanten Arbeit konnte belegt werden, dass Bcl-x_L an der Regulation der synaptischen Plastizität sowie Lern- und Gedächtnisvorgängen beteiligt ist (Jonas, 2006). Tatsächlich findet sich in Prnp^{-/-}-Mäusen eine Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität, der räumlichen Lernfähigkeit und des Gedächtnisses, verglichen mit den Prnp^{+/+}-Mäusen (Colling et al., 1997; Criado et al., 2005; Coitinho et al., 2003; Nishida et al., 1997). Weiterführende Studien sind erforderlich, um hier einen Zusammenhang zwischen der höheren Expression des Proteins Bcl-x_L und der Nervenfaserverorganisation in den Prnp^{+/+}-Mäusen zu belegen.

Das je nach intrazellulärer Lokalisation pro- oder anti-apoptotisch wirksame Protein DAXX zeigte einen signifikant höheren Basallevel in den Prnp^{+/+}-Mäusen bei einem stärkeren (signifikanten) Ischämie-bedingten Anstieg in den Prnp^{-/-}-Mäusen.

Einerseits scheint die Proteinkinase DAXX, wenn sie im Zellkern lokalisiert ist, anti-apoptotisch zu wirken und vor inadäquater JNK- und Caspase-Aktivierung zu schützen und es gibt auch Hinweise darauf, dass eine DAXX-Inaktivierung die Zelle gegenüber Stress- und Ischämie-induzierter Apoptose sensibilisiert (Jung et al., 2007; Chen and Chen, 2003). Andererseits aktiviert die Proteinkinase DAXX, wenn sie im Zytoplasma lokalisiert ist, als pro-apoptotisches Protein die JNK (Jung et al., 2007). Es wurde beobachtet, dass es im Zuge ischämischer Ereignisse zu einer Translokation vom Kern ins Zytoplasma kommt (Jung et al., 2007), so dass eher von der pro-apoptotischen Wirkung durch den stärkeren Anstieg unter Ischämiebedingungen in den Prnp^{-/-}-Mäusen auszugehen ist.

Das Protein Bcl-10 war nach Sham- und nach Ischämiebehandlung in den Prnp^{+/+}-Mäusen stärker exprimiert als in den Prnp^{-/-}-Mäusen. In den Prnp^{-/-}-Mäusen fand sich nach Ischämie eine Hochregulation von Bcl-10 gegenüber dem Shamzustand, während sich die Bcl-10-Expressionslevel in den Prnp^{+/+}-Mäusen zwischen sham- und ischämiebehandelten Tieren kaum unterschieden. In der ANOVA zeigten die Bcl-10-Expressionsunterschiede zwischen den vier Mausgruppen eine Signifikanz. Bcl-10 ist ein Protein, dessen Gen durch seine Translokation in MALT-Lymphomen entdeckt wurde. Es besitzt eine sogenannte CARD

(**Caspase Recruitment Domain**). Die Bcl-10-Aktivierung in Lymphozyten erfolgt über Stimulation von B- bzw. T-Zellrezeptoren. Bcl-10 fungiert - wie andere Genprodukte der CARD-Gen-Familie - als Transduktor sowohl von Apoptose- als auch Überlebenssignalen in Lymphozyten (Hofmann et al., 1997).

Über Induktion von NF- κ B kann BCL-10 pro- und anti-apoptotische Signale aktivieren und unter Anderem zur Hochregulation der Expression von TNF- α , c-myc, Interleukinen, Bcl-x_(L) und Bcl-2 führen. Dies würde gut zur signifikant stärkeren Bcl-x_(L)-Expression in den Prnp^{+/+}-Mäusen verglichen mit den Prnp^{-/-}-Mäusen passen. Da in dieser Arbeit jedoch Hirn- und nicht Lymphgewebe analysiert wurde, bleibt die Relevanz von Bcl-10, das bisher fast ausschließlich in Zusammenhang mit Lymphgewebe untersucht wurde, für cerebrale Ischämie unklar. Da allerdings eine gewisse Analogie des Mechanismus der Prionproteinaktivierung („Clustering“) zum Mechanismus der T-Zellaktivierung diskutiert wird (Stuermer et al., 2004; Stuermer and Plattner, 2005) und das Prionprotein auch in Lymphgewebe stark exprimiert wird (Cashman et al., 1990), ließe sich ein Zusammenhang vermuten, der in weiteren Studien untersucht werden sollte.

3.1.3. Interpretation und Ausblick: Apoptose-assoziierte Proteine

Unter der Annahme, dass sich die beobachteten Unterschiede so, wie sie hier gemessen wurden, in den verschiedenen Zelltypen (Glia, Neurone) ähnlich abspielen, könnte man diese in einem „Gesamtkonzept“ versuchen zu integrieren. Abbildung 103 zeigt ein solches Schema, in dem die potentiell durch das Prionprotein beeinflussten pro- und anti-apoptotischen Proteine sowie ihre Interaktionen untereinander dargestellt sind.

Die Unterschiede bezüglich der Apoptose-assoziierten Proteine zwischen den Prnp^{+/+}-Mäusen und den Prnp^{-/-}-Mäusen zeigten sich hier bereits im Shamzustand, was einen Einfluss des Prionproteins vor Ischämieeintritt nahelegt.

In der Literatur wurde in Abhängigkeit von der Anwesenheit Prionproteins eine „redoxsensitive“ Aktivierung Calcium-vermittelter Signalwege beschrieben (Krebs et al., 2007; Vassallo and Herms, 2003).

Eine „redoxsensitive“ Beeinflussung des zellulären „Calcium-Signaling“ durch das Prionprotein vor Eintritt letaler Ischämie könnte die stärkere Expression sowohl der pro- als auch der anti-apoptotischen Proteine in den Prnp^{+/+}-Mäusen erklären. Denn intrazelluläre Calciumerhöhung kann sich auf die pro- und anti-apoptotische Fraktion der Zelle gleichermaßen auswirken [zusammengefasst in (Saikumar et al., 1998; Mattson and Chan, 2003)] (siehe auch D. Diskussion, 3.6. Interpretation und Schlussfolgerung).

Der Nachteil der hier vorgestellten Experimente ist allerdings, dass nur eine kleine Anzahl von Mäusen untersucht wurde, so dass möglicherweise feinere Unterschiede nicht erfasst wurden. Weiterhin wurden Nekrose, Penumbra und umgebendes vitales Hirngewebe gemeinsam gemessen und aus technischen Gründen auch nicht zwischen verschiedenen Zelltypen (Glia, Neune) unterschieden. Die in einer Zelle schematisch dargestellten Zusammenhänge können deshalb nur hypothetischen Charakter haben.

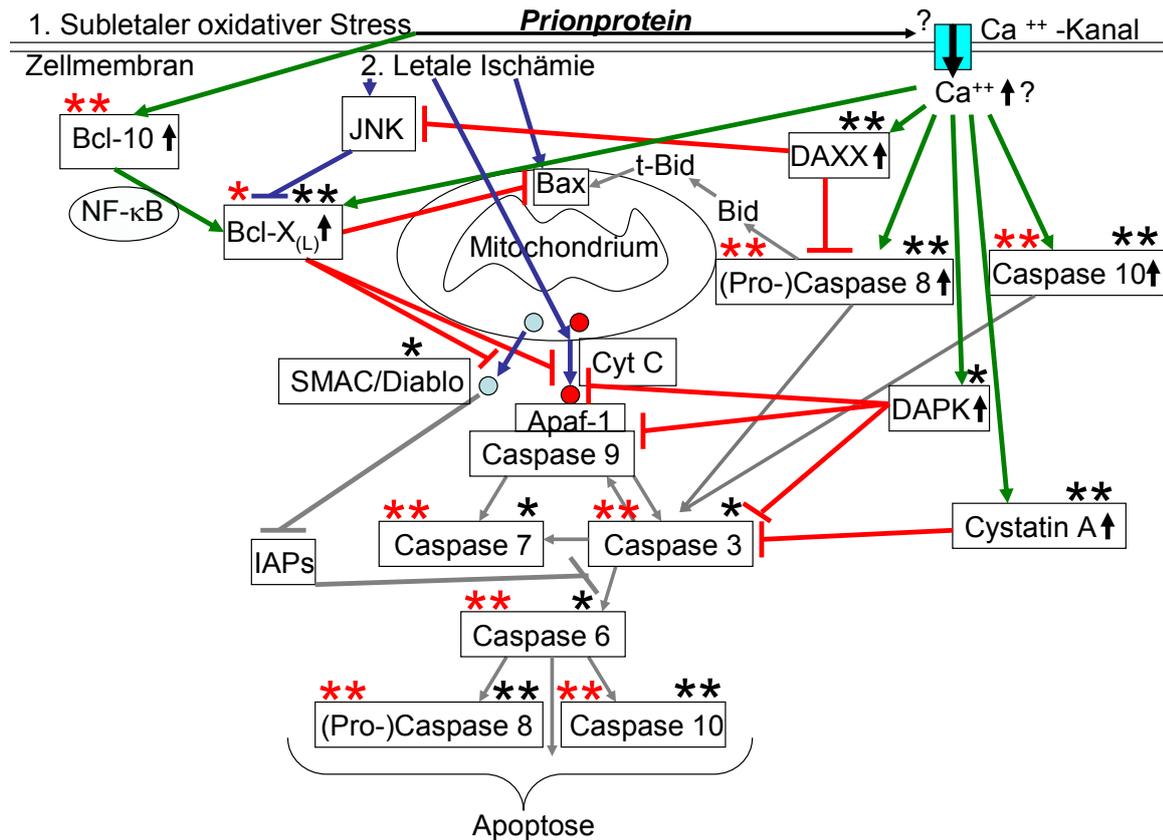
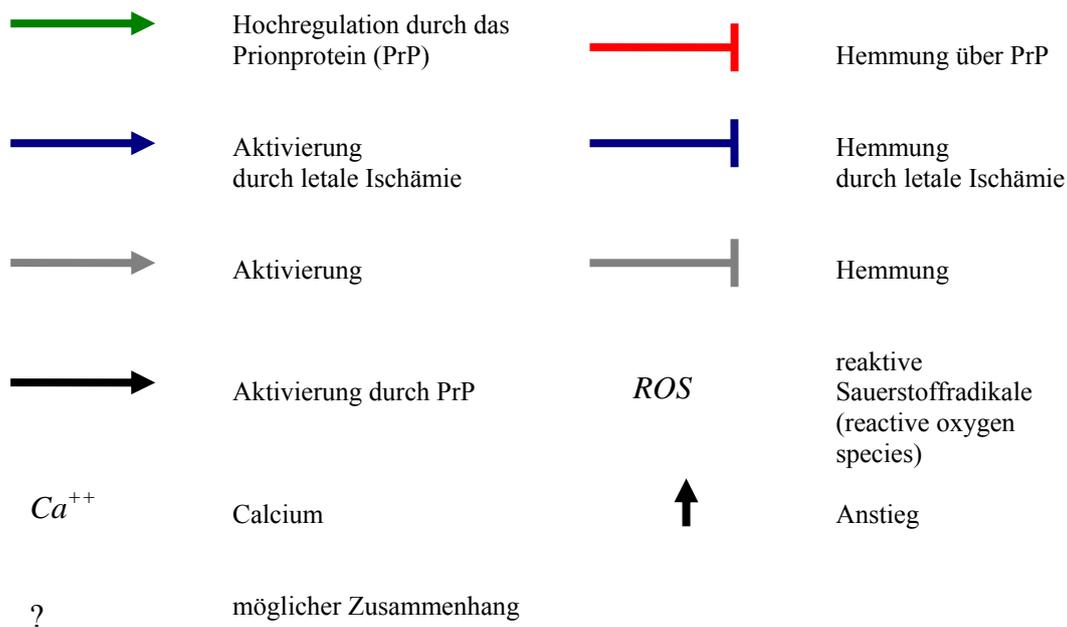


Abbildung 103: Modulation der pro- und anti-apoptischen Proteine in Abhängigkeit von der Expression des Prionproteins (*=Trend im t-Test; **=Signifikanz im t-Test; *=Trend in der ANOVA; **=Signifikanz in der ANOVA; 1.=zeitlich früher; 2.=zeitlich später)



3.2. Zellzyklus-assozierte Proteine

Dem Prionprotein wird nicht nur eine anti-apoptotische Wirkung, sondern auch ein stimulierender Einfluss auf Zellwachstum, Zellproliferation und Differenzierung zugeschrieben (Chen et al., 2003b; Graner et al., 2000b; Graner et al., 2000a; Kanaani et al., 2005; Liang et al., 2007b; Lopes et al., 2005; Pan et al., 2006; Santucci et al., 2005; Steele et al., 2006; Zhang et al., 2006a). Von besonderer Bedeutung sind daher die in vorliegender Arbeit beobachteten deutlichen Unterschiede zwischen den $Prnp^{+/+}$ - und $Prnp^{-/-}$ -Mäusen in der Expression von Proteinen des Cdk/Rb/E2F-Signalwegs.

3.2.1. Zellproliferationsfördernde Proteine

In den $Prnp^{+/+}$ -Shammäusen wurde in dieser Arbeit eine signifikant stärkere Expression der zellproliferationsfördernden Cyclin-abhängigen Kinase 6 (Cdk6) gefunden als in den $Prnp^{-/-}$ -Shammäusen. Auch die anderen proliferationsfördernden Proteine Cdc25, Cdk4, Cyclin A, Rbp und E2F zeigten im Shamzustand in den $Prnp^{+/+}$ -Mäusen etwas höhere Level als in den $Prnp^{-/-}$ -Mäusen. Zu diesen Proteinen existieren bisher in Zusammenhang mit dem Prionprotein keine gesicherten Erkenntnisse.

In der Literatur ist bislang nur eine durch das Prionprotein induzierte Cyclin D-Mehrexpression beschrieben worden (Liang et al., 2007b), allerdings in Magenkarzinomzellen. Diese lässt sich in vorliegender Arbeit wegen der relativ großen Streuung der Werte der Cyclin D-Expression im Gehirn nicht belegen. Nach Ischämiebehandlung waren jedoch die proliferationsfördernden Proteine Cdk4 und Cyclin A

in den Prnp^{+/+}-Mäusen signifikant stärker exprimiert als in den Prnp^{-/-}-Mäusen, welches als Hinweis auf eine vermehrte Mikroglia-proliferation in der Penumbra gewertet werden kann.

In einer anderen interessanten Studie wurde beobachtet, dass Cyclin D und Cdk4 nach transienter cerebraler Ischämie ausschließlich in nicht-apoptotischen postmitotischen Neuronen und Oligodendrozyten exprimiert wurden (Li et al., 1997). Dies passt gut zu der in dieser Arbeit beobachteten signifikant stärkeren postischämischen Cdk4-Expression im Hirn der Prnp^{+/+}-Mäuse, die somit Ausdruck einer verminderten neuronalen Apoptose-Rate in den Prnp^{+/+}-Mäusen sein könnte.

3.2.2. Antiproliferative Proteine

Im Gegensatz zu den proliferationsfördernden Proteinen waren die antiproliferativen Proteine Chk1/2 und p57^{kip2} im Shamzustand in den Prnp^{+/+}-Mäusen etwas schwächer exprimiert als in den Prnp^{-/-}-Mäusen. Die Kinasen Chk1 und Chk2 änderten ihre Expressionlevel in den Prnp^{-/-}-Mäusen nach Ischämie nicht signifikant gegenüber dem Shamzustand, p57^{kip2} fiel in den Prnp^{-/-}-Mäusen nach Ischämie signifikant gegenüber dem Shamzustand ab.

In den Prnp^{+/+}-Mäusen hingegen fand sich eine signifikante Hochregulation der Cdk-inhibierenden Kinase Chk2 sowie eine nicht signifikante Hochregulation der Cdk-inhibierenden Kinasen Chk1 und p57^{kip2} nach Ischämiebehandlung gegenüber dem Shamzustand.

Interessanterweise gibt es Studien, die zeigten, dass eine Cdk-Hemmung nach Ischämie/Reperfusion neuronales Überleben förderte und räumliche Lernfähigkeit verbesserte (Osuga et al., 2000; Rashidian et al., 2005; Wang et al., 2002), was gut zu den hier beobachteten Effekten bezüglich der Prionprotein-Expression passen würde.

3.2.3. Proteine, die sowohl proliferativ als auch antiproliferativ wirken: C-Abl

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass c-Abl in den Prnp^{+/+}-Mäusen stärker exprimiert war als in den Prnp^{-/-}-Mäusen (statistischer Trend nach Ischämie im t-Test und Signifikanz in der ANOVA). C-Abl hemmt den Cdk4/Cdk6/Cyclin D-Komplex (siehe C. Ergebnisse, Abbildung 61). So könnte c-Abl wie andere zellproliferationshemmende Proteine durch Inhibierung der Cdk4/6 neuronales Überleben nach Ischämie/Reperfusion fördern (Osuga et al., 2000; Rashidian et al., 2005; Wang et al., 2002). Es wurde in anderen Studien beobachtet, dass die Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase c-Abl für die Phosphorylierung von Caveolin unter oxidativem Stress notwendig war, die H₂O₂-induzierte Katalase-Aktivität über eine direkte Bindung an das Enzym steigern konnte und die H₂O₂-Konzentration in der Zelle sowie die

H₂O₂-abhängige Apoptoserate senken konnte (Sanguinetti et al., 2003; Sanguinetti and Mastick, 2003; Cao et al., 2003).

Prnp^{-/-}-Mäuse zeigten in vorangegangenen Studien eine höhere Vulnerabilität gegenüber Agenzien, die oxidativen Stress induzieren, wie H₂O₂, Xanthin-Oxidase und Kupferionen (Brown et al., 2002; White et al., 1999; Choi et al., 2007; Nishimura et al., 2004; Klamt et al., 2001; Brown et al., 1997b). Auch eine verminderte Katalase-Aktivität sowie eine verstärkte Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurden in Prnp^{-/-}-Zellen gefunden (Klamt et al., 2001; Wong et al., 2001). Dies wäre gut mit einer verminderten c-Abl-Expression in den Prnp^{-/-}-Mäusen vereinbar.

3.2.4. Proteine, die sowohl antiproliferativ als auch pro-apoptotisch wirken: p53

Die p53-Expression zeigte in dieser Arbeit zwischen den Prnp^{+/+}- und den Prnp^{-/-}-Mäusen keinen signifikanten Unterschied. Eine Assoziation der p53-Expression mit der Expression des Prionproteins wurde von verschiedenen Autoren vermutet, konnte aber bislang noch nicht vollständig aufgeklärt werden. So wurde in Prnp^{-/-}-Zellen teils eine höhere (Kim et al., 2004; Liang et al., 2006) und teils eine niedrigere p53-Expression (Brown et al., 2002; Paitel et al., 2003; Paitel et al., 2004) als in Prnp^{+/+}-Zellen beobachtet. In einer aktuelleren Publikation wurde eine Abhängigkeit der p53-Expression von der Spaltung des Prionproteins postuliert (Sunyach et al., 2007).

3.3. Spezielle Proteine der neuronalen Signaltransduktion

3.3.1. NMDA-Rezeptor

In dieser Arbeit konnte auf Proteinebene gezeigt werden, dass die NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR2A im Hirn von Prnp^{-/-}-Shammäusen stärker exprimiert war als im Hirn von Prnp^{+/+}-Shammäusen. Wie im Folgenden ausführlich diskutiert wird, könnte der NMDA-Rezeptor von zentraler Bedeutung für den molekularen Wirkungsmechanismus des Prionproteins sein.

Ergänzend zu den Protein-Microarray-Untersuchungen, die bereits einen Trend belegen, wurden die NR2A-Level der Prnp^{+/+}- und der Prnp^{-/-}-Shammausgruppe ergänzend im Westernblot quantifiziert. Hier war eindeutig eine signifikant stärkere Expression der NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR2A in den Prnp^{-/-}-Shammäusen nachweisbar.

Bislang finden sich in der Literatur dazu nur wenige Daten. Eine interessante Arbeit von Maglio et al. stellt jedoch übereinstimmend mit den hiesigen Ergebnissen im Hippocampus

von Prnp^{-/-}-Mäusen höhere NR2A-m-RNA-Level als im Hippocampus von Prnp^{+/+}-Mäusen fest (Maglio et al., 2006).

Der NMDA-Rezeptor ist ein ionotroper Glutamat-Rezeptor, der vor allem an den postsynaptischen Membranen neuronaler Zellen lokalisiert ist. Seine Aktivierung durch Glutamat stellt ein wesentliches Element für die Induktion synaptischer Plastizität, einem molekularen Mechanismus für Lernen und Gedächtnis, dar (Bliss and Collingridge, 1993). Zum besseren Verständnis wird sein Aufbau kurz dargestellt: Bei dem NMDA-Rezeptor handelt es sich um ein Heteromultimer, bestehend aus mindestens einer obligatorischen NR1-Untereinheit und mehreren modulatorischen NR2-Untereinheiten (NR2A-NR2D) (Stephenson, 2006; Hollmann and Heinemann, 1994; Sucher et al., 1996). In der Literatur wird sowohl die Struktur eines Tetramers als auch die eines Pentamers aus NR1- und NR2-Untereinheiten beschrieben (Behe et al., 1995; Premkumar and Auerbach, 1997). Durch alternatives Splicen des NR1-Transkripts (acht verschiedene Isoformen) und regional unterschiedliche Expression der vier verschiedenen NR2-Untereinheiten entstehen multiple NMDA-Rezeptor-Isoformen mit unterschiedlicher regionaler Verteilung im Hirn. Die hier untersuchte NR2A-Untereinheit wird vor allem im cerebralen Kortex, im Hippocampus und in den cerebellären Körnerzellen exprimiert. Während sich die NR2B-Untereinheiten vornehmlich in unreifen Neuronen in frühen postnatalen Entwicklungsstadien finden, werden die NR2A-Untereinheiten überwiegend in reifen Neuronen exprimiert („NR2B-NR2A developmental switch“) (Liu et al., 2004).

Die NR1-Untereinheiten binden an ihrer extrazellulären Domäne den Co-Agonisten Glycin, die NR2-Untereinheiten den Neurotransmitter Glutamat. Daneben besitzt jede Untereinheit eine ausgedehnte zytoplasmatische Domäne, die an verschiedenen Stellen durch eine Reihe von Proteinkinasen (z.B. Src, Fyn, PKC) und Proteinphosphatasen moduliert werden kann.

Durch Modifizierung der NR2-Untereinheiten (z.B. Phosphorylierung und Dephosphorylierung) werden die elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptors kontrolliert. An dieser Stelle könnte das Prionprotein einen entscheidenden Einfluss haben, aus dem sich nachfolgende Konsequenzen ergeben:

Die NMDA-Rezeptor-Aktivierung führt zu einem Einstrom von Calciumionen in die Nervenzelle. Durch eine Modulation der NMDA-Rezeptor-Aktivität findet eine empfindliche Beeinflussung der neuronalen Calcium-Homöostase statt. Sowohl eine pathologisch niedrige als auch eine pathologisch hohe NMDA-Rezeptor-Aktivierung wirken sich negativ auf das

neuronale Überleben aus [zusammengefasst in (Hardingham and Bading, 2003)]. Für die hier favorisierte Hypothese sei von einer verminderten NMDA-Rezeptoraktivität bei Depletion des Prionproteins ausgegangen. Dabei sind drei Punkte von Bedeutung:

1. Eine Blockade der NMDA-Rezeptor-Aktivität bewirkte *in vitro* (Brenneman et al., 1990; Ciani et al., 1997) und *in vivo* bei in der Entwicklung befindlichen Nagetieren ausgedehnte Apoptose in Hippocampus, Gyrus dentatus und Cerebellum (Ikonomidou et al., 1999; Turner et al., 2002; Olney et al., 2002; Gould et al., 1994), sensibilisierte neuronale Zellen gegenüber traumatischer Hirnschädigung (Ikonomidou et al., 2000; Pohl et al., 1999; Olney et al., 2002) und prädestinierte Neurone für Bax-induzierte Apoptose (Rivero Vaccari et al., 2006; Yoon et al., 2003; Wang et al., 2005; Wang et al., 2000).
2. Eine so genannte exzitotoxische Überstimulation des NMDA-Rezeptors infolge übermäßiger Glutamat-Freisetzung bei schwerer Ischämie, Hypoxie, Epilepsie oder traumatischer Hirnschädigung führt ebenfalls zu neuronaler Apoptose und Nekrose („exzitotoxischer Zelltod“) (Dirnagl et al., 1999; Hardingham and Bading, 2003; Lee et al., 1999; Olney et al., 1986; Slikker et al., 2005).
3. Es wurde beobachtet, dass eine NMDA-Rezeptor-Antagonisierung zu einer „kompensatorischen“ pathologischen Hochregulation von NMDA-Rezeptoren bzw. von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten führte, wie z.B. der NR2A-Untereinheit, und daraus eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber exzitotoxischer NMDA-Rezeptor-Überstimulation bei Ischämie, Hypoxie, Trauma und Epilepsie sowie gegenüber Bax-induzierter Apoptose resultierte (Slikker et al., 2005; Wang et al., 2000; Wang et al., 2005).

Die hier nachgewiesene stärkere NR2A-Gesamtexpression im Hirn der Prnp^{-/-}-Mäuse könnte also am ehesten Ausdruck einer teil-kompensierten NMDA-Rezeptor-Minderaktivierung unter „Normalbedingungen“ sein. Dies allein prädestiniert schon für eine höhere Anfälligkeit gegenüber Stressbedingungen. Das Ungleichgewicht wirkt sich aber unter „Ischämiebedingungen“ zudem negativ aus, da jetzt mit einer Überstimulation zu rechnen ist: Die Prnp^{-/-}-Mäuse werden gleichzeitig gegenüber Bax-induzierter Apoptose und exzitotoxischem Zelltod empfindlicher. Für diese These spricht, dass eine Deletion des Prionproteins speziell für die Bax-induzierte Apoptose prädestinierte (Bounhar et al., 2001; Kuwahara et al., 1999; Li and Harris, 2005; Roucou et al., 2003; Roucou et al., 2005) und zu einer verstärkten Anfälligkeit gegenüber cerebraler Ischämie, Hypoxie, Trauma und Epilepsie

fürte (Hoshino et al., 2003; McLennan et al., 2004; Mitteregger et al., 2007; Spudich et al., 2005; Walz et al., 1999; Walz et al., 2002; Weise et al., 2004; Weise et al., 2006).

Der NMDA-Rezeptor ist außerdem für den Vorgang der Langzeitpotenzierung (engl.: longterm potentiation: LTP, langdauernde Verstärkung synaptischer Erregungsübertragung als Folge vorangegangener hochfrequenter Stimulation der beteiligten Synapsen) verantwortlich. Die LTP stellt eine Grundlage für räumliches Lernen, Gedächtnis und synaptische Plastizität dar (Pastalkova et al., 2006; Whitlock et al., 2006). Tatsächlich zeigten $Prnp^{-/-}$ -Mäuse Defizite in räumlichem Lernen und Gedächtnis (Collinge et al., 1994; Criado et al., 2005; Manson et al., 1995; Curtis et al., 2003; Nishida et al., 1997; Colling et al., 1997; Coitinho et al., 2003), was auch zumindest partiell durch die hier beobachteten Unterschiede erklärt werden könnte. Coitinho et al. wiesen in den $Prnp^{-/-}$ -Mäusen eine verminderte Reagibilität auf eine Behandlung mit dem NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 nach, was ebenfalls einen Einfluss des Prionproteins auf die NMDA-Rezeptor-Aktivität vermuten lassen könnte (Coitinho et al., 2002). Hierzu passend wurde außerdem eine positive Korrelation zwischen dem Prionprotein-Expressionslevel und der Gesamtstärke der glutaminergen Erregungsübertragung im Hippocampus von Wildtyp-Mäusen gezeigt (Carleton et al., 2001).

Obwohl beide vorgestellten Thesen der Modulation der NMDA-Rezeptoraktivität durch das Prionprotein (Anfälligkeit gegenüber Ischämie und die Modulation der longterm potentiation) recht spekulativ und komplex sind, würden sie die bisher beobachteten Einflüsse des Prionproteins hinreichend erklären. Der NMDA-Rezeptor dürfte daher ein interessantes Target für zukünftige Studien darstellen. Es stellt sich dabei natürlich die Frage, auf welche Weise das Prionprotein die NMDA-Rezeptor-Aktivität positiv beeinflussen könnte. Hier könnte man ergänzend zwei Hypothesen diskutieren:

1. Redox-Hypothese: Interessanterweise kann die Aktivität des NMDA-Rezeptors durch chemische Reduktion stark erhöht und durch Oxidation stark vermindert werden. Diese vom Redox-Potential abhängige Modulation der NMDA-Rezeptor-Aktivität wird vermutlich durch bestimmte Redox-Moleküle wie Glutathion und Thioredoxin vermittelt, die den Rezeptor modifizieren (Aizenman et al., 1989; Gozlan and Ben Ari, 1995).

Tatsächlich zeigten $Prnp^{+/+}$ -Mäuse eine höhere Aktivität anti-oxidativer Enzyme, wie der Glutathion Reduktase und der Katalase, als $Prnp^{-/-}$ -Mäuse (White et al., 1999; Klamt et al., 2001). Auf diese Weise könnte eine Modulation der NMDA-Rezeptor-Aktivität durch das

Prionprotein erklärt werden. Von einigen Autoren wird sogar dem Prionprotein selbst eine Reduktionskapazität zugeschrieben (Brown et al., 1999; Brown et al., 2001), was sich jedoch in anderen Studien nicht verifizieren ließ (Jones et al., 2005) und aktuell aus verschiedenen Gründen umstritten ist [zusammengefasst in (Westergard et al., 2007)].

2. Signaling-Hypothese: NMDA-Rezeptoren sind zu 50-60 % in Lipid-Rafts lokalisiert (Besshoh et al., 2005). Speziell NMDA-Rezeptor-Isoformen, welche die NR2A-Untereinheit exprimieren, sind ebenso wie das Prionprotein während aller Entwicklungsstadien eines Säugetieres vornehmlich mit Lipid-Rafts assoziiert (Besshoh et al., 2007). Auch die Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn befindet sich hauptsächlich (zu 85-90 %) in Lipid-Rafts (Besshoh et al., 2005). Dabei kann die NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR2A durch die Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn phosphoryliert werden, wodurch es zu einer Aktivitätssteigerung des NMDA-Rezeptors kommt (Besshoh et al., 2005; Liu et al., 2001; Ma and Zhang, 2003; Takagi et al., 1999; Liu et al., 2003; Xu et al., 2006; Chen et al., 2003a).

Mehrfach wurde beschrieben, dass ein „Clustering“ („Verklebung“) des Prionproteins über Interaktion mit anderen Proteinen (Caveolin 1; Reggie 1/Reggie 2; N-CAM) zur Rekrutierung und Aktivierung der Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn führte (Mouillet-Richard et al., 2000; Santuccione et al., 2005; Krebs et al., 2007; Stuermer et al., 2004; Schneider et al., 2003; Chen et al., 2003b; Kanaani et al., 2005; Toni et al., 2006).

Auch der positive Einfluss des Prionproteins auf neuronales Wachstum und Überleben in Zellkultur war Fyn-abhängig (Chen et al., 2003b; Kanaani et al., 2005).

Somit bestünde die Möglichkeit, dass das Prionprotein über Aktivierung der Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn die Aktivität des NMDA-Rezeptors positiv beeinflussen und dadurch zugleich in die Regulation der Bax-induzierten Apoptose, des Neuronenwachstums, der synaptischen Plastizität und der LTP eingreifen könnte (siehe auch D. Diskussion, 3.6. Interpretation und Schlussfolgerung).

Zudem fiel auf, dass die Glutaminsäuredecarboxylase (GAD) in den Prnp^{-/-}-Mäusen etwas stärker exprimiert war als in den Prnp^{+/+}-Mäusen (statistischer Trend nach Ischämie).

Das könnte bedeuten, dass eine Deletion des Prionproteins mit einer verstärkten Umwandlung von Glutamat zu GABA einhergeht. Dies könnte zu einer oben postulierten verminderten NMDA-Rezeptor-Aktivierung in den Prnp^{-/-}-Mäusen beitragen. Über die genaue Funktion der GAD wird allerdings noch spekuliert. Daher ist weitere Forschungsarbeit nötig, um

herauszufinden, welche Bedeutung der GAD-Expression in Bezug auf den Prionprotein-Signalweg tatsächlich zukommt.

3.3.2. α 1-Syntrophin

In den $\text{Prnp}^{-/-}$ -Mäusen fand sich nach Ischämie eine signifikant stärkere Expression des Adapterproteins α 1-Syntrophin als in den $\text{Prnp}^{+/+}$ -Mäusen.

α 1-Syntrophin verankert den Wasserkanal AQP4, der in den perivaskulären Membranen von neuronalen Astrozyten konzentriert vorkommt, in der astrozytären Membran. Interessante Studien einer anderen Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass eine Deletion des α 1-Syntrophin-Gens über eine Reduktion von AQP4-Kanälen zu einer verzögerten und verminderten Hirnödementwicklung nach transients cerebraler Ischämie führte (Amiry-Moghaddam et al., 2003b; Amiry-Moghaddam et al., 2003a; Amiry-Moghaddam et al., 2004). Die stärkere α 1-Syntrophin-Expression in den $\text{Prnp}^{-/-}$ -Mäusen könnte somit durch Begünstigung der Ödembildung für die größeren Infarkt volumina in den $\text{Prnp}^{-/-}$ -Mäusen mitverantwortlich sein.

3.3.3. Synuclein- α

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die $\text{Prnp}^{-/-}$ -Mäuse nach Ischämiebehandlung höhere Synuclein- α -Level als die $\text{Prnp}^{+/+}$ -Mäuse aufwiesen (Trend). In der ANOVA stellten sich die Synuclein- α -Expressionsunterschiede zwischen den vier Mausgruppen hoch signifikant dar.

Es wurde beschrieben, dass chronischer oxidativer Stress zu einer erhöhten Synuclein- α -Expression und -Akkumulation führte (Quilty et al., 2006). Erhöhte Synuclein- α -Level begünstigten eine frühere Produktion von reaktiven Sauerstoff-Radikalen nach Ischämie/Reperfusion (Yoon et al., 2006). Zellen, die Synuclein- α exprimierten, zeigten außerdem verstärkt Apoptose-Merkmale wie Cytochrom C-Freisetzung und Akkumulation reaktiver Sauerstoffradikale im Vergleich zu Synuclein-Knock-out-Zellen (Witt and Flower, 2006). Somit könnte erhöhter oxidativer Stress aufgrund verminderter Toleranz gegenüber Ischämie in den $\text{Prnp}^{-/-}$ -Ischämiemäusen zu erhöhten Synuclein- α -Leveln geführt haben. Eine erhöhte Synuclein- α -Expression wiederum könnte zu der verstärkten Apoptose-Neigung der $\text{Prnp}^{-/-}$ -Mäuse nach Ischämie/Reperfusion beitragen.

3.4. Proteine des Zytoskeletts

Auch in Bezug auf die Expression der Proteine des Zytoskeletts verhielten sich die $\text{Prnp}^{+/+}$ -Mäuse und die $\text{Prnp}^{-/-}$ -Mäuse unterschiedlich. Die Proteine des Zytoskeletts werden im

Folgenden nur kurz diskutiert, da sie für die aktuelle Fragestellung von untergeordneter Relevanz sind.

3.4.1. Mikrotubulidynamik-assoziierte Proteine

Es fanden sich vor allem Expressionsunterschiede bei der Untergruppe von Proteinen, die mit der Mikrotubulidynamik assoziiert sind (α -Tubulin, MAP1-Proteine und OP18/Stathmin).

α -Tubulin ist ein Grundbaustein der Mikrotubuli und zeigte in den Prnp^{+/+}-Mäusen vor und nach Ischämie (Trend) niedrigere Level als in den Prnp^{-/-}-Mäusen. Beim Mechanismus des "Prionprotein-Clusterings" wurde eine direkte Interaktion des Prionproteins mit α -Tubulin beobachtet (Nieznanski et al., 2005).

MAP1-Proteine fördern die Polymerisation der Mikrotubuli und stabilisieren die Mikrotubulstruktur. In den Prnp^{+/+}-Mäusen, die einen niedrigeren MAP1-Ausgangslevel im Shamzustand als die Prnp^{-/-}-Mäuse zeigten, stieg der MAP1-Level nach Ischämie signifikant gegenüber dem Shamzustand an. In den Prnp^{-/-}-Mäusen hingegen änderten sich die MAP1-Level kaum nach Ischämie/Reperfusion gegenüber dem Shamzustand.

In einer vorangegangenen Arbeit wurden inhibierende Einflüsse des Prionproteins auf die Polymerisation der Mikrotubuli festgestellt, einhergehend mit einer geringeren Anzahl und einer Verkürzung der Mikrotubuli (Nieznanski et al., 2006).

Damit liegt nahe, dass das Prionprotein in die Mikrotubulidynamik der Zelle eingreifen könnte, auch wenn bislang noch unklar ist, welchen genauen Einfluss das Prionprotein auf die Mikrotubulidynamik ausüben könnte.

3.4.2. Neurofilament 200

Der Neurofilament 200-Level war nach Ischämiebehandlung sowohl in den Prnp^{+/+}-Mäusen als auch in den Prnp^{-/-}-Mäusen deutlich niedriger als im Shamzustand (Signifikanz in den Prnp^{+/+}-Mäusen).

Es wurde beschrieben, dass Neurofilament 200-Immunoreaktivität nach cerebraler Ischämie im Ischämieareal selbst gar nicht mehr detektierbar war und unmittelbar um das Infarktareal drastisch erniedigt war (Zhao et al., 2006; Camargo-De-Morais et al., 1996).

Die in dieser Arbeit nachgewiesene verminderte Neurofilament 200-Expression nach Ischämie könnte somit Ausdruck einer durch die Ischämie entstandenen Hirnschädigung sein.

3.4.3. Connexin 32

Connexin 32 war im Shamzustand in den Prnp^{-/-}-Mäusen signifikant stärker exprimiert als in den Prnp^{+/+}-Mäusen. Connexine sind die Grundbausteine der Gap junctions, die den

interzellulären Austausch kleiner Moleküle und elektrischer Ladungen ermöglichen. Es wurde eine Kollokalisierung des pathogenen Prionproteins PrP^{Sc} mit Connexin 32 beschrieben (Kovacs et al., 2005), woraus eine Assoziation des Prionproteins mit den „elektrischen Synapsen“ abgeleitet wurde. Jedenfalls wurde beschrieben, dass eine verminderte neuronale Expression von Gap junctions neuroprotektiv wirkt und vor traumatischer Hirnschädigung (mit konsekutiver Leckage und Depolarisation) schützen kann (Frantseva et al., 2002), was gut zu einer erhöhten Vulnerabilität der Prnp^{-/-}-Mäuse passen würde (Hoshino et al., 2003). Es ist nahe liegend, dass ein solcher Mechanismus auch für die ischämische Hirnschädigung zutrifft.

3.5. Proteine der Signaltransduktion

3.5.1. Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin

Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin sind allgemeine Marker für die unter oxidativem Stress verstärkt stattfindende Proteinphosphorylierung an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten. Daher war ein Anstieg aller phosphorylierten Aminosäuren nach Ischämie gegenüber dem Shamzustand zu erwarten, wie er in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte (Signifikanz bei Phosphoserin in den Prnp^{+/+}-Mäusen, Trend bei Phosphoserin in den Prnp^{-/-}-Mäusen, Trend bei Phosphothreonin in den Prnp^{+/+}-Mäusen). Auch in der ANOVA stellten sich die Phosphoserin- bzw. die Phosphotyrosin-Expressionsunterschiede zwischen den vier Mausgruppen signifikant bzw. als Trend dar. Da die Level phosphorylierter Proteine im Bereich einer Nekrose allerdings generell rasch abfallen, dürften die hier gemessenen Unterschiede zwischen Sham- und Ischämiezustand, insbesondere in den Prnp^{-/-}-Mäusen, noch deutlich unterschätzt werden.

3.5.2. PKC β/γ

Die Prnp^{+/+}-Mäuse zeigten in vorliegender Arbeit nach Shambehandlung eine etwas niedrigere Expression der PKC β und PKC γ als die Prnp^{-/-}-Mäuse. Dadurch waren sie möglicherweise weniger anfällig gegenüber ischämiebedingter neuronaler Schädigung. Tatsächlich zeigten PKC γ -Knockout-Mäuse signifikant niedrigere Infarkt volumina als die Wildtypkontrollen (Aronowski and Labiche, 2003).

In der Reperfusionphase nach transients cerebraler Ischämie hingegen scheint die PKC γ -Expression das neuronale Überleben zu begünstigen (Aronowski et al., 2000). In den Prnp^{+/+}-Mäusen fand sich nach Ischämie/Reperfusion eine signifikante Hochregulation der PKC β und der PKC γ gegenüber dem Shamzustand. Hierzu passend, wurde eine generelle

Steigerung der Expression und Aktivität der PKC nach Ischämie/Reperfusion beschrieben (Strasser et al., 1992). Die Prnp^{-/-}-Mäusen, die ein höheres PKC-Ausgangsniveau im Shamzustand zeigten, änderten ihre PKC β - und PKC γ -Level nach Ischämie/Reperfusion kaum gegenüber dem Shamzustand. Dies könnte ein Indiz für eine PKC-Fehlregulation in den Prnp^{-/-}-Mäusen sein, die zu ihrer erhöhten Ischämie-Anfälligkeit beitragen könnte.

In einer vorangegangenen interessanten Arbeit wurde eine Förderung axonalen Wachstums und synaptischer Plastizität durch rekombinantes Prionprotein über eine Beeinflussung des PKC-Signalwegs beschrieben (Kanaani et al., 2005).

3.5.3. ERK1/2

Im Shamzustand fand sich in vorliegender Arbeit bei einer relativ hohen Standardabweichung kein Unterschied zwischen den Prnp^{+/+}-Mäusen und den Prnp^{-/-}-Mäusen in Bezug auf die ERK1/2-Aktivität. Nach einstündiger Ischämie mit 4-stündiger Reperfusion zeigten die Prnp^{-/-}-Mäuse in dieser Arbeit eine stärkere ERK1/2-Aktivität als die Prnp^{+/+}-Mäuse (statistischer Trend). Hierzu passend, beschrieben Spudich et al. unter Verwendung von Westernblotanalysen und desselben Antikörpers wie in dieser Arbeit eine signifikant stärkere ERK1/2-Aktivität in den Prnp^{-/-}-Mäusen nach einer deutlich kürzeren (halbstündigen) Ischämie und 3-stündiger Reperfusion (Spudich et al., 2005). Dazu muss festgehalten werden, dass die ERK1/2-Aktivierung durch Ischämie einen typischen Zeitverlauf aufweist mit einem ersten Maximum nach 15 Minuten, einem beginnenden Abfall nach 30 Minuten und einem erneuten Anstieg nach 6 Stunden mit einem zweiten Maximum nach 72 Stunden (Sugino et al., 2000), und damit mit den hier gewählten Bedingungen nicht optimal erfasst werden kann.

Darüber hinaus ließ sich in vorliegender Arbeit eine Ischämie-bedingte Reduktion der ERK1/2-Gesamtexpression feststellen, entsprechend der generellen Proteindegeneration infolge eines ischämischen Hirnschadens.

Die Aktivität lässt sich auch relativ zur ERK1/2-Gesamtexpression betrachten: In den Prnp^{+/+}-Mäusen betrug der Anteil der aktivierten ERK1/2 vor Ischämie 54 % der Gesamtexpression, nach Ischämie und 4-stündiger Reperfusion nur noch 30 % der Gesamtexpression. In den Prnp^{-/-}-Mäusen unterschied sich der Anteil der aktivierten ERK vor Ischämie mit 49 % der Gesamtexpression wenig vom Anteil der aktivierten ERK in den Prnp^{+/+}-Mäusen. Nach Ischämie hingegen betrug der Anteil der aktivierten ERK1/2 in den Prnp^{-/-}-Mäusen 74 % der Gesamtexpression. Dies impliziert einen relativen Anstieg der ERK1/2-Aktivität in den Prnp^{-/-}-

-Mäusen nach Ischämie und 4-stündiger Reperfusion, wohingegen sie in den Prnp^{+/+}-Mäusen nach Ischämie und 4-stündiger Reperfusion gegenüber dem Shamzustand abfiel.

Der ERK1/2-Signalweg wird als Reaktion auf diverse Zellstressoren (z.B. durch H₂O₂, ROS, Calcium, niedriges Kalium, Wachstumshormonentzug etc.) aktiviert und kann je nach Aktivierungsmuster sowohl pro-apoptotische Effekte (Erhöhung der Bax- und p53-Expression, Freisetzung pro-apoptotischer Proteine aus den Mitochondrien etc.) als auch anti-apoptotische Effekte (Aktivierung anti-apoptotischer Transkriptionsfaktoren: CREB, NF-κB etc.) haben (siehe auch C. Ergebnisse, Abbildung 82). Die verstärkte postischämische ERK1/2-Aktivierung in den Prnp^{-/-}-Mäusen könnte damit zumindest auf stärkeren oxidativen Zellstress unter Ischämie-/Reperfusionsbedingungen hindeuten.

Mehrfach wurde eine artifizielle ERK1/2-Aktivierung als Folge einer Antikörper-vermittelten Prionprotein-Quervernetzung und einer Interaktion des Prionproteins mit Caveolin-1 beschrieben (Monnet et al., 2004; Stuermer et al., 2004; Toni et al., 2006; Schneider et al., 2003; Krebs et al., 2006).

Chiarini et al. zeigten allerdings, dass eine ERK1/2-Hemmung den neuroprotektiven Effekt des Prionproteins nicht aufheben konnte (Chiarini et al., 2002).

Ein molekularer Mechanismus, der in den Prnp^{-/-}-Mäusen unter Ischämie-/Reperfusionsbedingungen zu der hier und in der Arbeit von Spudich et al. beobachteten stärkeren ERK1/2-Aktivierung führen könnte, wird in Kapitel „D. Diskussion, 3.6. Interpretation und Schlussfolgerung“ vorgeschlagen.

3.5.4. NF-κB und IκB

Weder NF-κB noch IκB zeigten Trend oder Signifikanz beim Vergleich der vier untersuchten Mausgruppen. Dennoch fiel auf, dass die Prnp^{-/-}-Mäuse im Shamzustand eine etwas stärkere NF-κB-Expression als die Prnp^{+/+}-Mäuse aufwiesen. Dies passt sehr gut zu den Ergebnissen von Brown et al., die in Prnp^{-/-}-Mäusen eine signifikant höhere NF-κB-Expression als in Prnp^{+/+}-Mäusen feststellten (Brown et al., 2002).

3.5.5. Östrogenrezeptor

Nach Ischämiebehandlung zeigte der Östrogenrezeptor in den Prnp^{-/-}-Mäusen höhere Level als in den Prnp^{+/+}-Mäusen (statistischer Trend). Zwar handelt es sich hier bei den Versuchstieren um männliche Tiere, für deren Stoffwechsel Östrogen eine untergeordnete

Rolle spielt. Dennoch ist die Beobachtung aus dem Grund erwähnenswert, da sich weibliche Prnp^{-/-}-Mäuse bezüglich ihrer Läsionsvolumina bei Ischämie von ihren männlichen Artgenossen deutlich unterschieden. Weibliche Zrch I Prnp^{-/-}-Mäuse verhielten sich nach transienter cerebraler Ischämie wie Zrch I Prnp^{+/+}-Mäuse und zeigten keinen erhöhten neuronalen Schaden verglichen mit den Wildtyp-Kontrolltieren. Die männlichen Zrch I Prnp^{-/-}-Mäuse hingegen wiesen einen signifikant höheren neuronalen Schaden als die Wildtyp-Kontrolltiere auf (Sakurai-Yamashita et al., 2005). Östrogen besitzt einen neuroprotektiven Effekt bei transienter cerebraler Ischämie, wie bereits in zahlreichen Versuchen gezeigt werden konnte [zusammengefasst in (Brann et al., 2007)]. Für weibliche Tiere unter Ischämiebedingungen könnte eine unterschiedliche Östrogenrezeptor-Expression in Abhängigkeit vom Prionprotein möglicherweise von Bedeutung sein. Dies müsste allerdings in weiteren Studien mit weiblichen Tieren unter Einbeziehung von Messungen des Östrogenspiegels überprüft werden.

3.5.6. PKB/Akt

Oxidativer Zellstress aktiviert die PI3-Kinase. Diese wiederum phosphoryliert die Proteinkinase B und Akt (PKB/Akt). PKB/Akt kann daraufhin den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren und dadurch die Transkription anti-apoptotischer Proteine (z.B. Bcl-x_L, AIP) induzieren. Ferner wirkt PKB/Akt über Hemmung des pro-apoptotischen Proteins Bad anti-apoptotisch. Die PKB-Gesamtexpression unterschied sich kaum zwischen den Prnp^{+/+}- und den Prnp^{-/-}-Mäusen in dieser Arbeit. Im Shamzustand fand sich eine geringfügig stärkere PKB-Expression in den Prnp^{-/-}-Mäusen als in den Prnp^{+/+}-Mäusen, und die PKB-phosphoserin-Level waren ebenfalls in den Prnp^{-/-}-Mäusen etwas höher als in den Prnp^{+/+}-Mäusen. Weise et al. und Vassallo et al. beschrieben eine höhere PKB-Aktivität, das heißt einen höheren PKB-phosphoserin-Level, im Hirn von Prnp^{+/+}-Mäusen als im Hirn von Prnp^{-/-}-Mäusen (Weise et al., 2006; Vassallo et al., 2005).

Eine Rekrutierung der PI3-Kinase durch das Prionprotein unter oxidativem Stress schien einen neuroprotektiven Effekt zu haben (Vassallo et al., 2005). Nach einer einstündigen Ischämie mit 6-stündiger Reperfusion fanden Weise et al. vergleichsweise höhere PKB-phosphoserin-Level in den Prnp^{+/+}-Mäusen (Weise et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit stimmt das Expressionsmuster der PKB-phosphoserin eher mit dem Gesamt-Phosphoserin-Level überein (vergleiche C. Ergebnisse, 2.5.1. Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin). Da jedoch die Versuchsbedingungen nicht optimal auf diesen Signalweg ausgelegt waren (Zeitpunkt, Miteinbeziehung der Nekrose), können nur eingeschränkte Aussagen getroffen werden.

3.5.7. JNK

In Bezug auf die JNK-Aktivität fanden sich in dieser Arbeit mit 4-stündiger Reperfusion beim Vergleich der vier Mausgruppen weder ein Trend noch eine Signifikanz. Die hier beobachtete leicht verstärkte JNK-Aktivität in den Prnp^{-/-}-Mäusen lässt sich aber mit einer signifikant niedrigeren DAXX-Expression im Shamzustand gut in Einklang bringen. Denn eine Inaktivierung der Proteinkinase DAXX scheint die JNK-Aktivierung zu begünstigen (Chen and Chen, 2003; Jung et al., 2007).

Spudich et al. haben die JNK-Aktivität nach Ischämie mit 3-, 24- und 72-stündiger Reperfusion untersucht und fanden erst nach 72-stündiger Reperfusion eine signifikant stärkere JNK-Aktivität in den Prnp^{-/-}-Mäusen (Spudich et al., 2005).

3.5.8. Proteinphosphatasen

Die Expression der Map-Kinase-Phosphatase und der Proteinphosphatase-1 α wurde in den Prnp^{-/-}-Mäusen nach Ischämie gegenüber dem Shamzustand gesteigert (Signifikanz bzw. Trend), während sie sich in den Prnp^{+/+}-Mäusen nach Ischämie kaum gegenüber dem Shamzustand änderte. Auch die ANOVA zeigte eine Signifikanz bezüglich der Map-Kinase-Phosphatase-Expressionsunterschiede zwischen den vier Mausgruppen sowie einen Trend in Bezug auf die Proteinphosphatase-1 α -Expressionsunterschiede. Nach Ischämie/Reperfusion überstieg der Proteinphosphatase-Level der Prnp^{-/-}-Mäuse den der Prnp^{+/+}-Mäuse. Durch diesen vermehrten Anstieg, der sich aus der (größeren) Nekrose und der Penumbra der Prnp^{-/-}-Mäuse erklären dürfte, könnte eine primär verstärkte Phosphorylierung und damit Aktivierung der ERK1/2 maskiert werden, d.h. die Phosphorylierung der ERK1/2 wird in der vorliegenden Arbeit eher unterschätzt (siehe D. Diskussion, 3.5.3. ERK1/2).

Interessanterweise konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass eine Calcium/Calcineurin-abhängige Aktivierung der Proteinphosphatase-1 die neuronale „Langzeit-Depression“ (LTD) am NMDA-Rezeptor fördern konnte (Mulkey et al., 1994) [LTD (Long-Time-Depression): Verringerung der Reizübertragung (*-depression*) zwischen Nervenzellen bei langdauernder unterschwelliger Reizung, verantwortlich für den Vorgang des Vergessens, Gegenstück zur LTP (Langzeitpotenzierung) (Nägerl and Bonhoeffer, 2006)]. Die signifikante Expressionssteigerung der Proteinphosphatase-1 nach Ischämiebehandlung könnte die LTD in den Prnp^{-/-}-Mäusen fördern. Eine Beeinflussung von LTP, räumlichem Lernen und Gedächtnis durch das Prionprotein wurde mehrfach beschrieben (Collinge et al.,

1994; Criado et al., 2005; Manson et al., 1995; Curtis et al., 2003; Nishida et al., 1997; Colling et al., 1997; Coitinho et al., 2003).

3.6. Interpretation und Schlussfolgerung

Diese Arbeit wurde durchgeführt, um nähere Einblicke in die molekularen Mechanismen, die mit dem postulierten protektiven Effekt der Expression des Prionproteins bei cerebraler Ischämie assoziiert sind, zu erhalten.

Zunächst wurde die neuroprotektive Wirkung des Prionproteins näher untersucht. Dazu wurden in einer histologischen Untersuchung die Infarktvolumina zwischen Prnp^{+/+}-Mäusen und Prnp^{-/-}-Mäusen in verschiedenen Hirnregionen verglichen, wobei sich der neuroprotektive Effekt des Prionproteins - insbesondere in Bereichen des cerebralen Kortex - eindeutig bestätigte.

Anschließend wurden die Expressionsmuster verschiedenster Proteine aus den Bereichen Apoptose, Zellzyklus, Neurobiologie, Zytoskelett und Signaltransduktion mit Hilfe von Protein-Microarrays und Westernblots untersucht. Dazu wurden die Hirnlysate von Prnp^{+/+}- und Prnp^{-/-}-Mäusen vor und nach Ischämie eingesetzt. Es zeigte sich eine verminderte Expression sowohl pro- als auch anti-apoptotischer Proteine in den Prnp^{-/-}-Mäusen bereits vor Ischämie. Dies spricht für ein gestörtes Gleichgewicht der an der Apoptose beteiligten Proteine. Unter Ischämiebedingungen fand sich dann eine deutlich stärkere Hochregulation der pro-apoptotischen Proteine in den Prnp^{-/-}-Mäusen. Dies entspricht dem größeren Infarktvolumen der Prnp^{-/-}-Mäuse und demonstriert deren Sensibilität gegenüber schädigenden äußeren Einflüssen.

Viele in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen unter dem Einfluss des Prionproteins könnten durch Änderungen im „Calcium-Signaling“ erklärt werden, wie unter „D. Diskussion, 3.1.3. Interpretation und Ausblick: Apoptose-assoziierte Proteine“ ausführlich erläutert wurde.

Eine Beeinflussung der zellulären Calciumhomöostase durch das Prionprotein ist bereits mehrfach zuvor in anderem Gesamtzusammenhang beschrieben worden (Brini et al., 2005; Fuhrmann et al., 2006; Herms et al., 2000; Krebs et al., 2007; Stuermer et al., 2004; Stuermer and Plattner, 2005; Vassallo and Herms, 2003; Herms et al., 1997; Herms et al., 2001; Liang et al., 2007a; Shamloo et al., 2005; Liang et al., 2007a).

Auf der Suche nach möglichen Ursachen fiel die Mehrexpression der NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR2A in den Prnp^{-/-}-Mäusen auf. Wie unter „D. Diskussion, 3.3.1. NMDA-Rezeptor“ ausführlich erörtert, liegt die Vermutung nahe, dass die NR2A-Mehrexpression in den Prnp^{-/-}-Mäusen Ausdruck einer „teil-kompensierten“ NMDA-Rezeptor-Minderaktivierung sein könnte. Es wäre durchaus denkbar, dass das Prionprotein die Aktivität des NMDA-Rezeptors (positiv) moduliert. Wie dies genau geschieht, ist sehr spekulativ. Dennoch lassen sich Kausalzusammenhänge konstruieren, die den neuroprotektiven Effekt des Prionproteins mit einer Beeinflussung des „Calcium-Signaling“ über den NMDA-Rezeptor in Einklang bringen würden:

In einer vorangegangenen interessanten Arbeit wurde beobachtet, dass die durch das Prionprotein beeinflusste intrazelluläre Calciumerhöhung als Reaktion auf oxidativen Stress von einer Aktivierung der Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase Fyn abhängig war. Hieraus wurde eine Fyn-abhängige calciumvermittelte Sensorfunktion des Prionproteins für oxidativen Stress abgeleitet (Krebs et al., 2007; Vassallo and Herms, 2003).

Da eine Fyn-vermittelte Phosphorylierung des NMDA-Rezeptors zu einer Aktivitätssteigerung des Rezeptors führt (Xu et al., 2006; Kohr and Seeburg, 1996; Ma and Zhang, 2003), könnte das Prionprotein über eine Rekrutierung und Aktivierung der Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn („Clustering-Mechanismus“) „redoxsensitiv“ die NMDA-Rezeptor-Aktivität und damit das Calcium-Signaling positiv beeinflussen (Abbildung 104).

Tatsächlich ist beschrieben worden, dass eine subletale NMDA-Rezeptor-Stimulation auf oxidative Stimuli hin im Rahmen der sogenannten „ischämischen Präkonditionierung“ neuroprotektiv wirken und die Toleranz der Zelle gegenüber schwerer Ischämie oder Epilepsie erhöhen kann (Wang et al., 2006; Bond et al., 1999; Grabb and Choi, 1999; Kato et al., 1992; Marini et al., 2007; Semenov et al., 2002; Soriano et al., 2006).

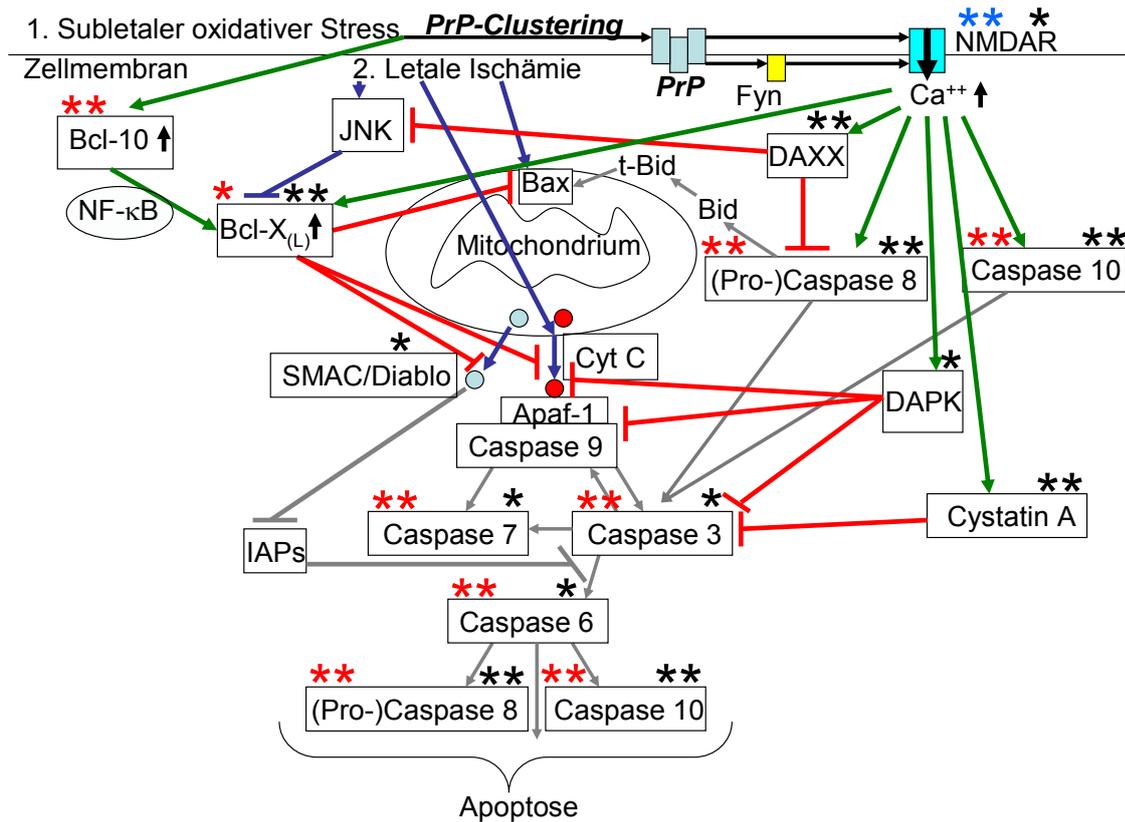
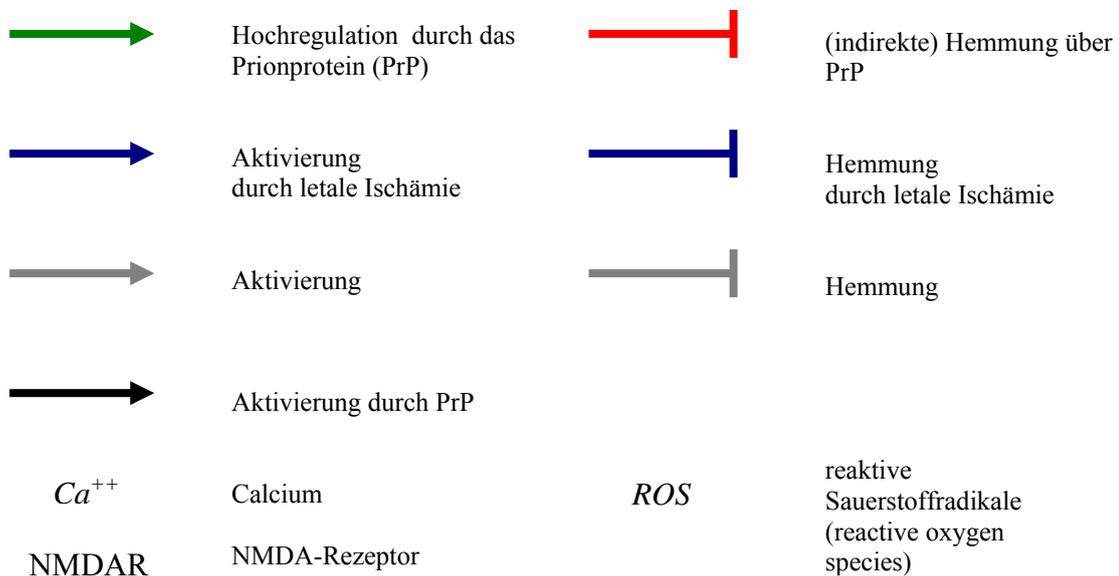


Abbildung 104: Postulierter molekularer Mechanismus des Prionproteins [*=Trend im t-Test; **=Signifikanz im t-Test; *=Trend in der ANOVA; **=Signifikanz in der ANOVA; **=Signifikanz im Westernblot (t-Test); 1.=zeitlich früher, 2.=zeitlich später]



Aus einer im Shamzustand verminderten NMDA-Rezeptor-Aktivierung und einer „kompensatorischen NR2A-Hochregulation“ in den *Prnp*^{-/-}-Mäusen könnte eine exzessive NMDA-Rezeptor-Überstimulation bei Ischämie oder Epilepsie resultieren (siehe auch D. Diskussion, 3.3.1. NMDA-Rezeptor).

Der hier postulierte Wirkungsmechanismus des Prionproteins könnte einerseits die positive Korrelation der Prionproteinexpression mit der glutaminergen Erregungsübertragung (Carleton et al., 2001) und gleichzeitig die andererseits postulierte Hyperexzitabilität des glutaminergen Systems in Prnp^{-/-}-Mäusen erklären (Maglio et al., 2004; Maglio et al., 2006). Auch die in dieser Arbeit gefundene stärkere postischämische ERK1/2-Aktivierung in den Prnp^{-/-}-Mäusen wäre für eine exzitotoxische NMDA-Rezeptor-Überstimulation charakteristisch. Ebenso ließe sich die stärkere postischämische PAR4-Hochregulation in den Prnp^{-/-}-Mäusen auf eine exzitotoxische NMDA-Rezeptor-Überstimulation mit exzessivem Calciumeinstrom zurückführen (Mattson et al., 2000).

Tatsächlich finden sich kürzlich erschienene Arbeiten, die einen weiteren Hinweis auf eine Modulation des NMDA-Rezeptors in Zusammenhang mit dem Prionprotein geben: (Khosravani et al., 2008; Steele, 2008).

Es lässt sich daraus zusammenfassend eine Hypothese für die erhöhte Anfälligkeit der Prnp^{-/-}-Mäuse gegenüber Ischämie, Hypoxie, Trauma, Serumdeprivation und Epilepsie, sowie den Einfluss des Prionproteins auf Langzeitpotenzierung, räumliches Lernen und Gedächtnis ableiten:

1. In den Prnp^{-/-}-Mäusen findet sich eine basale Störung im „Calcium-Signaling“ – möglicherweise über eine verminderte Aktivität des NMDA-Rezeptors.
2. Sowohl eine daraus resultierende verminderte Expression anti-apoptotischer Proteine als auch ein erhöhter NR2A-Level in den Prnp^{-/-}-Mäusen könnten unter kritischen Bedingungen wie Ischämie, Hypoxie, Trauma, Serumdeprivation oder Epilepsie eine stärkere Anfälligkeit gegenüber Apoptose und Glutamat-induzierter Exzitotoxizität bedingen.

Mit dieser Arbeit gelang es, wesentliche Daten für das Verständnis der physiologischen Funktion des Prionproteins zu liefern. Der erhöhten Anfälligkeit von Prnp^{-/-}-Mäusen gegenüber Ischämie liegt offensichtlich eine Dysbalance verschiedener zellulärer Mechanismen zugrunde. Dabei könnte der Einfluss des Prionproteins auf die NMDA-Rezeptor-Aktivität und somit auf die Calciumhomöostase die bisher beschriebenen Wirkungen des Prionproteins auf Calciumhomöostase, Bax-induzierte Apoptose, Ischämie, Epilepsie, Trauma, Serumdeprivation, neuronales Wachstum, Tumogenese, Langzeitpotenzierung, räumliches Lernen und Gedächtnis erklären. In weiterführenden Studien könnten diese Zusammenhänge näher untersucht werden.

E. Zusammenfassung

Das Prionprotein ist ein membranständiges Glykoprotein, das sich physiologischerweise bei Säugetieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen in fast jedem Entwicklungsstadium und fast jedem Zelltyp nachweisen läßt. Die höchsten Expressionslevel zeigen sich in Nervenzellen von Gehirn und Rückenmark sowie in Lymphozyten. Besonders konzentriert kommt es im Bereich neuronaler Synapsen vor. Innerhalb der Klasse der Säugetiere ist das zelluläre Prionprotein hoch konserviert, was eine bedeutende Funktion nahelegt.

Bislang konnten weder seine physiologische Funktion noch der Mechanismus, über den es seine Funktion ausüben könnte, vollständig geklärt werden. Versuche vorangegangener Arbeiten an murinen Tiermodellen ergaben Hinweise darauf, dass das Prionprotein eine neuroprotektive Wirkung unter oxidativem Stress bei transients cerebraler Ischämie und Epilepsie besitzen könnte.

Diese Arbeit befasst sich daher mit der Auswirkung der Expression des Prionproteins im murinen Infarktmodell sowohl auf den histologisch erfassbaren Gewebeschaden als auch auf die Veränderung verschiedener Proteinexpressions- und Aktivierungsmuster. Damit sollen Hinweise auf die zellulär-molekularen Mechanismen und Signalwege gefunden werden, über die das Prionprotein seine neuroprotektive Wirkung ausübt.

Der Infarkt wurde durch eine einstündige Okklusion der A. cerebri media mit anschließender Reperfusion induziert. Es wurden Prnp^{+/+}-Mäuse mit Prnp^{-/-}-Mäusen (♂, Littermates) verglichen. Dabei konnte der neuroprotektive Effekt des Prionproteins bestätigt werden. Die Prnp^{-/-}-Mäuse zeigten nach 24 h Reperfusion größere Infarktvolumina als die Prnp^{+/+}-Mäuse. Der Infarkt erstreckte sich über die Basalganglien, den motorischen, somatosensorischen, insulären und piriformen Kortex, sowie peri- und ektorhinalen Kortex. Der Hippocampus, die paraventriculären thalamischen Nuklei und der cinguläre Kortex blieben vom Infarkt verschont. Der insuläre und der piriforme Kortex profitierten nach Okklusion der A. cerebri media signifikant vom neuroprotektiven Effekt des Prionproteins.

Für die Untersuchung der Proteinexpression und Proteinaktivierung wurde eine Reperfusionszeit von 4 h gewählt. Es wurden Prnp^{-/-}- mit Prnp^{+/+}-Mäusen unter Sham- und unter Ischämiebedingungen verglichen. Mittels des Protein-Microarrays konnte eine Vielzahl

von Proteinen aus den Bereichen Apoptose, Zellzyklus, Neurobiologie, Zytoskelett und Signaltransduktion gleichzeitig analysiert werden. In den Prnp^{+/+}-Mäusen fiel bereits im Shamzustand eine stärkere Expression der Apoptose-induzierenden Caspasen, insbesondere der Procaspase 8 und der Caspase 10 auf. Gleichzeitig waren auch die anti-apoptotischen Proteine wie Cystatin A, Bcl-x und DAPK erhöht. Nach Ischämiebehandlung zeigten die Prnp^{+/+}-Mäuse eine stärkere Expression sowohl der Apoptose-Caspasen und des Proteins SMAC/Diablo als auch der anti-apoptotischen Proteine als die Prnp^{-/-}-Mäuse. Die sich bereits vor Ischämie (im Shamzustand) abzeichnende und die Ischämie überdauernde Dysbalance sowohl der pro- als auch der anti-apoptotischen Proteine in den Prnp^{+/+}-Mäusen könnte ein Hinweis für einen grundlegenden Einfluss durch das Prionprotein sein.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit Einflüsse des Prionproteins auf die Expression von Proteinen des Cdk/Rb/E2F-Signalwegs, des Zytoskeletts und der Neurobiologie nachgewiesen. Außerdem fanden sich bei einigen Protein-Kinasen Aktivitätsunterschiede zwischen Prnp^{+/+}-Mäusen und Prnp^{-/-}-Mäusen vor und nach Ischämie.

Interessanterweise zeigten die Prnp^{-/-}-Shammäuse in den Protein-Microarrays eine stärkere Expression der NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR2A als die Prnp^{+/+}-Shammäuse, die mittels Westernblot-Technik noch näher untersucht wurde. Der NMDA-Rezeptor beeinflusst empfindlich die Calcium-Homöostase und seine Überaktivität begünstigt die Apoptose. Es muss diskutiert werden, welche Rolle dem NMDA-Rezeptor bei den beobachteten Unterschieden zwischen den Prnp^{-/-}- und Prnp^{+/+}-Mäusen, insbesondere bezüglich der Dysbalance von pro- und anti-apoptotischen Proteinen, zuzuschreiben ist.

Sowohl die in der Literatur beschriebene Aktivierung der Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn durch das Prionprotein als auch Unterschiede im „Calcium-Signaling“ würden sich durch eine Beeinflussung der NMDA-Rezeptoraktivität erklären lassen und passen in das Bild der bisher beschriebenen Wirkungen des Prionproteins auf Bax-induzierte Apoptose, Ischämie, Epilepsie, neuronales Wachstum, Tumorgenese, Langzeitpotenzierung, räumliches Lernen und Gedächtnis. Die Modulation der NMDA-Rezeptoraktivität stellt einen möglichen Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung durch das Prionprotein dar.

F. Referenzen

- Aguzzi,A. (2003). Prions and the immune system: a journey through gut, spleen, and nerves. *Adv. Immunol.* *81*, 123-171.
- Aizenman,E., Lipton,S.A., and Loring,R.H. (1989). Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* *2*, 1257-1263.
- 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.
- Alper,T., Haig,D.A., and Clarke,M.C. (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *22*, 278-284.
- Amiry-Moghaddam,M., Otsuka,T., Hurn,P.D., Traystman,R.J., Haug,F.M., Froehner,S.C., Adams,M.E., Neely,J.D., Agre,P., Ottersen,O.P., and Bhardwaj,A. (2003a). An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain
AMIRYMOGHADDAM2003. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 2106-2111.
- Amiry-Moghaddam,M., Williamson,A., Palomba,M., Eid,T., de Lanerolle,N.C., Nagelhus,E.A., Adams,M.E., Froehner,S.C., Agre,P., and Ottersen,O.P. (2003b). Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 13615-13620.
- Amiry-Moghaddam,M., Xue,R., Haug,F.M., Neely,J.D., Bhardwaj,A., Agre,P., Adams,M.E., Froehner,S.C., Mori,S., and Ottersen,O.P. (2004). Alpha-syntrophin deletion removes the perivascular but not endothelial pool of aquaporin-4 at the blood-brain barrier and delays the development of brain edema in an experimental model of acute hyponatremia. *FASEB J.* *18*, 542-544.
- Anderson,R.M., Donnelly,C.A., Ferguson,N.M., Woolhouse,M.E., Watt,C.J., Udy,H.J., MaWhinney,S., Dunstan,S.P., Southwood,T.R., Wilesmith,J.W., Ryan,J.B., Hoinville,L.J., Hillerton,J.E., Austin,A.R., and Wells,G.A. (1996). Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* *382*, 779-788.
- Arnold,J.E., Tipler,C., Laszlo,L., Hope,J., Landon,M., and Mayer,R.J. (1995). The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J Pathol.* *176*, 403-411.
- 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 Cu²⁺ binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy. *Biochemistry* *39*, 13760-13771.
- Aronowski,J., Grotta,J.C., Strong,R., and Waxham,M.N. (2000). Interplay between the gamma isoform of PKC and calcineurin in regulation of vulnerability to focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* *20*, 343-349.

- Aronowski, J. and Labiche, L.A. (2003). Perspectives on reperfusion-induced damage in rodent models of experimental focal ischemia and role of gamma-protein kinase C. *ILAR. J.* 44, 105-109.
- Atabay, C., Cagnoli, C.M., Kharlamov, E., Ikonovic, M.D., and Manev, H. (1996). Removal of serum from primary cultures of cerebellar granule neurons induces oxidative stress and DNA fragmentation: protection with antioxidants and glutamate receptor antagonists. *J. Neurosci. Res.* 43, 465-475.
- Atarashi, R., Nishida, N., Shigematsu, K., Goto, S., Kondo, T., Sakaguchi, S., and Katamine, S. (2003). Deletion of N-terminal residues 23-88 from prion protein (PrP) abrogates the potential to rescue PrP-deficient mice from PrP-like protein/doppel-induced Neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* 278, 28944-28949.
- Azzalin, A., Ferrara, V., Arias, A., Cerri, S., Avella, D., Pisu, M.B., Nano, R., Bernocchi, G., Ferretti, L., and Comincini, S. (2006). Interaction between the cellular prion (PrP^C) and the 2P domain K⁺ channel TREK-1 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 108-115.
- 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.
- Behe, P., Stern, P., Wyllie, D.J., Nassar, M., Schoepfer, R., and Colquhoun, D. (1995). Determination of NMDA NR1 subunit copy number in recombinant NMDA receptors. *Proc. Biol. Sci.* 262, 205-213.
- 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.
- Besshoh, S., Bawa, D., Teves, L., Wallace, M.C., and Gurd, J.W. (2005). Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. *J. Neurochem.* 93, 186-194.
- Besshoh, S., Chen, S., Brown, I.R., and Gurd, J.W. (2007). Developmental changes in the association of NMDA receptors with lipid rafts. *J. Neurosci. Res.*
- Bliss, T.V. and Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
- 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.
- Bolton, D.C., Meyer, R.K., and Prusiner, S.B. (1985). Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein. *J. Virol.* 53, 596-606.
- Bond, A., Lodge, D., Hicks, C.A., Ward, M.A., and O'Neill, M.J. (1999). NMDA receptor antagonism, but not AMPA receptor antagonism attenuates induced ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 380, 91-99.

- Borchelt,D.R., Scott,M., Taraboulos,A., Stahl,N., and Prusiner,S.B. (1990). Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol.* *110*, 743-752.
- Bounhar,Y., Zhang,Y., Goodyer,C.G., and LeBlanc,A. (2001). Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* *276*, 39145-39149.
- Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248-254.
- Bragason,B.T. and Palsdottir,A. (2005). Interaction of PrP with NRAGE, a protein involved in neuronal apoptosis. *Mol. Cell Neurosci.* *29*, 232-244.
- Brann,D.W., Dhandapani,K., Wakade,C., Mahesh,V.B., and Khan,M.M. (2007). Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids* *72*, 381-405.
- Brenneman,D.E., Forsythe,I.D., Nicol,T., and Nelson,P.G. (1990). N-methyl-D-aspartate receptors influence neuronal survival in developing spinal cord cultures. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *51*, 63-68.
- Brini,M., Miuzzo,M., Pierobon,N., Negro,A., and Sorgato,M.C. (2005). The prion protein and its paralogue Doppel affect calcium signaling in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2799-2808.
- Brown,D.R. and Besinger,A. (1998). Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem. J.* *334* (Pt 2), 423-429.
- Brown,D.R., Clive,C., and Haswell,S.J. (2001). Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *J. Neurochem.* *76*, 69-76.
- Brown,D.R., Nicholas,R.S., and Canevari,L. (2002). Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J. Neurosci. Res.* *67*, 211-224.
- Brown,D.R., Qin,K., Herms,J.W., Madlung,A., Manson,J., Strome,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
BROWN1997. *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 Pt 1*, 1-5.
- Brunet,A., Datta,S.R., and Greenberg,M.E. (2001). Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr. Opin. Neurobiol.* *11*, 297-305.

Bueler, 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.

Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.

Camargo-De-Morais, M., De Freitas, M., De Mattos, A.G., Schroder, N., Zilles, A.C., Lisboa, C.S., Arteni, N., Barlem, A., Schierholt, R., Zwetsch, G., Souza, C.A., Pessoa-Pureur, R., and Netto, C.A. (1996). Effects of brain ischemia on intermediate filaments of rat hippocampus. *Neurochem. Res.* 21, 595-602.

Cao, C., Leng, Y., and Kufe, D. (2003). Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. *J. Biol. Chem.* 278, 29667-29675.

Carleton, A., Tremblay, P., Vincent, J.D., and Lledo, P.M. (2001). Dose-dependent, prion protein (PrP)-mediated facilitation of excitatory synaptic transmission in the mouse hippocampus. *Pflugers Arch.* 442, 223-229.

Cashman, N.R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascsak, R.J., Bolton, D.C., and Bendheim, P.E. (1990). Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* 61, 185-192.

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.

Chan, S.L., Tammariello, S.P., Estus, S., and Mattson, M.P. (1999). Prostate apoptosis response-4 mediates trophic factor withdrawal-induced apoptosis of hippocampal neurons: actions prior to mitochondrial dysfunction and caspase activation
CHAN1999. *J. Neurochem.* 73, 502-512.

Chandler, R.L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* 1, 1378-1379.

Chen, L.Y. and Chen, J.D. (2003). Daxx silencing sensitizes cells to multiple apoptotic pathways. *Mol. Cell Biol.* 23, 7108-7121.

Chen, M., Hou, X., and Zhang, G. (2003a). Tyrosine kinase and tyrosine phosphatase participate in regulation of interactions of NMDA receptor subunit 2A with Src and Fyn mediated by PSD-95 after transient brain ischemia. *Neurosci. Lett.* 339, 29-32.

Chen, S., Mange, A., Dong, L., Lehmann, S., and Schachner, M. (2003b). Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol. Cell Neurosci.* 22, 227-233.

Chen, S.G., Teplow, D.B., Parchi, P., Teller, J.K., Gambetti, P., and Autilio-Gambetti, L. (1995). Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J Biol. Chem.* 270, 19173-19180.

- Chesebro,B., Race,R., Wehrly,K., Nishio,J., Bloom,M., Lechner,D., Bergstrom,S., Robbins,K., Mayer,L., Keith,J.M., and . (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315, 331-333.
- Chiarini,L.B., Freitas,A.R., Zanata,S.M., Brentani,R.R., Martins,V.R., and Linden,R. (2002). Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* 21, 3317-3326.
- Cho,H.J. (1976). Is the scrapie agent a virus? *Nature* 262, 411-412.
- Choi,C.J., Anantharam,V., Saetveit,N.J., Houk,R.S., Kanthasamy,A., and Kanthasamy,A.G. (2007). Normal Cellular Prion Protein Protects against Manganese-Induced Oxidative Stress and Apoptotic Cell Death. *Toxicol. Sci.* 98, 495-509.
- Ciani,E., Rizzi,S., Paulsen,R.E., and Contestabile,A. (1997). Chronic pre-explant blockade of the NMDA receptor affects survival of cerebellar granule cells explanted in vitro. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 99, 112-117.
- Coitinho,A.S., Dietrich,M.O., Hoffmann,A., Dall'Igna,O.P., Souza,D.O., Martins,V.R., Brentani,R.R., Izquierdo,I., and Lara,D.R. (2002). Decreased hyperlocomotion induced by MK-801, but not amphetamine and caffeine in mice lacking cellular prion protein (PrP(C)). *Brain Res. Mol. Brain Res.* 107, 190-194.
- Coitinho,A.S., Roesler,R., Martins,V.R., Brentani,R.R., and Izquierdo,I. (2003). Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age. *Neuroreport* 14, 1375-1379.
- Colling,S.B., Collinge,J., and Jefferys,J.G. (1996). Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K⁺ currents. *Neurosci. Lett.* 209, 49-52.
- Colling,S.B., Khana,M., Collinge,J., and Jefferys,J.G. (1997). Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. *Brain Res.* 755, 28-35.
- Collinge,J., Whittington,M.A., Sidle,K.C., Smith,C.J., Palmer,M.S., Clarke,A.R., and Jefferys,J.G. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370, 295-297.
- Creutzfeldt,H.G. (1920). Über eine eigenartige herdhomige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 1-18.
- Criado,J.R., Sanchez-Alavez,M., Conti,B., Giacchino,J.L., Wills,D.N., Henriksen,S.J., Race,R., Manson,J.C., Chesebro,B., and Oldstone,M.B. (2005). Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol. Dis.* 19, 255-265.
- Crompton,M. (2000). Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J. Physiol* 529 Pt 1, 11-21.
- Cuille,J. and Chelle,P.I. (1939). Experimental transmission of trembling to the goat. *CR Seances Acad. Sci.* 1058-1060.
- Culmsee,C., Zhu,Y., Kriegstein,J., and Mattson,M.P. (2001). Evidence for the involvement of Par-4 in ischemic neuron cell death. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 21, 334-343.

Curtis,J., Errington,M., Bliss,T., Voss,K., and MacLeod,N. (2003). Age-dependent loss of PTP and LTP in the hippocampus of PrP-null mice. *Neurobiol. Dis.* 13, 55-62.

Diarra-Mehrpour,M., Arrabal,S., Jalil,A., Pinson,X., Gaudin,C., Pietu,G., Pitaval,A., Ripoche,H., Eloit,M., Dormont,D., and Chouaib,S. (2004). Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Cancer Res.* 64, 719-727.

Dirnagl,U., Iadecola,C., and Moskowitz,M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22, 391-397.

Drisaldi,B., Coomaraswamy,J., Mastrangelo,P., Strome,B., Yang,J., Watts,J.C., Chishti,M.A., Marvi,M., Windl,O., Ahrens,R., Major,F., Sy,M.S., Kretzschmar,H., Fraser,P.E., Mount,H.T., and Westaway,D. (2004). Genetic mapping of activity determinants within cellular prion proteins: N-terminal modules in PrPC offset pro-apoptotic activity of the Doppel helix B/B' region. *J. Biol. Chem.* 279, 55443-55454.

Drisaldi,B., Stewart,R.S., Adles,C., Stewart,L.R., Quaglio,E., Biasini,E., Fioriti,L., Chiesa,R., and Harris,D.A. (2003). Mutant PrP is delayed in its exit from the endoplasmic reticulum, but neither wild-type nor mutant PrP undergoes retrotranslocation prior to proteasomal degradation. *J Biol. Chem.* 278, 21732-21743.

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.

Edenhofer,F., Rieger,R., Famulok,M., Wendler,W., Weiss,S., and Winnacker,E.L. (1996). Prion protein PrPc interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J. Virol.* 70, 4724-4728.

Eigen,M. (1996). Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys. Chem.* 63, A1-18.

Fra,A.M., Williamson,E., Simons,K., and Parton,R.G. (1994). Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J. Biol. Chem.* 269, 30745-30748.

Frantseva,M.V., Kokarovtseva,L., Naus,C.G., Carlen,P.L., MacFabe,D., and Perez Velazquez,J.L. (2002). Specific gap junctions enhance the neuronal vulnerability to brain traumatic injury. *J. Neurosci.* 22, 644-653.

Fuhrmann,M., Bittner,T., Mitteregger,G., Haider,N., Moosmang,S., Kretzschmar,H., and Herms,J. (2006). Loss of the cellular prion protein affects the Ca²⁺ homeostasis in hippocampal CA1 neurons. *J. Neurochem.* 98, 1876-1885.

Gabriel,J.M., Oesch,B., Kretzschmar,H., Scott,M., and Prusiner,S.B. (1992). Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 9097-9101.

Gains,M.J., Roth,K.A., and LeBlanc,A.C. (2006). Prion protein protects against ethanol-induced Bax-mediated cell death in vivo. *Neuroreport* 17, 903-906.

Gajdusek,D.C., Gibbs,C.J., and Alpers,M. (1966). Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209, 794-796.

- Gajdusek,D.C. and Zigas,V. (1957). Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N. Engl. J. Med.* 257, 974-978.
- Gauczynski,S., Peyrin,J.M., Haik,S., Leucht,C., Hundt,C., Rieger,R., Krasemann,S., Deslys,J.P., Dormont,D., Lasmezas,C.I., and Weiss,S. (2001). The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J* 20, 5863-5875.
- Gerstmann,J., Sträussler,E., and Scheinker,J. (1936). Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z. Neurol.* 736-762.
- Gibbs,C.J., Jr., GAJDUSEK,D.C., Asher,D.M., Alpers,M.P., Beck,E., Daniel,P.M., and Matthews,W.B. (1968). Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161, 388-389.
- Gorodinsky,A. and Harris,D.A. (1995). Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin. *J Cell Biol.* 129, 619-627.
- Gould,E., Cameron,H.A., and McEwen,B.S. (1994). Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus. *J. Comp Neurol.* 340, 551-565.
- Gozlan,H. and Ben Ari,Y. (1995). NMDA receptor redox sites: are they targets for selective neuronal protection? *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 368-374.
- Grabb,M.C. and Choi,D.W. (1999). Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: critical role for NMDA receptors. *J. Neurosci.* 19, 1657-1662.
- Graham,S.H. and Chen,J. (2001). Programmed cell death in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 21, 99-109.
- 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. (2000a). Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 76, 85-92.
- Graner,E., Mercadante,A.F., Zanata,S.M., Martins,V.R., Jay,D.G., and Brentani,R.R. (2000b). Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein
Graner2000. *FEBS Lett.* 482, 257-260.
- Griffith,J.S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature* 215, 1043-1044.
- Gygi,S.P., Rochon,Y., Franza,B.R., and Aebersold,R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell Biol.* 19, 1720-1730.
- Hadlow,W.J. (1959). Scrapie and kuru. *Lancet* 289-290.
- Hafiz,F.B. and Brown,D.R. (2000). A model for the mechanism of astrogliosis in prion disease. *Mol. Cell Neurosci.* 16, 221-232.
- Hardingham,G.E. and Bading,H. (2003). The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci.* 26, 81-89.

- Harmey, J.H., Doyle, D., Brown, V., and Rogers, M.S. (1995). The cellular isoform of the prion protein, PrP^c, 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.
- Hata, R., Mies, G., Wiessner, C., Fritze, K., Hesselbarth, D., Brinker, G., and Hossmann, K.A. (1998). A reproducible model of middle cerebral artery occlusion in mice: hemodynamic, biochemical, and magnetic resonance imaging. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *18*, 367-375.
- He, L., Perkins, G.A., Poblenz, A.T., Harris, J.B., Hung, M., Ellisman, M.H., and Fox, D.A. (2003). Bcl-xL overexpression blocks bax-mediated mitochondrial contact site formation and apoptosis in rod photoreceptors of lead-exposed mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 1022-1027.
- 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.
- Herms, J., Tings, T., Gall, S., Madlung, A., Giese, A., Siebert, H., Schurmann, P., Windl, O., Brose, N., and Kretzschmar, H. (1999). Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J. Neurosci.* *19*, 8866-8875.
- Herms, J.W., Korte, S., Gall, S., Schneider, I., Dunker, S., and Kretzschmar, H.A. (2000). Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. *J. Neurochem.* *75*, 1487-1492.
- Herms, J.W., Kretzschmar, H.A., Titz, S., and Keller, B.U. (1995). Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar purkinje cells of prion protein knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* *7*, 2508-2512.
- Herms, J.W., Madlung, A., Brown, D.R., and Kretzschmar, H.A. (1997). Increase of intracellular free Ca²⁺ in microglia activated by prion protein fragment. *Glia* *21*, 253-257.
- Herms, J.W., Tings, T., Dunker, S., and Kretzschmar, H.A. (2001). Prion protein affects Ca²⁺-activated K⁺ currents in cerebellar purkinje cells. *Neurobiol Dis.* *8*, 324-330.
- Hofmann, K., Bucher, P., and Tschopp, J. (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem. Sci.* *22*, 155-156.
- Hollmann, M. and Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* *17*, 31-108.
- Hope, J., Morton, L.J., Farquhar, C.F., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Kimberlin, R.H. (1986). The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). *EMBO J.* *5*, 2591-2597.
- Hornshaw, M.P., McDermott, J.R., and Candy, J.M. (1995). Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *207*, 621-629.

- Hoshino,S., Inoue,K., Yokoyama,T., Kobayashi,S., Asakura,T., Teramoto,A., and Itohara,S. (2003). Prions prevent brain damage after experimental brain injury: a preliminary report. *Acta Neurochir. Suppl* 86, 297-299.
- Hutter,G., Heppner,F.L., and Aguzzi,A. (2003). No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo. *Biol. Chem.* 384, 1279-1285.
- Ikonomidou,C., Bosch,F., Miksa,M., Bittigau,P., Vockler,J., Dikranian,K., Tenkova,T.I., Stefovskva,V., Turski,L., and Olney,J.W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283, 70-74.
- Ikonomidou,C., Stefovskva,V., and Turski,L. (2000). Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 12885-12890.
- Isahara,K., Ohsawa,Y., Kanamori,S., Shibata,M., Waguri,S., Sato,N., Gotow,T., Watanabe,T., Momoi,T., Urase,K., Kominami,E., and Uchiyama,Y. (1999). Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. *Neuroscience* 91, 233-249.
- Jackson,G.S., Murray,I., Hosszu,L.L., 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.
- Jakob,A. (1921). Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befund. *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde* 132-146.
- 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.
- Jeffrey,M., Goodsir,C.M., Bruce,M.E., McBride,P.A., Scott,J.R., and Halliday,W.G. (1992). Infection specific prion protein (PrP) accumulates on neuronal plasmalemma in scrapie infected mice. *Neurosci. Lett.* 147, 106-109.
- Jeffrey,M., Halliday,W.G., Bell,J., Johnston,A.R., Macleod,N.K., Ingham,C., Sayers,A.R., Brown,D.A., and Fraser,J.R. (2000). Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus
1. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 26, 41-54.
- Jimenez-Huete,A., Lievens,P.M., Vidal,R., Piccardo,P., Ghetti,B., Tagliavini,F., Frangione,B., and Prelli,F. (1998). Endogenous proteolytic cleavage of normal and disease-associated isoforms of the human prion protein in neural and non-neural tissues. *Am. J Pathol.* 153, 1561-1572.
- Jin,Y., Blue,E.K., Dixon,S., Hou,L., Wysolmerski,R.B., and Gallagher,P.J. (2001). Identification of a new form of death-associated protein kinase that promotes cell survival. *J. Biol. Chem.* 276, 39667-39678.
- Jin,Y. and Gallagher,P.J. (2003). Antisense depletion of death-associated protein kinase promotes apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 51587-51593.
- Jonas,E. (2006). BCL-xL regulates synaptic plasticity. *Mol. Interv.* 6, 208-222.

- Jones,B., Roberts,P.J., Faubion,W.A., Kominami,E., and Gores,G.J. (1998). Cystatin A expression reduces bile salt-induced apoptosis in a rat hepatoma cell line. *Am. J. Physiol* 275, G723-G730.
- Jones,S., Batchelor,M., Bhelt,D., Clarke,A.R., Collinge,J., and Jackson,G.S. (2005). Recombinant prion protein does not possess SOD-1 activity. *Biochem. J.* 392, 309-312.
- Jung,Y.S., Kim,H.Y., Lee,Y.J., and Kim,E. (2007). Subcellular localization of Daxx determines its opposing functions in ischemic cell death. *FEBS Lett.* 581, 843-852.
- Kanaani,J., Prusiner,S.B., Diacovo,J., Baekkeskov,S., and Legname,G. (2005). Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. *J. Neurochem.* 95, 1373-1386.
- Kaneko,K., Vey,M., Scott,M., Pilkuhn,S., Cohen,F.E., and Prusiner,S.B. (1997). COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 2333-2338.
- Kang,S.G., Lee,D.Y., Kang,M.L., and Yoo,H.S. (2007). Biological characteristics of Chinese hamster ovary cells transfected with bovine Prnp. *J. Vet. Sci.* 8, 131-137.
- Kato,H., Liu,Y., Araki,T., and Kogure,K. (1992). MK-801, but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus. *Neurosci. Lett.* 139, 118-121.
- Khosravani,H., Zhang,Y., Tsutsui,S., Hameed,S., Altier,C., Hamid,J., Chen,L., Villemaire,M., Ali,Z., Jirik,F.R., and Zamponi,G.W. (2008). Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors
KHOSRAVANI2008. *J. Cell Biol.* 181, 551-565.
- Kim,B.H., Lee,H.G., Choi,J.K., Kim,J.I., Choi,E.K., Carp,R.I., and Kim,Y.S. (2004). The cellular prion protein (PrPC) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 124, 40-50.
- Klamt,F., Dal Pizzol,F., Conte da Frota ML JR, Walz,R., Andrades,M.E., da Silva,E.G., Brentani,R.R., Izquierdo,I., and Fonseca Moreira,J.C. (2001). Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1137-1144.
- Klatzko,I., Gajdusek,D.C., and Zigas,V. (1959). Pathology of Kuru. *Lab Invest* 8, 799-847.
- Kohr,G. and Seeburg,P.H. (1996). Subtype-specific regulation of recombinant NMDA receptor-channels by protein tyrosine kinases of the src family. *J. Physiol* 492 (Pt 2), 445-452.
- Kovacs,G.G., Preusser,M., Strohschneider,M., and Budka,H. (2005). Subcellular localization of disease-associated prion protein in the human brain. *Am. J. Pathol.* 166, 287-294.
- Kramer,M.L., Kratzin,H.D., Schmidt,B., Romer,A., Windl,O., Liemann,S., Hornemann,S., and Kretzschmar,H. (2001). Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J Biol. Chem.* 276, 16711-16719.
- Krebs,B., Dorner-Ciossek,C., Schmalzbauer,R., Vassallo,N., Herms,J., and Kretzschmar,H.A. (2006). Prion protein induced signaling cascades in monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 13-22.

- Krebs,B., Wiebelitz,A., Balitzki-Korte,B., Vassallo,N., Paluch,S., Mitteregger,G., Onodera,T., Kretzschmar,H.A., and Herms,J. (2007). Cellular prion protein modulates the intracellular calcium response to hydrogen peroxide. *J. Neurochem.* *100*, 358-367.
- Kretzschmar,H.A. and Feiden,W. (2002). [Human prion diseases]. *Pathologe* *23*, 241-251.
- 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.
- 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.
- Kuwahara,C., Takeuchi,A.M., Nishimura,T., Haraguchi,K., Kubosaki,A., Matsumoto,Y., Saeki,K., Matsumoto,Y., Yokoyama,T., Itohara,S., and Onodera,T. (1999). Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* *400*, 225-226.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* *227*, 680-685.
- Lang,D.M., Lommel,S., Jung,M., Ankerhold,R., Petrausch,B., Laessing,U., Wiechers,M.F., Plattner,H., and Stuermer,C.A. (1998). Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *J. Neurobiol.* *37*, 502-523.
- LeBlanc,A., Liu,H., Goodyer,C., Bergeron,C., and Hammond,J. (1999). Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis, and Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* *274*, 23426-23436.
- Lee,J.M., Zipfel,G.J., and Choi,D.W. (1999). The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* *399*, A7-14.
- Lehmann,S. and Harris,D.A. (1996). Mutant and infectious prion proteins display common biochemical properties in cultured cells. *J Biol. Chem.* *271*, 1633-1637.
- 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,Y., Chopp,M., Powers,C., and Jiang,N. (1997). Immunoreactivity of cyclin D1/cdk4 in neurons and oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rat LI1997. *J. Cereb. Blood Flow Metab* *17*, 846-856.
- Liang,J., Luo,G., Ning,X., Shi,Y., Zhai,H., Sun,S., Jin,H., Liu,Z., Zhang,F., Lu,Y., Zhao,Y., Chen,X., Zhang,H., Guo,X., Wu,K., and Fan,D. (2007a). Differential expression of calcium-related genes in gastric cancer cells transfected with cellular prion protein LIANG2007. *Biochem. Cell Biol.* *85*, 375-383.
- Liang,J., Pan,Y., Zhang,D., Guo,C., Shi,Y., Wang,J., Chen,Y., Wang,X., Liu,J., Guo,X., Chen,Z., Qiao,T., and Fan,D. (2007b). Cellular prion protein promotes proliferation and G1/S transition of human gastric cancer cells SGC7901 and AGS

LIANG2007. *FASEB J.* 21, 2247-2256.

Liang,J., Pan,Y.L., Ning,X.X., Sun,L.J., Lan,M., Hong,L., Du,J.P., Liu,N., Liu,C.J., Qiao,T.D., and Fan,D.M. (2006). Overexpression of PrPC and its antiapoptosis function in gastric cancer. *Tumour. Biol.* 27, 84-91.

Lipton,P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 79, 1431-1568.

Liu,X. and Zhu,X.Z. (1999). Roles of p53, c-Myc, Bcl-2, Bax and caspases in serum deprivation-induced neuronal apoptosis: a possible neuroprotective mechanism of basic fibroblast growth factor. *Neuroreport* 10, 3087-3091.

Liu,X.B., Murray,K.D., and Jones,E.G. (2004). Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *J. Neurosci.* 24, 8885-8895.

Liu,Y., Hou,X.Y., Zhang,G.Y., and Xu,T.L. (2003). L-type voltage-gated calcium channel attends regulation of tyrosine phosphorylation of NMDA receptor subunit 2A induced by transient brain ischemia. *Brain Res.* 972, 142-148.

Liu,Y., Zhang,G., Gao,C., and Hou,X. (2001). NMDA receptor activation results in tyrosine phosphorylation of NMDA receptor subunit 2A(NR2A) and interaction of Pyk2 and Src with NR2A after transient cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res.* 909, 51-58.

Lledo,P.M., Tremblay,P., DeArmond,S.J., Prusiner,S.B., and Nicoll,R.A. (1996). Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 2403-2407.

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.

Lopez,G.F., Zahn,R., Riek,R., and Wuthrich,K. (2000). NMR structure of the bovine prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 8334-8339.

Lugaresi,E., Montagna,P., Baruzzi,A., Cortelli,P., Tinuper,P., Zucconi,M., Gambetti,P.L., and Medori,R. (1986). [Familial insomnia with a malignant course: a new thalamic disease]. *Rev. Neurol. (Paris)* 142, 791-792.

Ma,J. and Lindquist,S. (2002). Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP^{Sc}-like conformation in the cytosol. *Science* 298, 1785-1788.

Ma,J. and Zhang,G.Y. (2003). Lithium reduced N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2A tyrosine phosphorylation and its interactions with Src and Fyn mediated by PSD-95 in rat hippocampus following cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* 348, 185-189.

Magalhaes,A.C., Silva,J.A., Lee,K.S., Martins,V.R., Prado,V.F., Ferguson,S.S., Gomez,M.V., Brentani,R.R., and Prado,M.A. (2002). Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J Biol. Chem.* 277, 33311-33318.

- Maglio,L.E., Martins,V.R., Izquierdo,I., and Ramirez,O.A. (2006). Role of cellular prion protein on LTP expression in aged mice. *Brain Res.* 1097, 11-18.
- Maglio,L.E., Perez,M.F., Martins,V.R., Brentani,R.R., and Ramirez,O.A. (2004). Hippocampal synaptic plasticity in mice devoid of cellular prion protein. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 131, 58-64.
- Mallucci,G.R., Ratte,S., Asante,E.A., Linehan,J., Gowland,I., Jefferys,J.G., and Collinge,J. (2002). Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J* 21, 202-210.
- Mange,A., Beranger,F., Peoc'h,K., Onodera,T., Frobert,Y., and Lehmann,S. (2004). Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biol. Cell* 96, 125-132.
- Manson,J., West,J.D., Thomson,V., McBride,P., Kaufman,M.H., and Hope,J. (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* 115, 117-122.
- Manson,J.C., Clarke,A.R., Hooper,M.L., Aitchison,L., McConnell,I., and Hope,J. (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol. Neurobiol* 8, 121-127.
- 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.
- Manuelidis,L., Valley,S., and Manuelidis,E.E. (1985). Specific proteins associated with Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie share antigenic and carbohydrate determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 4263-4267.
- 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.
- Marini,A.M., Jiang,X., Wu,X., Pan,H., Guo,Z., Mattson,M.P., Blondeau,N., Novelli,A., and Lipsky,R.H. (2007). Preconditioning and neurotrophins: a model for brain adaptation to seizures, ischemia and other stressful stimuli. *Amino. Acids* 32, 299-304.
- Masters,C.L., GAJDUSEK,D.C., and Gibbs,C.J., Jr. (1981). Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain* 104, 559-588.
- Mattson,M.P. and Chan,S.L. (2003). Calcium orchestrates apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 5, 1041-1043.
- Mattson,M.P., Culmsee,C., and Yu,Z.F. (2000). Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res.* 301, 173-187.
- McGowan,J.P. (1922). Scrapie in sheep. *Scott. J. Agri.* 365-375.
- 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.

- McKinley, M.P., Taraboulos, A., Kenaga, L., Serban, D., Stieber, A., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., and Gonatas, N. (1991). Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab Invest* 65, 622-630.
- 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.
- McMahon, H.E., Mange, A., Nishida, N., Creminon, C., Casanova, D., and Lehmann, S. (2001). Cleavage of the amino terminus of the prion protein by reactive oxygen species. *J Biol. Chem.* 276, 2286-2291.
- Meyer, R.K., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Braunfeld, M.B., Barry, R.A., and Prusiner, S.B. (1986). Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 2310-2314.
- Milhavet, O. and Lehmann, S. (2002). Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 38, 328-339.
- Mitteregger, G., Vosko, M., Krebs, B., Xiang, W., Kohlmansperger, V., Nolting, S., Hamann, G.F., and Kretschmar, 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., 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.
- Mouillet-Richard, S., Pietri, M., Schneider, B., Vidal, C., Mutel, V., Launay, J.M., and Kellermann, O. (2005). Modulation of serotonergic receptor signaling and cross-talk by prion protein. *J. Biol. Chem.* 280, 4592-4601.
- Mulkey, R.M., Endo, S., Shenolikar, S., and Malenka, R.C. (1994). Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* 369, 486-488.
- Nägerl, U.V. and Bonhoeffer, T. (2006). Morphologische Plastizität in Neuronen und ihre Konkurrenz um synaptische Proteine. *Neurobiologie*.

- Naslavsky,N., Shmeeda,H., Friedlander,G., Yanai,A., Futerman,A.H., Barenholz,Y., and Taraboulos,A. (1999). Sphingolipid depletion increases formation of the scrapie prion protein in neuroblastoma cells infected with prions. *J Biol. Chem.* 274, 20763-20771.
- Naslavsky,N., Stein,R., Yanai,A., Friedlander,G., and Taraboulos,A. (1997). Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J. Biol. Chem.* 272, 6324-6331.
- Nicolas,O., Gavin,R., Braun,N., Urena,J.M., Fontana,X., Soriano,E., Aguzzi,A., and Del Rio,J.A. (2007). Bcl-2 overexpression delays caspase-3 activation and rescues cerebellar degeneration in prion-deficient mice that overexpress amino-terminally truncated prion. *FASEB J.*
- Nieznanski,K., Nieznanska,H., Skowronek,K.J., Osiecka,K.M., and Stepkowski,D. (2005). Direct interaction between prion protein and tubulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 403-411.
- Nieznanski,K., Podlubnaya,Z.A., and Nieznanska,H. (2006). Prion protein inhibits microtubule assembly by inducing tubulin oligomerization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 391-399.
- Nishida,N., Katamine,S., Shigematsu,K., Nakatani,A., Sakamoto,N., Hasegawa,S., Nakaoka,R., Atarashi,R., Kataoka,Y., and Miyamoto,T. (1997). Prion protein is necessary for latent learning and long-term memory retention. *Cell Mol. Neurobiol.* 17, 537-545.
- Nishimura,T., Sakudo,A., Hashiyama,Y., Yachi,A., Saeki,K., Matsumoto,Y., Ogawa,M., Sakaguchi,S., Itohara,S., and Onodera,T. (2007). Serum withdrawal-induced apoptosis in ZrchI prion protein (PrP) gene-deficient neuronal cell line is suppressed by PrP, independent of Doppel. *Microbiol. Immunol.* 51, 457-466.
- 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.
- Nunziante,M., Gilch,S., and Schatzl,H.M. (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.
- Oesch,B., Westaway,D., Walchli,M., McKinley,M.P., Kent,S.B., Aebersold,R., Barry,R.A., Tempst,P., Teplow,D.B., Hood,L.E., and . (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40, 735-746.
- Olney,J.W., Collins,R.C., and Sloviter,R.S. (1986). Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. *Adv. Neurol.* 44, 857-877.
- Olney,J.W., Wozniak,D.F., Jevtovic-Todorovic,V., Farber,N.B., Bittigau,P., and Ikonomidou,C. (2002). Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Brain Pathol.* 12, 488-498.

- Osuga,H., Osuga,S., Wang,F., Fetni,R., Hogan,M.J., Slack,R.S., Hakim,A.M., Ikeda,J.E., and Park,D.S. (2000). Cyclin-dependent kinases as a therapeutic target for stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 10254-10259.
- Ouyang,Y.B., Tan,Y., Comb,M., Liu,C.L., Martone,M.E., Siesjo,B.K., and Hu,B.R. (1999). Survival- and death-promoting events after transient cerebral ischemia: phosphorylation of Akt, release of cytochrome C and Activation of caspase-like proteases. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 19, 1126-1135.
- Paitel,E., Fahraeus,R., and Checler,F. (2003). Cellular prion protein sensitizes neurons to apoptotic stimuli through Mdm2-regulated and p53-dependent caspase 3-like activation. *J. Biol. Chem.* 278, 10061-10066.
- Paitel,E., Sunyach,C., Alves,d.C., Bourdon,J.C., Vincent,B., and Checler,F. (2004). Primary cultured neurons devoid of cellular prion display lower responsiveness to staurosporine through the control of p53 at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J. Biol. Chem.* 279, 612-618.
- Pan,K.M., Baldwin,M., Nguyen,J., Gasset,M., Serban,A., Groth,D., Mehlhorn,I., Huang,Z., Fletterick,R.J., Cohen,F.E., and . (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 10962-10966.
- Pan,Y., Zhao,L., Liang,J., Liu,J., Shi,Y., Liu,N., Zhang,G., Jin,H., Gao,J., Xie,H., Wang,J., Liu,Z., and Fan,D. (2006). Cellular prion protein promotes invasion and metastasis of gastric cancer. *FASEB J.* 20, 1886-1888.
- Pastalkova,E., Serrano,P., Pinkhasova,D., Wallace,E., Fenton,A.A., and Sacktor,T.C. (2006). Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 313, 1141-1144.
- Pattison,I.H. (1965). Resistance of the scrapie agent to formalin. *J. Comp Pathol.* 75, 159-164.
- 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., Jr., 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.
- Plesnila,N. (2004). Role of mitochondrial proteins for neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir. Suppl* 89, 15-19.
- Pohl,D., Bittigau,P., Ishimaru,M.J., Stadthaus,D., Hubner,C., Olney,J.W., Turski,L., and Ikonomidou,C. (1999). N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 2508-2513.
- Premkumar,L.S. and Auerbach,A. (1997). Stoichiometry of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels inferred from single-channel current patterns. *J. Gen. Physiol* 110, 485-502.
- Prusiner,S.B., Bolton,D.C., Groth,D.F., Bowman,K.A., Cochran,S.P., and McKinley,M.P. (1982). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* 21, 6942-6950.

- Prusiner, S.B., Groth, D.F., Bolton, D.C., Kent, S.B., and Hood, L.E. (1984). Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* 38, 127-134.
- Prusiner, S.B., Groth, D.F., Cochran, S.P., Masiarz, F.R., McKinley, M.P., and Martinez, H.M. (1980). Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry* 19, 4883-4891.
- Prusiner, S.B., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Bolton, D.C., Bendheim, P.E., Groth, D.F., and Glenner, G.G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35, 349-358.
- Puckett, C., Concannon, P., Casey, C., and Hood, L. (1991). Genomic structure of the human prion protein gene. *Am. J Hum. Genet.* 49, 320-329.
- Quilty, M.C., King, A.E., Gai, W.P., Pountney, D.L., West, A.K., Vickers, J.C., and Dickson, T.C. (2006). Alpha-synuclein is upregulated in neurones in response to chronic oxidative stress and is associated with neuroprotection. *Exp. Neurol.* 199, 249-256.
- Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., and O'Halloran, T.V. (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284, 805-808.
- Rashidian, J., Iyirhiaro, G., Aleyasin, H., Rios, M., Vincent, I., Callaghan, S., Bland, R.J., Slack, R.S., During, M.J., and Park, D.S. (2005). Multiple cyclin-dependent kinases signals are critical mediators of ischemia/hypoxic neuronal death in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 14080-14085.
- 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.
- Rivero Vaccari, J.C., Casey, G.P., Aleem, S., Park, W.M., and Corriveau, R.A. (2006). NMDA receptors promote survival in somatosensory relay nuclei by inhibiting Bax-dependent developmental cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 16971-16976.
- Rossi, D., Cozzio, A., Flechsig, E., Klein, M.A., Rulicke, T., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (2001). Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *EMBO J* 20, 694-702.
- Roucou, X., Giannopoulos, P.N., Zhang, Y., Jodoin, J., Goodyer, C.G., and LeBlanc, A. (2005). Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death. Differ.* 12, 783-795.
- 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.

- 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.
- Saeki,K., Matsumoto,Y., Hirota,Y., Matsumoto,Y., and Onodera,T. (1996). Three-exon structure of the gene encoding the rat prion protein and its expression in tissues. *Virus Genes* *12*, 15-20.
- Safar,J., Wang,W., Padgett,M.P., Ceroni,M., Piccardo,P., Zopf,D., Gajdusek,D.C., and Gibbs,C.J., Jr. (1990). Molecular mass, biochemical composition, and physicochemical behavior of the infectious form of the scrapie precursor protein monomer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *87*, 6373-6377.
- Saikumar,P., Dong,Z., Weinberg,J.M., and Venkatachalam,M.A. (1998). Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* *17*, 3341-3349.
- Saikumar,P. and Venkatachalam,M.A. (2003). Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. *Semin. Nephrol.* *23*, 511-521.
- Sakaguchi,S., Katamine,S., Nishida,N., Moriuchi,R., Shigematsu,K., Sugimoto,T., Nakatani,A., Kataoka,Y., Houtani,T., Shirabe,S., Okada,H., Hasegawa,S., Miyamoto,T., and Noda,T. (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* *380*, 528-531.
- Sakudo,A., Lee,D.C., Nishimura,T., Li,S., Tsuji,S., Nakamura,T., Matsumoto,Y., Saeki,K., Itohara,S., Ikuta,K., and Onodera,T. (2005). Octapeptide repeat region and N-terminal half of hydrophobic region of prion protein (PrP) mediate PrP-dependent activation of superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *326*, 600-606.
- Sakudo,A., Lee,D.C., Saeki,K., Matsumoto,Y., Itohara,S., and Onodera,T. (2003a). Tumor necrosis factor attenuates prion protein-deficient neuronal cell death by increases in anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *310*, 725-729.
- Sakudo,A., Lee,D.C., Saeki,K., Nakamura,Y., Inoue,K., Matsumoto,Y., Itohara,S., and Onodera,T. (2003b). Impairment of superoxide dismutase activation by N-terminally truncated prion protein (PrP) in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *308*, 660-667.
- Sakurai-Yamashita,Y., Sakaguchi,S., Yoshikawa,D., Okimura,N., Masuda,Y., Katamine,S., and Niwa,M. (2005). Female-specific neuroprotection against transient brain ischemia observed in mice devoid of prion protein is abolished by ectopic expression of prion protein-like protein. *Neuroscience* *136*, 281-287.
- Sanguinetti,A.R., Cao,H., and Corley,M.C. (2003). Fyn is required for oxidative- and hyperosmotic-stress-induced tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *Biochem. J.* *376*, 159-168.
- Sanguinetti,A.R. and Mastick,C.C. (2003). c-Abl is required for oxidative stress-induced phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14. *Cell Signal.* *15*, 289-298.
- Santuccione,A., Sytnyk,V., Leshchyn'ska,I., and Schachner,M. (2005). Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* *169*, 341-354.

- Schatzl,H.M., Da Costa,M., Taylor,L., Cohen,F.E., and Prusiner,S.B. (1995). Prion protein gene variation among primates. *J Mol. Biol.* *245*, 362-374.
- Schmitt-Ulms,G., Legname,G., Baldwin,M.A., Ball,H.L., Bradon,N., Bosque,P.J., Crossin,K.L., Edelman,G.M., DeArmond,S.J., Cohen,F.E., and Prusiner,S.B. (2001). Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J. Mol. Biol.* *314*, 1209-1225.
- Schneider,B., Mutel,V., Pietri,M., Ermonval,M., Mouillet-Richard,S., and Kellermann,O. (2003). NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 13326-13331.
- Semenov,D.G., Samoilov,M.O., and Lazarewicz,J.W. (2002). Calcium transients in the model of rapidly induced anoxic tolerance in rat cortical slices: involvement of NMDA receptors. *Neurosignals*. *11*, 329-335.
- Shamloo,M., Soriano,L., Wieloch,T., Nikolich,K., Urfer,R., and Oksenberg,D. (2005). Death-associated protein kinase is activated by dephosphorylation in response to cerebral ischemia. *J. Biol. Chem.* *280*, 42290-42299.
- Shmerling,D., Hegyi,I., Fischer,M., Blattler,T., Brandner,S., Gotz,J., Rulicke,T., Flechsig,E., Cozzio,A., von Mering,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.
- 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., 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.
- Sigurdsson,B. (1954). Rida, a chronic encephalitis of sheep with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. *Br. Vet. J.* 341-354.
- Simonc,T., Duga,S., Strumbo,B., Asselta,R., Ceciliani,F., and Ronchi,S. (2000). cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Lett.* *469*, 33-38.
- Simons,K. and Ehehalt,R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest* *110*, 597-603.
- Simons,K. and Toomre,D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 31-39.
- Slikker,W., Xu,Z., and Wang,C. (2005). Application of a systems biology approach to developmental neurotoxicology. *Reprod. Toxicol.* *19*, 305-319.
- Smith,C. and Collinge,J. (1995). Molecular pathology of prion diseases. *Essays Biochem.* *29*, 157-174.

- Solfrosi, L., Criado, J.R., McGavern, D.B., Wirz, S., Sanchez-Alavez, M., Sugama, S., DeGiorgio, L.A., Volpe, B.T., Wiseman, E., Abalos, G., Masliah, 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.
- Soriano, F.X., Papadia, S., Hofmann, F., Hardingham, N.R., Bading, H., and Hardingham, G.E. (2006). Preconditioning doses of NMDA promote neuroprotection by enhancing neuronal excitability. *J. Neurosci.* 26, 4509-4518.
- Sparkes, R.S., Simon, M., Cohn, V.H., Fournier, R.E., Lem, J., Klisak, I., Heinzmann, C., Blatt, C., Lucero, M., Mohandas, T., and . (1986). Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 7358-7362.
- Spielhauer, C. and Schatzl, 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., Burlingame, A.L., and Prusiner, S.B. (1990). Identification of glycoinositol phospholipid linked and truncated forms of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 29, 8879-8884.
- Stahl, N., Baldwin, M.A., Hecker, R., Pan, K.M., Burlingame, A.L., and Prusiner, S.B. (1992). Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry* 31, 5043-5053.
- 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.
- Stamp, J.T. (1962). Scrapie: a transmissible disease of sheep. *Vet. Rec* 357-362.
- Steele, A.D. (2008). All quiet on the neuronal front: NMDA receptor inhibition by prion protein. *J. Cell Biol.* 181, 407-409.
- Steele, A.D., Emsley, J.G., Ozdinler, P.H., Lindquist, S., and Macklis, J.D. (2006). Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 3416-3421.
- Stephenson, F.A. (2006). Structure and trafficking of NMDA and GABAA receptors STEPHENSON2006. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 877-881.
- Stewart, R.S. and Harris, D.A. (2001). Most pathogenic mutations do not alter the membrane topology of the prion protein. *J. Biol. Chem.* 276, 2212-2220.
- Stewart, R.S. and Harris, D.A. (2003). Mutational analysis of topological determinants in prion protein (PrP) and measurement of transmembrane and cytosolic PrP during prion infection. *J. Biol. Chem.* 278, 45960-45968.
- Stimson, E., Hope, J., Chong, A., and Burlingame, A.L. (1999). Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid

chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry* 38, 4885-4895.

Strasser,R.H., Braun-Dullaeus,R., Walendzik,H., and Marquetant,R. (1992). Alpha 1-receptor-independent activation of protein kinase C in acute myocardial ischemia. Mechanisms for sensitization of the adenylyl cyclase system. *Circ. Res.* 70, 1304-1312.

Strumbo,B., Ronchi,S., Bolis,L.C., and Simonic,T. (2001). Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett.* 508, 170-174.

Stuermer,C.A., Langhorst,M.F., Wiechers,M.F., Legler,D.F., Von Hanwehr,S.H., Guse,A.H., and Plattner,H. (2004). PrPc capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction. *FASEB J.* 18, 1731-1733.

Stuermer,C.A. and Plattner,H. (2005). The 'lipid raft' microdomain proteins reggie-1 and reggie-2 (flotillins) are scaffolds for protein interaction and signalling. *Biochem. Soc. Symp.* 109-118.

Sucher,N.J., Awobuluyi,M., Choi,Y.B., and Lipton,S.A. (1996). NMDA receptors: from genes to channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 348-355.

Sugino,T., Nozaki,K., Takagi,Y., Hattori,I., Hashimoto,N., Moriguchi,T., and Nishida,E. (2000). Activation of mitogen-activated protein kinases after transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. *J. Neurosci.* 20, 4506-4514.

Sunyach,C., Cisse,M.A., da Costa,C.A., Vincent,B., and Checler,F. (2007). The C-terminal products of cellular prion protein processing, C1 and C2, exert distinct influence on p53-dependent staurosporine-induced caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.* 282, 1956-1963.

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,T., Kurokawa,T., Hashimoto,H., and Sugiyama,M. (2002). cDNA sequence and tissue expression of *Fugu rubripes* prion protein-like: a candidate for the teleost orthologue of tetrapod PrPs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 912-917.

Takagi,N., Cheung,H.H., Bissoon,N., Teves,L., Wallace,M.C., and Gurd,J.W. (1999). The effect of transient global ischemia on the interaction of Src and Fyn with the N-methyl-D-aspartate receptor and postsynaptic densities: possible involvement of Src homology 2 domains. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 19, 880-888.

Takahashi,H., Komatsu,N., Ibe,M., Ishida-Yamamoto,A., Hashimoto,Y., and Iizuka,H. (2007). Cystatin A suppresses ultraviolet B-induced apoptosis of keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 46, 179-187.

Taraboulos,A., Scott,M., Semenov,A., Avrahami,D., Laszlo,L., Prusiner,S.B., and Avraham,D. (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.

Taylor,D.R. and Hooper,N.M. (2006). The prion protein and lipid rafts. *Mol. Membr. Biol.* 23, 89-99.

- 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.
- Tichopad,A., Pfaffl,M.W., and Didier,A. (2003). Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: quantification using real-time RT-PCR. *Mol. Cell Probes* *17*, 5-10.
- Tobler,I., Deboer,T., and Fischer,M. (1997). Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *J Neurosci.* *17*, 1869-1879.
- Tobler,I., Gaus,S.E., Deboer,T., Achermann,P., Fischer,M., Rulicke,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.
- Toni,M., Spisni,E., Griffoni,C., Santi,S., Riccio,M., Lenaz,P., and Tomasi,V. (2006). Cellular prion protein and caveolin-1 interaction in a neuronal cell line precedes fyn/erk 1/2 signal transduction. *J. Biomed. Biotechnol.* *2006*, 69469.
- Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1989). Immunoblotting in the clinical laboratory. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* *27*, 495-501.
- Tsui-Pierchala,B.A., Encinas,M., Milbrandt,J., and Johnson,E.M., Jr. (2002). Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci.* *25*, 412-417.
- Turk,E., Teplow,D.B., Hood,L.E., and Prusiner,S.B. (1988). Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur. J. Biochem.* *176*, 21-30.
- Turner,C.P., Pulciani,D., and Rivkees,S.A. (2002). Reduction in intracellular calcium levels induces injury in developing neurons. *Exp. Neurol.* *178*, 21-32.
- van Delft,M.F. and Huang,D.C. (2006). How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res.* *16*, 203-213.
- Vassallo,N. and Herms,J. (2003). Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J. Neurochem.* *86*, 538-544.
- 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.
- Vey,M., Pilkuhn,S., Wille,H., Nixon,R., DeArmond,S.J., Smart,E.J., Anderson,R.G., Taraboulos,A., and Prusiner,S.B. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 14945-14949.
- 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.
- Vincent,B., Paitel,E., Frobert,Y., Lehmann,S., Grassi,J., and Checler,F. (2000). Phorbol ester-regulated cleavage of normal prion protein in HEK293 human cells and murine neurons. *J Biol. Chem.* *275*, 35612-35616.

Vosko, M.R., Burggraf, D., Liebetrau, M., Wunderlich, N., Jager, G., Groger, M., Plesnila, N., and Hamann, G.F. (2006). Influence of the duration of ischemia and reperfusion on infarct volume and microvascular damage in mice. *Neurol. Res.* 28, 200-205.

Waggoner, D.J., Drisaldi, B., Bartnikas, T.B., Casareno, R.L., Prohaska, J.R., Gitlin, J.D., 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.

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.

Walz, R., Castro, R.M., Velasco, T.R., Carlotti, C.G., Jr., Sakamoto, A.C., Brentani, R.R., and Martins, V.R. (2002). Cellular prion protein: implications in seizures and epilepsy. *Cell Mol. Neurobiol.* 22, 249-257.

Wang, C., Fridley, J., and Johnson, K.M. (2005). The role of NMDA receptor upregulation in phencyclidine-induced cortical apoptosis in organotypic culture. *Biochem. Pharmacol.* 69, 1373-1383.

Wang, C., Kaufmann, J.A., Sanchez-Ross, M.G., and Johnson, K.M. (2000). Mechanisms of N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in phencyclidine-treated cultured forebrain neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 287-295.

Wang, F., Corbett, D., Osuga, H., Osuga, S., Ikeda, J.E., Slack, R.S., Hogan, M.J., Hakim, A.M., and Park, D.S. (2002). Inhibition of cyclin-dependent kinases improves CA1 neuronal survival and behavioral performance after global ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 22, 171-182.

Wang, R.M., Yang, F., and Zhang, Y.X. (2006). Preconditioning-induced activation of ERK5 is dependent on moderate Ca²⁺ influx via NMDA receptors and contributes to ischemic tolerance in the hippocampal CA1 region of rats. *Life Sci.* 79, 1839-1846.

Watt, N.T. and Hooper, N.M. (2005). Reactive oxygen species (ROS)-mediated beta-cleavage of the prion protein in the mechanism of the cellular response to oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1123-1125.

Watt, N.T., Taylor, D.R., Gillott, A., Thomas, D.A., Perera, W.S., and Hooper, N.M. (2005). Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 280, 35914-35921.

Weise, J., Crome, O., Sandau, R., Schulz-Schaeffer, W., Bahr, M., and Zerr, I. (2004). Upregulation of cellular prion protein (PrP^c) 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.

Weissmann, C. and Flechsig, E. (2003). PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Br. Med. Bull.* 66, 43-60.

- Wells,G.A., 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(C)): Its physiological function and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta*.
- White,A.R., Collins,S.J., Maher,F., Jobling,M.F., Stewart,L.R., Thyer,J.M., Beyreuther,K., Masters,C.L., and Cappai,R. (1999). Prion protein-deficient neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen peroxide toxicity. *Am. J Pathol.* *155*, 1723-1730.
- Whitlock,J.R., Heynen,A.J., Shuler,M.G., and Bear,M.F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* *313*, 1093-1097.
- Wilesmith,J.W., Ryan,J.B., and Atkinson,M.J. (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec* *128*, 199-203.
- Will,R.G., Ironside,J.W., Zeidler,M., Cousens,S.N., Estibeiro,K., Alperovitch,A., Poser,S., Pocchiari,M., Hofman,A., and Smith,P.G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 921-925.
- Williams,E.S. and Young,S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.* *16*, 89-98.
- Windl,O., Dempster,M., Estibeiro,P., and Lathe,R. (1995). A candidate marsupial PrP gene reveals two domains conserved in mammalian PrP proteins. *Gene* *159*, 181-186.
- Witt,S.N. and Flower,T.R. (2006). alpha-Synuclein, oxidative stress and apoptosis from the perspective of a yeast model of Parkinson's disease. *FEMS Yeast Res.* *6*, 1107-1116.
- Won,S.J., Kim,D.Y., and Gwag,B.J. (2002). Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J. Biochem. Mol. Biol.* *35*, 67-86.
- Wong,B.S., Liu,T., Li,R., Pan,T., Petersen,R.B., Smith,M.A., Gambetti,P., Perry,G., Manson,J.C., Brown,D.R., and Sy,M.S. (2001). Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. *J. Neurochem.* *76*, 565-572.
- Wopfner,F., Weidenhofer,G., Schneider,R., von Brunn,A., Gilch,S., Schwarz,T.F., Werner,T., and Schatzl,H.M. (1999). Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J. Mol. Biol.* *289*, 1163-1178.
- Wyatt,J.M., Pearson,G.R., Smerdon,T.N., Gruffydd-Jones,T.J., Wells,G.A., and Wilesmith,J.W. (1991). Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Vet. Rec.* *129*, 233-236.
- Xu,F., Plummer,M.R., Len,G.W., Nakazawa,T., Yamamoto,T., Black,I.B., and Wu,K. (2006). Brain-derived neurotrophic factor rapidly increases NMDA receptor channel activity through Fyn-mediated phosphorylation. *Brain Res.* *1121*, 22-34.

Yamaguchi,H. and Wang,H.G. (2002). Bcl-XL protects BimEL-induced Bax conformational change and cytochrome C release independent of interacting with Bax or BimEL. *J. Biol. Chem.* 277, 41604-41612.

Ying,Y.S., Anderson,R.G., and Rothberg,K.G. (1992). Each caveola contains multiple glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 57, 593-604.

Yoon,D.K., Hwang,I.K., Yoo,K.Y., Lee,Y.B., Lee,J.J., Kim,J.H., Kang,T.C., Lee,B.H., Sohn,H.S., and Won,M.H. (2006). Comparison of alpha-synuclein immunoreactivity and protein levels in ischemic hippocampal CA1 region between adult and aged gerbils and correlation with Cu,Zn-superoxide dismutase. *Neurosci. Res.* 55, 434-441.

Yoon,W.J., Won,S.J., Ryu,B.R., and Gwag,B.J. (2003). Blockade of ionotropic glutamate receptors produces neuronal apoptosis through the Bax-cytochrome C-caspase pathway: the causative role of Ca²⁺ deficiency. *J. Neurochem.* 85, 525-533.

Yuan,J. and Yankner,B.A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407, 802-809.

Zacharias,D.A., Violin,J.D., Newton,A.C., and Tsien,R.Y. (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 296, 913-916.

Zahn,R., Liu,A., Luhrs,T., Riek,R., von Schroetter,C., Lopez,G.F., Billeter,M., Calzolari,L., Wider,G., and Wuthrich,K. (2000). NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 145-150.

Zanata,S.M., Lopes,M.H., Mercadante,A.F., Hajj,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.

Zhang,C.C., Steele,A.D., Lindquist,S., and Lodish,H.F. (2006a). Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 2184-2189.

Zhang,Y., Qin,K., Wang,J., Hung,T., and Zhao,R.Y. (2006b). Dividing roles of prion protein in staurosporine-mediated apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 759-768.

Zhao,J., Mao,Y., and Qi,J. (2006). Expression of cytoskeleton and apoptosis related genes after cerebral infarction. *Neurol. Res.* 28, 71-75.

G. Anhang

1. Verwendete Materialien und Lösungen

1.1. Histologie: Lösungen

PBS pH 7,3	<p><u>Stammlösung:</u> 12,7 g Na₂ HPO₄ 3,9 g Na H₂PO₄ 85,0 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest. gelöst</p> <p><u>Gebrauchslösung:</u> Stammlösung 1 : 10 in Aqua dest.verdünnt und auf pH 7,3 eingestellt</p>
4 %ige Paraformaldehydlösung	<p>30 % Glycerol 10 % Succrose 4 % PFA in PBS pH 7,3</p>
Cresylviolett	<p><u>Stammlösung:</u> 10 g Cresylviolett 20 ml Ethanol 100 %, lösen und 30 Minuten stehen lassen, auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen. Dann vorsichtig aufkochen.</p> <p><u>Gebrauchslösung:</u> 50 ml Stammlösung ad 200 ml Aqua dest.</p>
Hämatoxylin	<p>Saures Hämalaun nach P. Mayer § 648 Romeis: 1g Hämatoxylin in 100 ml Aqua dest. lösen, 0,2 g Natriumiodat 50 g Kalialaun (Aluminiumkaliumsulfat) 50 g Chloralhydrat 1 g Citronensäure</p>

1.2. Protein-Microarrays

1.2.1. Lösungen

Protease Inhibitor Cocktail (gelagert bei -20 °C)	0,3 ml Aqua bidest. zu Protease Inhibitor Cocktail-Gefäß
Benzonase-Stocklösung (5 U /µl) (frisch angesetzt, auf Eis gelagert)	2 µl Benzonase™, ultrapure (50 U/µl) 18 µl Extraction/Labeling Buffer

Buffer A zur Lysierung der Hirne und Proteinextraktion (Extraction/Labeling Buffer plus Protease Inhibitoren) (frisch angesetzt, auf Eis gelagert)	10 ml Extraction/Labeling Buffer 50 µl Protease Inhibitor Cocktail 100 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail I 100 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail II 1,2 µl Benzonase-Stocklösung (0,6 U/ml in Buffer A)
--	---

1.2.2. Antikörperposition auf dem Microarray

Apoptosis Inducing Factor (AIF)	ARTS	Caspase 4	Caspase 4	Procaspase 8	Caspase 9	Cystatin A	DAXX
Bcl-x	Bcl-X _L	Caspase 5	Caspase 6	Caspase 10	Caspase 10	DAPK	DAPK phospho (pS308)
Caspase 3	Bcl-10	Caspase 7	Caspase 8	Caspase11	Caspase 12	GADD 153 (CHOP-10)	PAR4 (Prostate Apoptosis Response 4)
Caspase 3 Aktiviert	Cy3+Cy5/BSA	Caspase 8	Cy3+Cy5/BSA	Cathepsin D	Cy3+Cy5/BSA	Phosphatidylserin Rezeptor (PSR)	Cy3+Cy5/BSA
SMAC/DIABLO	c-Abl	Cdk6	Cdk-7/CAK	Cyclin A	Cyclin A	p14 ^{arf}	p16 ^{INK4a/CDKN2}
Cdc25	Cdc27	Chk1	Chk2	Cyclin B1	Cyclin D1	p19 ^{INK4d}	p21 ^{Waf-1}
CDC6	Cdh1	c-myc	c-Myc	Cyclin D2	Cyclin D3	p34 ^{cdc2}	p35
Cdk4	Cy3+Cy5/BSA	E2F1	Cy3+Cy5/BSA	MDM2	Cy3+Cy5/BSA	p53	Cy3+Cy5/BSA
p57 ^{kip2}	p63	HAT1 (Histon acetyltransferase)	HDAC 1 (Histon Deacetylase 1)	Phospho Histon H3 (pS10)	Phospho Histon H3 (pS28)	Trf-1	Aop-1
Retinoblastomphospho (pS795)	SMAD4	HDAC 2 (Histon Deacetylase 2)	HDAC 4 (Histon Deacetylase 4)	Acetyl phospho Histon H3	Acetyl Histon H3 (Ac-Lys9)	HSP 70	HSP 90
Ap-1/cjun	ATF2	SUV39H1 Histon Methyl Transferase	PCAF	RAN	NTF2	Nedd 8	Calcineurin;
CUG-BP1	Cy3+Cy5/BSA	hnRNP M3-M4	Cy3+Cy5/BSA	Topoisomerase -1	Cy/BSA	Calmodulin	Cy3+Cy5/BSA
Calnexin	Calponin	Adaptin β1+β2	β COP	Connexin 32	Connexin 32	Cytokeratin pep.7	Cytokeratin pep.8.13
Calreticulin	Aktin	α Catenin	β Catenin	Connexin 43	Cytokeratin 8.12	Cytokeratin pep13	Cytokeratin pep18
Aktin	β Aktin	Plakoglobin	Caveolin-1	Cytokeratin pep 8.60	Cytokeratin pep.19	Pan Cytokeratin	Desmin
Actopaxin	Cy3+Cy5/BSA	Clathrin Light Chain	Cy3+Cy5/BSA	Cytokeratin pep.4	Cy3+Cy5/BSA	Dystrophin	Cy3+Cy5/Cy3+Cy5
Ezrin	Fibronectin	Myosin IIA	Myosin Va (LE-16)	α Tubulin	β Tubulin I	i-NOS	i-NOS
Internexin α	MAP1	Pan Cadherin	Spectrin (alpha+beta)	β Tubulin III	β Tubulin IV	b-NOS	b-NOS

MAP1b	MAP2 (2a+2b)	Tropomyosin	Vinculin	β Tubulin polyglutamylated	γ Tubulin	e-NOS	e-NOS
OP18/Stathmin	Cy3+Cy5/BSA	Chondroitin Sulfat	Cy3+Cy5/BSA	α 1 Syntrophin	Cy3+Cy5/BSA	e-NOS	Cy3+Cy5/BSA
Amyloid Precursor Protein (APP)	Amyloid Precursor Protein (APP) C-terminal	Glutaminsäuredecarboxylase (GAD65/67)	Glutaminsynthetase	S-100 b	S-100	Synuclein β	Tyrosinhydroxylase
CNPase	Cofilin	Nerve Growth Factor Receptor	Nerve Growth Factor Receptor	Neurofilament 200	Neurofilament 200	Tau Phospho (pS199/202)	p120CTN
DOPA Decarboxylase	Dystrophin	KIF3A	Nicastrin	Synaptotagmin	Syntaxin	Tryptophan Hydroxylase	ARNO (Cytohesin 2)
Glutamat rezeptor NMDAR 2a	Cy3+Cy5/BSA	SNAP-25	Cy3+Cy5/BSA	Synuclein- α	Cy3+Cy5/BSA	GAP1	Cy3+Cy5/BSA
GRP1(ARNO3 Cytohesin-3)	CRK-L	FAK (focal adhesion kinase)	FAK Phospho (pS772)	NAK	NF-kB	MAP-Kinase (Erk1+Erk2)	MAP-Kinase (ERK-1)
CAM Kinase IIa	CAM Kinase IV (AY-18)	FAK Phospho (pS910)	FAK Phospho (pY577)	JNK	JNK aktiviert (diphosphorylierte JNK)	MAP-Kinase aktiviert diphospho	MAP-Kinase aktiviert phosphothreonin
EGF rezeptor	Östrogenrezeptor (ER)	FAK phospho (pY397)	GRB-2	p38 MAPK	p38 MAPK aktiviert (diphosphoryliert p38)	MAP-Kinase aktiviert phosphotyrosin	MAPK nicht phosphoryliert ERK
ERK5 (BIG MAPK-BMK1)	Cy3+Cy5/BSA	I κ B α	Cy3+Cy5/BSA	Mcl-1	Cy3+Cy5/BSA	MAP-Kinase aktiviert protein kinase-2 (MAKAPK 2)	Cy3+Cy5/BSA
CDC7 Kinase	PAK phospho (pS212)	PKB /AKT	PKB/AKT	PKC γ	PKD	Pyk2	Pyk2 Phospho (pY579)
Phospholipase A2 group V	Phospholipase C γ 1	PKB phosphoserin 473 (pS473)	PKB phosphothreonin (pT308)	Map-Kinase Phosphatase-1 (MKP-1)	Protein phosphatase 1 α	Pyk2 Phospho (pY579/580)	Pyk2 Phospho (pY580)
Phosphoserin	Phosphotyrosin	PKC α	PKC β	PTEN	PTEN	Pyk2 Phospho (pY881)	Raf
Phosphothreonin	Cy3+Cy5/BSA	PKC γ	Cy3+Cy5/BSA	SGK (serum and glucocorticoid inducible kinase)	Cy3+Cy5/BSA	Raf Phospho (pS621)	Cy3+Cy5/Cy3+Cy5

1.3. Westernblot

1.3.1. Lösungen

5 x SDS-Laufpuffer	0,125 M Tris Base 0,96 M Glycin 0,5 % SDS
Alkalische-Phosphatase-Puffer	1 M Tris, pH 9,5 1 M NaCl 0,5 M MgCl ₂
Blockungspuffer	0,05 g Casein (I-Block™) 0,5 % Tween20 in PBS pH 7,4
Blotting-Puffer	25 mM Tris, pH 8,3 20 % Methanol 192 mM Glycin
Lämmli-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 6,8 2 % SDS 10 % β-Mercaptoethanol 10 % Glycerin 0,1 % Bromophenolblau
Lysierungs-Puffer	60 mM Tris-HCl, pH 7,2 2 % SDS 0,05 M DTT 10 % Glycerin 1 mM EDTA
NBT / BCIP-Färbelösung (0,1 %ig in DMF verdünnt)	25 mg NBT 25 mg BCIP ad 1000 µl DMF
PBS (pH 7,4)	<u>Stammlösung:</u> 12,7 g Na ₂ HPO ₄ 3,9 g Na H ₂ PO ₄ 85,0 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest. gelöst <u>Gebrauchslösung:</u> Stammlösung 1 : 10 in Aqua dest. verdünnt und auf pH 7,4 eingestellt
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

1.3.2. Trenn- und Sammelgel: Zusammensetzung

Sammelgel 5 %	30 % Acrylamid-Lösung 1,6 ml Sammelgelpuffer 2,5 ml
---------------	--

	10 % SDS-Lösung	100 µl
	TEMED	7 µl
	10 % APS	100 µl
	Aqua dest.	5,7 ml
Trenngel 12 %	30 % Acrylamid-Lösung	8 ml
	Trenngelpuffer	5 ml
	10 % SDS-Lösung	200 µl
	TEMED	6,7 µl
	10 % APS	100 µl
	Aqua dest.	6,7 ml

2. Schneideprotokoll Maushirn für histologische Untersuchungen

Schneideprotokoll Maushirn

Projekt / Tiernummer : ZNP / 19

Neuro-Nr. : _____

von : _____

geschnitten am
: _____

Einblutungen in Infarktregion ja nein Fotos

Code: Typ OT/Stufe Index

Anzahl der Schnitte	Verworfen	OT-Nummer Schnitte	Verwendung	Bemerkung
	50x10µm		verworfen	
1		Vol 1/1 A 1x10µm		
1		Vol 1/1 B 1x10µm		
	480µm		verworfen	
1		Vol 1/2 A 1x10µm		
1		Vol 1/2 B 1x10µm		
1		E 1/2 A 1x10µm		
1		E 1/2 B 1x10µm		
1		E 1/2 C 1x10µm		
1		E 1/2 D 1x10µm		
	440µm		verworfen	
1		Vol 1/3 A 1x10µm		
1		Vol 1/3 B 1x10µm		
1		E 1/3 A 1x10µm		
1		E 1/3 B 1x10µm		
1		E 1/3 C 1x10µm		
1		E 1/3 D 1x10µm		

	440µm		verworfen		2000
1		Vol 1/4 A 1x10µm			
1		Vol 1/4 B 1x10µm			
1		E 1/4 A 1x10µm			
1		E 1/4 B 1x10µm			
1		E 1/4 C 1x10µm			
1		E 1/4 D 1x10µm			
4		N 1/4 A 4x10µm			
4		N 1/4 B 4x10µm			
4		WB 1/4 4x20µm			
4		WB 2/4 4x20µm			
	200µm		verworfen		2500
1		Vol 2/5 A 1x10µm			
1		Vol 2/5 B 1x10µm			
1		E 1/5 A 1x10µm	Histologische Untersuchungen		
1		E 1/5 B 1x10µm	Histologische Untersuchungen		
1		E 1/5 C 1x10µm	Histologische Untersuchungen		
1		E 1/5 D 1x10µm	Histologische Untersuchungen		
4		N 2/5 A 4x10µm			
4		N 2/5 B 4x10µm			
4		WB 1/5 4x20µm			
4		WB 2/5 4x20µm			
	200µm		verworfen		3000

Tiernummer : _____

Seite 2

Anzahl der Schnitte	Verworfen	OT-Nummer Schnitte	Verwendung	Bemerkung
1		Vol 2/6 A 1x10µm	Volumetrie	
1		Vol 2/6 B 1x10µm	Volumetrie	
1		E 2/6 A 1x10µm		
1		E 2/6 B 1x10µm		
1		E 2/6 C 1x10µm		
1		E 2/6 D 1x10µm		
1		N 3/6 A 1x10µm		
1		N 3/6 B 1x10µm		
	10µm		verworfen	
1		RNA 1 1x20µm		
1		RNA 2 1x20µm		
1		RNA 3 1x20µm		
1		RNA 4 1x20µm		
1		RNA 5 1x20µm		
1		RNA 6 1x20µm		
1		RNA 7 1x20µm		
1		RNA 8 1x20µm		
1		RNA 9 1x20µm		
1		RNA 10 1x20µm		

1		RNA 11	1x20µm		
1		RNA 12	1x20µm		
1		RNA 13	1x20µm		
1		RNA 14	1x20µm		
1		RNA 15	1x20µm		
1		RNA 16	1x20µm		
1		RNA 17	1x20µm		
1		RNA 18	1x20µm		
1		RNA 19	1x20µm		
1		RNA 20	1x20µm		
	10µm			verworfen	3500
1		Vol 2/7 A	1x10µm	Volumetrie	
1		Vol 2/7 B	1x10µm	Volumetrie	
1		E 2/7 A	1x10µm		
1		E 2/7 B	1x10µm		
1		E 2/7 C	1x10µm		
1		E 2/7 D	1x10µm		
4		N 4/7 A	4x10µm		
4		N 4/7 B	4x10µm		
4		N 4/7 C	4x10µm		
4		N 4/7 D	4x10µm		
4		WB 1/7	4x20µm		
4		WB 2/7	4x20µm		
	120µm			verworfen	4000
1		Vol 2/8 A	1x10µm	Volumetrie	
1		Vol 2/8 B	1x10µm	Volumetrie	
1		E 2/8 A	1x10µm	Histologische Untersuchungen	
1		E 2/8 B	1x10µm	Histologische Untersuchungen	
1		E 2/8 C	1x10µm	Histologische Untersuchungen	
1		E 2/8 D	1x10µm	Histologische Untersuchungen	

Tiernummer : _____

Seite 3

Anzahl der Schnitte	Verworfen	OT-Nummer	Schnitte	Verwendung	Bemerkung
4		N 5/8 A	4x10µm		
4		N 5/8 B	4x10µm		
4		N 5/8 C	4x10µm		
4		N 5/8 D	4x10µm		
4		WB 1/8	4x20µm		
4		WB 2/8	4x20µm		
	120µm			verworfen	4500
1		Vol 3/9 A	1x10µm	Volumetrie	
1		Vol 3/9 B	1x10µm	Volumetrie	
1		E 2/9 A	1x10µm		
1		E 2/9 B	1x10µm		
1		E 2/9 C	1x10µm		
1		E 2/9 D	1x10µm		
4		N 6/9 A	4x10µm		

4		N 6/9 B 4x10µm		
4		N 6/9 C 4x10µm		
4		N 6/9 D 4x10µm		
	280µm		verworfen	5000
1		Vol 3/10 A 1x10µm	Volumetrie	
1		Vol 3/10 B 1x10µm	Volumetrie	
1		E 3/10 A 1x10µm		
1		E 3/10 B 1x10µm		
1		E 3/10 C 1x10µm		
1		E 3/10 D 1x10µm		
	440µm		verworfen	5500
1		Vol 3/11 A 1x10µm	Volumetrie	
1		Vol 3/11 B 1x10µm	Volumetrie	
1		E 3/11 A 1x10µm		
1		E 3/11 B 1x10µm		
1		E 3/11 C 1x10µm		
1		E 3/11 D 1x10µm		
	440µm		verworfen	6000
1		Vol 3/12 A 1x10µm	Volumetrie	
1		Vol 3/12 B 1x10µm	Volumetrie	
1		E 3/12 A 1x10µm		
1		E 3/12 B 1x10µm		
1		E 3/12 C 1x10µm		
1		E 3/12 D 1x10µm		
	440µm		verworfen	6500
1		Vol 4/13 A 1x10µm	Volumetrie	
1		Vol 4/13 B 1x10µm	Volumetrie	
1		E 3/13 A 1x10µm		
1		E 3/13 B 1x10µm		
1		E 3/13 C 1x10µm		
1		E 3/13 D 1x10µm		
	440µm		verworfen	7000
1		Vol 4/14 A 1x10µm	Volumetrie	
1		Vol 4/14 B 1x10µm	Volumetrie	

3. Vollständig normierte Werte aller im Microarray untersuchten Proteine

Im Folgenden sind die normierten Einzelwerte auf die Referenzprobe bezogen dargestellt (abzüglich Hintergrund). Jede Tabelle stellt den Microarray einer Maus dar. Die Felder entsprechen der Anordnung auf dem Array. Bei kleinen Intensitäten schwach exprimierter Proteine kann es zu starken Schwankungen kommen. Ist aufgrund zu geringer Intensität eines Dots keine sinnvolle Aussage möglich (< 1 % der mittleren Färbeintensität), ist dies durch ##### gekennzeichnet.

3.1. Prnp^{+/+}-Shammäuse

2,61	4,68	#####	2,94	1,08	1,58	1,22	1,19	0,95	1,26	0,97	0,97	0,99	1,04	1,30	1,26
2,05	1,57	1,90	1,48	1,19	1,24	1,18	1,44	1,28	0,94	0,75	1,07	1,11	0,92	1,11	1,54
1,51	1,45	1,43	4,30	1,00	1,11	1,17	1,30	1,20	1,19	1,16	1,05	1,14	0,91	1,26	1,45
1,47	2,33	1,14	1,25	1,13	1,20	1,20	1,26	1,23	1,45	0,99	0,88	0,82	1,05	1,34	1,45
1,37	1,69	2,17	1,01	1,02	1,10	0,95	1,29	1,13	1,12	1,83	1,28	1,10	0,99	1,14	1,40
1,87	0,85	0,77	0,82	0,78	1,11	0,84	1,18	1,06	0,78	0,31	0,75	0,86	0,80	0,82	1,11
1,46	1,10	1,32	1,65	0,85	0,97	0,88	1,12	0,93	0,96	0,85	0,84	0,86	0,90	0,80	0,94
1,08	2,04	1,20	1,12	0,71	1,41	0,87	1,11	1,21	1,07	1,34	1,04	0,75	1,03	0,97	1,39
0,49	0,57	1,11	0,94	0,69	0,99	0,87	1,42	0,75	0,67	1,13	1,22	0,68	1,02	1,48	1,38
1,02	1,28	0,95	1,00	0,65	1,03	0,95	1,50	0,80	1,53	1,18	1,32	0,87	0,91	1,64	1,44
0,87	0,78	0,80	1,07	0,56	0,78	0,65	1,43	1,39	1,09	0,91	1,20	0,67	0,73	1,05	1,18
1,66	1,26	0,50	1,13	0,74	1,01	1,14	1,05	1,01	1,76	0,55	2,45	0,77	0,81	1,75	1,81
1,24	1,36	0,96	0,92	0,96	0,81	0,82	0,98	0,80	2,24	#####	1,39	0,87	0,75	1,99	1,30
0,85	1,00	1,41	0,50	1,22	#####	0,86	1,02	0,90	1,21	1,79	0,84	1,40	#####	8,78	1,34
#####	0,96	0,00	0,54	0,65	0,78	0,63	1,79	1,26	0,71	0,64	0,90	0,38	0,59	0,88	3,69
1,19	1,39	0,34	1,19	0,80	0,68	1,19	#####	0,90	#####	0,50	0,54	0,64	0,15	#####	#####
1,01	0,48	1,31	0,84	0,66	0,62	0,82	#####	0,70	0,56	0,79	0,96	0,70	0,64	1,16	1,03
0,84	0,85	0,43	0,65	0,58	0,54	0,78	0,81	0,58	0,66	0,57	0,70	0,54	0,49	1,07	1,09
0,72	0,76	1,19	0,73	0,82	0,90	0,95	1,29	0,48	0,49	0,69	0,61	0,80	1,05	1,14	1,24
0,68	0,77	1,87	0,67	0,80	0,80	0,98	0,92	0,81	0,53	1,09	0,63	0,90	0,69	1,28	0,82
0,96	0,87	1,61	0,69	0,66	0,95	2,18	1,28	0,99	1,01	0,94	0,94	0,69	0,76	1,55	1,38
0,62	0,87	0,84	1,14	1,00	0,81	0,76	1,31	0,94	0,92	0,87	0,76	1,10	0,90	0,87	1,33
0,06	0,63	0,78	0,84	0,92	1,11	0,80	0,88	0,57	0,69	0,72	0,91	1,03	0,83	0,81	1,22
0,69	0,71	0,86	0,50	0,84	0,88	0,72	1,00	0,82	0,65	0,89	0,77	0,88	0,79	0,83	1,08
0,00	0,80	1,37	0,76	0,74	0,75	1,38	1,17	0,53	0,90	1,01	0,88	0,68	0,75	1,56	1,26
0,73	0,85	0,24	0,68	1,25	0,68	0,74	1,28	0,89	0,99	0,72	0,61	1,22	0,66	0,89	1,18
0,43	0,86	0,99	0,62	0,97	0,80	0,80	0,66	0,73	1,06	0,71	0,78	1,10	0,82	0,96	1,18
0,97	0,61	1,22	0,85	0,91	0,86	1,06	0,72	1,00	0,64	0,80	0,79	1,02	0,79	1,15	1,09
0,08	0,51	0,91	0,78	0,70	0,88	0,85	0,61	0,63	0,66	0,54	1,04	0,71	1,01	1,19	1,23
0,84	0,59	0,47	0,62	0,86	0,90	0,63	0,77	0,86	0,85	0,54	0,89	0,96	1,08	0,85	1,19
0,52	0,38	2,22	0,79	0,89	0,92	0,66	1,03	0,63	0,69	1,19	0,78	0,98	0,99	1,00	1,31
0,54	0,54	1,14	0,67	0,79	0,77	0,96	#####	0,77	1,51	0,74	0,72	0,94	0,72	1,16	#####

1,26	2,45	4,07	3,07	1,24	2,84	1,30	1,10
0,89	0,80	0,95	0,87	0,89	1,44	1,22	1,13
0,99	0,91	0,92	2,47	0,72	1,44	0,89	1,00
1,00	#####	1,14	#####	0,93	#####	0,78	0,03
0,95	1,30	2,53	0,70	0,87	0,84	1,61	0,96
1,77	0,50	0,84	0,89	0,96	4,70	0,90	0,66
1,31	1,40	0,87	0,91	0,99	1,19	0,97	1,15
1,07	0,92	1,02	0,91	0,87	1,72	0,79	1,00
1,00	1,08	0,78	0,93	1,07	0,79	1,18	0,98
1,06	0,90	1,00	0,91	0,89	1,68	#####	1,16
0,94	0,95	1,08	0,78	0,99	1,03	0,63	0,76
0,76	16,45	1,09	1,29	1,40	1,95	0,98	0,00
0,97	1,02	3,04	1,34	0,99	1,05	6,16	0,82
1,05	1,02	1,38	0,99	0,92	0,97	0,71	0,90
0,95	0,77	1,14	0,92	0,96	1,16	0,93	1,94
0,89	0,75	0,92	0,74	0,74	2,12	0,68	3,03
1,43	1,03	0,95	0,86	0,90	1,02	1,13	1,63
0,77	0,66	0,88	0,73	0,88	0,90	0,98	1,12
1,04	0,87	0,73	1,15	1,48	1,24	1,08	1,25
0,78	0,49	0,92	0,89	1,19	1,70	0,87	1,63
0,89	1,35	0,83	0,90	1,49	1,28	1,76	2,02
0,77	0,90	0,62	0,53	1,04	0,96	0,34	1,19
0,90	0,94	0,81	0,88	0,86	1,24	0,87	1,01
0,64	0,59	0,79	0,72	1,06	0,88	0,83	0,52
1,08	1,08	1,00	0,99	1,43	0,70	0,94	1,05
0,69	1,00	0,46	0,59	0,99	0,89	0,47	0,97
0,60	0,96	0,43	1,55	1,03	0,90	0,94	0,80
0,91	0,40	1,03	1,54	0,96	0,65	0,99	2,26
1,92	1,46	1,04	0,89	0,73	0,96	0,76	0,42
0,64	0,78	0,67	0,81	0,98	0,99	0,63	0,47
0,80	0,84	0,99	0,73	0,87	0,83	0,89	1,29
0,80	0,86	0,64	0,23	1,00	0,36	0,72	0,86

3.2. Prnp^{-/-}-Shammäuse

#####	0,41	0,45	0,85	0,69	1,56	0,90	0,90	0,94	0,88	0,95	0,89	0,85	0,88	1,17	0,98
1,11	0,63	0,77	0,93	0,77	1,08	0,86	0,96	1,06	0,85	0,80	0,92	1,00	0,84	1,21	1,81
0,96	0,83	0,87	1,15	0,83	1,06	0,99	0,99	0,78	1,00	0,98	1,05	0,89	0,68	1,21	1,26
1,06	0,77	0,94	0,79	0,00	0,06	0,94	0,71	0,99	0,94	0,86	0,86	0,56	0,78	1,24	#####
0,99	1,02	1,08	0,97	1,19	0,80	0,52	0,87	0,99	1,11	1,56	0,90	0,86	1,23	1,33	2,01
1,47	0,95	0,91	0,90	0,87	1,24	0,70	0,91	1,78	1,25	1,35	1,61	1,14	4,00	1,20	1,35
1,15	1,00	1,13	1,06	0,96	0,95	0,62	0,86	1,08	1,38	1,23	1,38	1,11	1,01	1,24	1,51
1,04	0,99	1,05	1,00	0,72	1,30	0,69	0,63	1,23	1,66	1,22	2,24	0,86	4,62	1,31	2,80
1,23	0,95	0,98	0,94	0,85	1,02	0,83	1,05	1,34	1,14	1,27	1,22	0,81	1,28	3,47	2,18
0,97	1,10	0,98	1,18	0,91	1,14	1,03	1,05	1,04	1,41	1,20	1,41	1,03	1,67	6,07	2,60
1,07	0,96	0,89	1,05	1,04	1,11	0,69	0,94	1,24	1,31	1,47	1,45	0,91	1,27	1,14	1,96
1,24	1,00	0,57	1,92	1,71	1,28	1,44	1,21	2,41	1,78	0,88	#####	1,15	2,23	1,86	2,57
0,91	1,07	0,85	1,32	1,18	1,10	5,28	1,14	1,63	1,41	1,10	1,51	1,14	1,17	3,77	2,55
1,00	1,02	1,49	1,00	1,30	2,59	4,53	1,52	1,16	1,08	1,57	1,16	1,24	#####	2,79	2,34
1,02	0,92	#####	1,08	2,57	2,43	0,88	2,71	#####	0,98	1,33	1,24	1,03	1,58	1,72	2,52
0,94	0,93	0,72	1,33	2,06	1,79	#####	#####	1,23	0,97	0,53	1,20	0,91	0,57	2,15	#####
1,08	1,00	0,98	1,08	1,02	1,06	1,06	1,66	0,53	0,64	0,66	0,63	0,69	0,47	0,94	0,95
1,03	0,96	0,85	1,01	1,25	1,12	1,07	0,72	0,47	0,67	0,45	0,29	0,48	0,45	0,96	1,00
0,98	0,95	0,94	1,39	1,45	1,08	1,15	1,15	0,45	0,17	0,54	0,00	0,69	0,99	1,05	1,18
0,89	0,91	1,37	1,12	1,04	4,21	1,26	0,49	0,69	0,42	1,29	0,28	0,79	0,43	1,20	0,87
0,87	0,91	1,04	0,96	#####	3,42	2,28	0,00	0,97	0,95	0,95	0,80	0,38	0,47	2,63	0,88
0,93	0,93	0,91	1,00	1,09	1,09	0,34	1,18	0,16	0,86	0,85	0,24	0,92	0,49	0,75	0,99
0,92	0,90	0,76	0,97	0,91	1,50	0,90	0,95	0,11	0,72	0,56	0,85	0,83	0,34	0,85	0,84
0,91	0,84	0,79	1,02	0,96	1,59	0,92	0,89	1,01	0,91	0,72	0,44	0,76	0,00	0,65	0,82
0,96	0,89	0,99	1,09	1,60	1,05	1,57	1,14	0,74	0,79	0,92	0,60	0,48	0,38	1,42	1,10
0,93	0,97	0,75	0,97	1,43	1,09	0,69	1,01	0,89	0,97	0,36	0,71	1,15	0,26	0,78	0,92
0,84	0,99	0,93	0,77	1,04	0,94	0,61	0,74	0,64	1,01	0,70	0,66	0,93	0,41	0,80	0,83
0,94	0,96	0,91	0,87	1,01	1,32	0,97	0,80	1,02	0,70	0,94	0,56	0,86	0,13	1,09	0,92
0,87	0,94	0,85	1,03	0,84	0,97	0,88	0,38	0,75	0,73	0,37	0,91	0,60	0,79	1,02	0,94
0,80	0,91	0,75	0,84	0,95	0,97	0,60	0,54	0,84	0,93	0,58	0,69	0,88	0,77	0,94	0,89
0,66	0,80	1,21	0,92	0,96	0,94	0,78	1,04	0,73	0,61	1,34	0,85	0,84	0,87	0,98	1,12
0,79	0,85	0,94	0,89	0,98	1,01	1,08	#####	0,85	0,54	0,86	0,69	0,80	0,44	1,11	#####

1,26	2,45	4,07	3,07	1,24	2,84	1,30	1,10	0,88	0,95	0,88	0,98	0,93	0,85	0,90	1,03
0,89	0,80	0,95	0,87	0,89	1,44	1,22	1,13	0,91	0,81	0,82	0,90	0,98	0,86	0,87	0,94
0,99	0,91	0,92	2,47	0,72	1,44	0,89	1,00	0,90	0,97	0,93	1,02	0,89	0,85	0,97	1,09
1,00	#####	1,14	#####	0,93	#####	0,78	0,03	0,90	0,92	0,95	1,10	0,79	0,88	0,96	0,91
0,95	1,30	2,53	0,70	0,87	0,84	1,61	0,96	1,26	1,00	1,10	1,00	0,88	0,79	0,83	0,92
1,77	0,50	0,84	0,89	0,96	4,70	0,90	0,66	1,15	0,83	0,88	0,97	0,92	0,87	0,85	0,88
1,31	1,40	0,87	0,91	0,99	1,19	0,97	1,15	0,95	0,97	1,04	1,05	0,81	0,96	0,71	0,90
1,07	0,92	1,02	0,91	0,87	1,72	0,79	1,00	0,97	0,96	0,99	1,05	0,75	0,93	0,77	1,12
1,00	1,08	0,78	0,93	1,07	0,79	1,18	0,98	0,78	0,80	1,03	1,01	0,73	0,89	0,87	0,89
1,06	0,90	1,00	0,91	0,89	1,68	#####	1,16	0,74	1,15	1,00	1,06	0,81	0,86	0,92	0,83
0,94	0,95	1,08	0,78	0,99	1,03	0,63	0,76	1,12	1,03	1,01	1,16	0,81	0,78	0,79	0,74
0,76	16,45	1,09	1,29	1,40	1,95	0,98	0,00	0,89	0,95	0,80	0,98	0,92	0,77	1,33	1,15
0,97	1,02	3,04	1,34	0,99	1,05	6,16	0,82	0,97	0,93	1,02	0,99	0,93	0,92	0,86	0,83
1,05	1,02	1,38	0,99	0,92	0,97	0,71	0,90	1,05	1,06	1,41	1,02	1,17	0,72	0,82	0,95
0,95	0,77	1,14	0,92	0,96	1,16	0,93	1,94	1,00	1,08	0,91	1,11	0,70	0,71	0,77	1,23
0,89	0,75	0,92	0,74	0,74	2,12	0,68	3,03	1,16	1,11	0,77	1,06	0,80	0,73	0,88	#####
1,43	1,03	0,95	0,86	0,90	1,02	1,13	1,63	1,48	1,02	1,03	1,07	0,87	0,81	1,04	1,18
0,77	0,66	0,88	0,73	0,88	0,90	0,98	1,12	1,05	0,97	0,88	1,28	0,72	0,73	1,04	1,09
1,04	0,87	0,73	1,15	1,48	1,24	1,08	1,25	1,78	1,73	1,00	1,59	0,98	1,09	1,09	1,30
0,78	0,49	0,92	0,89	1,19	1,70	0,87	1,63	1,08	1,24	1,26	1,07	1,08	0,17	1,06	1,25
0,89	1,35	0,83	0,90	1,49	1,28	1,76	2,02	1,07	1,15	1,06	1,01	0,20	0,00	1,42	1,71
0,77	0,90	0,62	0,53	1,04	0,96	0,34	1,19	#####	1,05	1,04	#####	1,07	0,72	1,19	1,16
0,90	0,94	0,81	0,88	0,86	1,24	0,87	1,01	6,39	1,05	0,95	1,12	0,98	0,31	0,91	0,95
0,64	0,59	0,79	0,72	1,06	0,88	0,83	0,52	1,28	3,45	1,19	1,57	0,99	0,47	0,80	1,05
1,08	1,08	1,00	0,99	1,43	0,70	0,94	1,05	1,27	1,10	1,06	4,95	1,29	1,48	1,64	1,34
0,69	1,00	0,46	0,59	0,99	0,89	0,47	0,97	1,93	1,20	1,58	1,46	1,34	0,72	#####	1,33
0,60	0,96	0,43	1,55	1,03	0,90	0,94	0,80	1,05	1,20	1,44	0,88	1,14	0,88	0,59	1,94
0,91	0,40	1,03	1,54	0,96	0,65	0,99	2,26	1,09	0,00	1,10	1,35	1,16	#####	1,18	2,43
1,92	1,46	1,04	0,89	0,73	0,96	0,76	0,42	1,44	1,51	1,62	1,17	0,66	1,01	1,20	4,04
0,64	0,78	0,67	0,81	0,98	0,99	0,63	0,47	1,05	1,09	0,98	1,06	1,03	0,91	1,65	1,78
0,80	0,84	0,99	0,73	0,87	0,83	0,89	1,29	0,85	0,88	1,14	1,12	1,01	0,99	1,08	1,32
0,80	0,86	0,64	0,23	1,00	0,36	0,72	0,86	0,85	0,64	1,03	0,95	1,02	0,89	1,08	#####

1,17	1,00	1,20	1,40	0,66	0,79	0,69	0,52
1,14	0,87	0,91	0,51	0,78	0,59	0,86	1,71
1,01	0,56	0,72	0,89	0,50	0,94	0,44	0,63
1,09	0,80	1,26	0,65	1,30	0,60	0,68	0,72
0,47	0,98	1,95	1,69	0,80	1,05	0,86	0,96
0,64	1,88	2,26	1,50	0,74	1,05	0,76	1,07
1,63	1,19	0,65	2,89	0,97	1,14	0,80	0,97
0,42	0,64	0,49	0,71	0,42	1,00	0,82	0,89
0,87	0,93	1,15	1,10	0,90	1,21	0,84	0,95
0,91	1,33	1,10	1,13	0,97	1,07	0,79	0,78
1,24	1,09	1,06	1,26	0,99	1,00	0,81	0,92
0,88	0,82	0,84	0,95	1,05	1,07	1,68	0,81
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,05	0,89	1,02	1,17	1,10	1,10	0,68	0,77
1,10	1,07	1,64	1,03	1,50	1,12	0,72	0,95
0,98	0,84	1,04	1,10	1,02	1,15	0,71	0,98
1,11	0,74	0,92	0,73	1,25	1,06	0,53	#####
0,94	0,86	0,97	1,26	1,01	0,98	1,00	0,89
0,79	0,82	0,98	0,95	1,00	1,00	0,82	0,97
0,77	0,80	0,99	1,80	1,55	1,16	0,90	1,28
0,91	0,73	1,52	0,91	1,23	0,90	1,43	0,83
1,07	0,97	1,14	1,22	1,59	1,55	1,64	5,99
0,53	0,91	1,14	0,00	1,02	1,10	0,27	1,25
#####	0,91	0,72	1,27	1,07	3,48	0,14	#####
1,03	0,64	1,12	#####	1,10	#####	1,13	0,53
0,00	1,05	1,05	1,82	1,92	7,13	1,25	1,12
1,46	1,14	0,87	1,08	1,39	1,30	0,10	1,05
0,72	1,03	0,91	0,97	1,15	1,15	0,54	0,00
0,92	0,39	1,08	7,66	1,06	0,85	0,97	2,70
0,58	0,96	1,07	1,11	0,87	1,12	1,03	0,66
1,08	0,85	0,93	1,15	0,94	1,00	0,65	0,74
0,80	0,85	1,34	0,94	1,02	1,08	0,68	1,25
1,11	0,73	0,91	0,94	1,04	0,86	0,89	#####

3.3. Prnp^{+/+}-Ischämiemäuse

1,36	1,31	2,62	1,62	1,71	1,80	1,45	4,65	1,18	1,57	2,20	1,61	1,24	1,42	0,73	0,47
1,27	1,11	1,02	1,18	1,31	1,67	1,18	0,00	1,27	1,32	1,56	1,32	1,20	1,32	1,05	2,40
1,25	1,08	1,19	1,91	1,15	1,36	1,24	1,97	1,28	1,15	1,18	1,64	1,16	1,24	0,38	0,47
1,08	0,93	1,18	1,24	1,59	1,34	1,14	1,27	1,03	1,19	0,91	1,13	1,09	1,19	0,41	0,52
1,12	1,12	1,43	1,09	1,72	1,28	0,96	2,41	1,10	1,23	1,45	1,14	1,33	1,32	1,07	1,15
1,23	0,71	1,23	1,08	0,97	0,94	0,83	1,42	1,20	1,16	1,29	1,33	1,00	1,35	0,86	1,02
1,08	1,03	1,23	1,28	0,90	1,14	0,75	1,50	1,22	1,26	1,20	1,58	1,04	0,94	0,93	1,08
1,09	0,76	1,16	1,02	0,74	0,88	0,77	0,86	1,05	1,29	1,22	1,41	0,91	1,12	0,86	1,14
0,79	0,75	0,99	0,94	0,70	1,04	0,76	1,60	1,10	1,05	1,15	1,05	1,02	0,90	0,91	0,84
0,62	1,20	0,91	1,03	0,87	1,15	0,52	1,29	1,87	1,01	1,03	1,08	0,85	0,91	1,05	#####
1,09	0,88	1,04	1,16	0,67	1,07	0,72	1,89	1,50	1,03	1,43	1,13	0,84	0,92	0,69	1,69
0,71	0,73	0,81	0,78	1,23	0,75	1,43	0,76	1,63	1,22	1,22	1,69	1,00	0,98	0,96	#####
1,17	0,98	0,42	1,05	1,14	1,22	0,07	1,16	0,96	1,13	2,16	1,09	0,77	0,94	0,69	0,16
1,04	0,97	1,54	1,03	1,34	#####	0,35	1,39	0,93	1,08	1,04	0,88	0,98	#####	0,60	0,74
1,67	0,83	#####	0,93	0,06	1,41	0,52	2,02	1,41	1,09	#####	0,97	0,68	0,50	0,46	0,22
1,13	0,64	0,85	0,57	1,15	0,41	0,00	#####	0,85	1,12	0,76	1,16	0,82	0,45	0,00	#####
1,09	0,99	0,70	0,89	0,71	0,93	0,97	1,26	1,02	1,00	0,67	0,98	0,57	0,56	0,96	0,22
0,91	0,99	0,49	0,65	0,32	0,66	0,70	0,95	1,10	1,21	0,11	0,55	0,52	0,52	0,84	0,66
1,03	0,61	0,91	0,80	1,05	1,09	0,85	1,27	1,81	1,44	0,47	0,98	0,83	0,94	0,94	0,98
0,95	0,57	1,36	0,56	0,95	0,29	1,13	0,36	0,76	1,16	0,99	0,88	0,85	0,88	0,98	1,02
1,02	0,99	0,88	1,06	0,27	0,48	1,76	0,66	0,95	1,03	0,92	0,72	0,83	0,92	1,84	0,97
0,92	0,99	0,69	0,48	0,95	0,83	0,35	1,06	#####	0,96	0,72	0,96	0,91	0,81	0,87	1,09
#####	0,71	0,61	0,89	0,93	0,66	0,33	0,72	0,00	0,84	0,40	0,87	0,84	0,90	0,98	0,94
1,02	0,60	0,80	0,61	0,86	0,28	0,36	0,42	0,95	0,98	0,68	0,97	0,78	0,96	0,84	1,05
1,13	0,92	0,90	0,74	0,58	0,62	0,96	0,87	0,64	0,82	0,85	0,67	0,85	0,94	0,85	0,98
1,08	0,95	0,51	0,66	0,98	0,59	0,30	0,94	0,82	0,88	0,44	0,85	0,98	0,94	0,89	0,86
0,86	1,00	0,78	0,66	0,93	0,65	0,41	0,66	0,72	0,89	0,69	0,71	0,93	0,92	0,93	0,93
1,03	0,57	0,91	0,67	0,96	0,47	0,84	0,84	0,89	0,94	0,75	0,93	0,96	1,02	1,00	1,12
1,51	0,58	0,40	1,05	0,82	1,00	0,76	0,61	0,83	0,99	0,54	0,83	0,92	0,95	0,93	1,08
0,98	0,93	0,85	0,92	1,15	0,96	0,50	0,61	0,76	0,88	0,60	0,75	0,96	0,87	0,99	1,04
0,97	0,90	1,18	0,98	1,02	0,97	0,40	0,91	0,81	0,86	1,04	0,97	0,95	1,03	1,00	1,08
1,15	0,60	0,89	0,63	1,11	0,62	0,68	#####	0,98	1,00	0,77	0,82	0,93	1,05	1,07	#####

2,00	1,39	3,19	5,04	1,50	#####	2,94	0,92	1,17	1,15	1,17	1,06	1,01	0,94	1,07	1,19
1,41	1,09	1,38	1,11	1,38	5,48	2,14	1,93	1,21	0,92	0,99	1,06	1,09	0,89	0,95	1,16
1,26	1,18	1,23	13,22	1,16	1,71	1,27	1,12	1,13	1,15	1,07	1,04	1,02	0,89	1,13	1,20
1,05	0,56	0,99	0,49	1,23	0,76	1,00	1,04	0,95	1,06	0,95	0,92	0,82	0,85	1,09	1,16
0,98	1,30	5,35	0,91	1,56	1,29	1,08	1,33	1,38	1,17	1,07	0,90	0,96	0,83	0,88	1,06
4,71	0,75	0,86	0,90	1,00	#####	0,74	0,85	1,25	0,92	0,89	0,90	0,85	0,98	0,84	0,98
0,77	0,68	0,98	1,07	0,85	1,01	0,53	0,73	1,07	1,02	0,95	0,96	0,79	0,91	0,77	1,07
1,00	0,13	0,93	0,16	0,65	0,38	0,58	0,14	1,07	1,21	1,00	0,93	0,75	0,96	0,77	1,03
0,64	0,55	0,78	0,73	0,61	0,72	0,98	1,06	0,85	0,83	0,97	0,88	0,61	0,92	0,90	1,17
0,46	1,03	0,82	0,80	0,69	0,86	1,42	0,34	0,62	1,22	0,97	0,96	0,68	0,86	1,02	1,33
1,03	0,78	1,00	0,81	0,71	0,98	0,53	0,77	1,14	0,94	0,90	1,06	0,78	0,85	0,85	0,99
0,73	0,15	0,58	0,07	3,54	0,00	1,54	0,00	0,68	0,96	0,80	0,81	0,82	0,91	1,27	1,15
0,89	0,86	6,12	1,40	0,92	0,99	1,93	0,48	0,88	1,02	0,94	0,88	0,94	0,89	0,99	1,13
0,95	0,88	2,45	1,34	1,18	1,24	1,45	1,31	0,94	1,01	1,27	0,86	1,20	0,80	0,86	1,23
0,86	0,65	4,20	0,81	2,26	1,97	0,77	1,67	1,00	0,86	0,84	0,93	0,75	0,74	0,78	1,43
0,91	0,11	0,87	0,00	2,13	0,60	0,70	0,18	0,99	1,07	0,77	0,97	0,79	0,81	0,93	#####
7,68	1,07	0,97	0,96	0,93	0,95	1,04	2,30	1,14	1,01	0,93	0,95	0,83	0,78	1,07	1,66
1,08	0,78	0,92	0,60	0,93	0,78	0,85	1,36	0,99	0,97	0,79	0,73	0,72	0,75	1,00	1,13
1,89	0,41	0,86	0,68	2,24	1,15	1,03	1,14	1,21	1,31	0,81	0,79	0,73	1,06	1,13	1,33
0,77	0,16	1,39	0,02	1,00	0,49	1,30	0,33	0,93	1,09	1,22	0,81	0,94	0,94	1,26	1,07
0,98	1,04	0,83	0,88	2,92	2,14	2,46	#####	1,05	1,08	0,99	0,80	0,26	0,62	1,55	#####
1,11	0,78	0,88	0,39	0,88	1,25	0,29	1,27	2,06	1,17	0,71	0,86	0,95	0,55	0,92	1,23
#####	0,98	0,90	0,82	0,79	1,20	0,61	1,10	#####	1,00	0,83	1,01	0,86	0,65	1,07	1,17
0,66	0,00	1,09	0,22	0,80	0,37	0,67	0,53	0,63	2,23	0,82	0,88	0,87	0,50	1,07	1,67
1,12	0,79	1,09	1,43	1,88	0,70	1,69	0,87	0,00	0,86	0,91	0,71	0,52	0,94	1,73	1,56
0,64	0,90	0,28	0,35	1,30	0,90	0,22	0,91	0,71	1,02	0,37	0,66	1,26	0,42	0,00	1,41
0,51	0,90	0,62	0,70	0,93	0,78	0,84	0,70	0,93	1,03	0,54	0,65	0,96	0,60	0,42	1,14
0,84	0,24	1,04	0,52	0,95	0,52	0,83	1,11	1,11	1,33	0,94	1,05	1,01	#####	1,27	2,79
2,44	1,24	#####	0,91	1,02	0,86	0,72	0,15	1,61	0,96	#####	0,98	0,70	0,88	1,09	1,57
0,64	0,76	1,43	0,98	0,96	0,90	0,36	0,32	1,17	1,04	0,61	0,73	1,03	0,78	1,05	1,41
0,72	0,96	1,67	0,79	0,97	0,88	0,65	1,03	1,09	0,90	1,00	0,88	0,99	0,93	0,99	1,18
0,75	1,26	0,95	1,65	0,96	0,83	0,69	0,37	0,85	1,30	0,95	0,89	1,01	1,03	1,00	#####

1,73	1,20	1,43	1,20	1,05	1,10	1,15	1,32
1,38	1,15	1,13	1,26	1,12	1,16	1,23	1,39
1,19	1,17	1,23	1,31	1,10	1,09	1,10	0,98
1,51	0,99	1,10	0,95	1,02	0,97	1,10	1,17
1,10	1,23	1,42	1,17	1,02	1,02	0,92	2,16
2,28	0,80	1,01	1,03	1,11	0,97	1,05	1,16
1,37	1,01	1,19	1,13	1,08	1,17	0,96	1,03
1,23	0,93	1,04	0,87	1,08	0,87	1,00	0,95
0,99	0,98	1,07	1,03	1,31	1,12	0,93	5,94
0,94	1,05	0,95	1,13	1,15	0,99	0,67	0,01
1,51	0,96	1,01	1,29	1,23	1,08	1,00	#####
1,04	0,78	0,82	0,66	#####	0,47	0,83	0,79
1,12	0,88	1,66	1,74	1,14	1,10	0,66	0,65
1,23	0,92	0,86	1,46	1,02	0,89	0,57	1,07
2,16	0,77	#####	1,06	0,77	0,78	0,83	0,00
1,66	0,56	0,97	0,42	0,93	0,64	0,40	#####
0,00	0,96	1,07	1,20	1,01	1,10	0,94	0,77
0,58	0,97	0,96	1,02	0,90	0,98	0,97	0,75
0,87	0,84	0,98	1,06	1,00	1,12	0,92	0,85
1,02	0,86	1,04	0,78	1,00	0,55	1,01	1,38
0,90	0,94	0,96	0,99	0,79	0,67	0,67	0,00
1,11	0,98	0,92	0,78	0,83	0,73	0,73	0,91
0,97	1,05	0,78	0,98	0,98	0,66	0,82	0,85
1,04	0,84	0,84	0,83	0,95	0,69	0,79	0,82
2,00	0,97	0,98	1,03	0,88	0,99	0,87	0,95
2,01	1,10	1,00	1,10	0,94	0,88	0,66	1,01
1,49	0,90	1,10	1,02	0,97	0,97	0,86	0,89
1,07	0,97	1,15	0,59	1,00	0,82	1,00	1,00
#####	1,27	1,08	1,13	0,97	1,00	0,97	0,72
1,43	1,08	1,05	1,15	0,97	1,01	0,71	0,82
1,17	0,96	1,15	0,99	1,00	1,11	0,75	0,95
1,48	0,79	0,94	1,46	1,04	0,86	0,88	#####

3.4. Prnp^{-/-}-Ischämiemäuse

1,63	1,57	1,77	1,41	1,31	1,33	1,24	1,13	0,80	0,78	0,76	0,78	0,78	0,84	0,86	0,92
1,12	1,11	1,29	1,13	1,26	1,34	1,28	1,22	0,84	0,71	0,67	0,87	0,90	0,79	0,79	0,88
1,19	1,14	1,17	1,12	1,06	1,12	1,00	1,14	0,84	0,95	0,95	0,73	0,80	0,76	1,00	1,12
1,04	0,85	1,01	0,87	1,36	0,96	1,08	0,96	0,83	0,65	0,88	0,73	0,53	0,76	0,97	0,75
1,01	1,19	1,15	1,02	1,11	1,20	1,12	1,36	0,78	0,68	0,67	0,73	0,46	0,63	0,66	0,77
1,42	0,73	0,81	0,90	0,95	1,17	0,99	1,03	0,87	0,64	0,75	0,73	0,72	0,66	0,76	1,13
1,13	1,02	1,04	1,25	1,20	1,06	0,88	1,15	0,66	0,73	0,84	0,88	0,54	0,74	0,70	0,99
1,06	0,68	1,08	0,75	0,80	1,14	0,93	0,79	0,89	0,73	1,03	0,72	0,63	0,62	0,80	1,05
0,47	0,81	0,99	1,02	0,71	1,01	1,19	1,52	0,77	0,76	1,14	1,07	0,71	1,04	0,96	1,16
0,00	1,18	0,94	0,97	0,92	0,99	1,16	#####	0,47	1,36	1,17	1,25	0,86	0,97	1,02	1,07
0,99	0,96	0,85	1,16	0,76	1,01	0,60	1,65	1,19	0,96	1,25	1,20	0,77	0,86	0,96	0,92
0,99	0,76	0,64	0,76	0,88	0,69	1,47	0,66	0,78	1,05	1,10	1,44	0,91	1,04	1,64	0,91
1,12	1,11	0,05	1,03	1,04	0,72	0,00	0,72	0,87	0,91	#####	1,35	1,09	1,04	1,08	1,12
1,02	0,99	1,51	0,83	1,19	#####	0,85	1,02	1,04	1,00	1,67	0,86	1,45	#####	1,20	1,04
1,45	0,84	#####	1,02	0,75	1,00	0,63	1,03	0,48	0,80	0,00	1,01	0,49	1,32	0,79	1,85
1,13	0,85	0,74	0,25	0,89	0,56	0,16	#####	0,99	3,67	0,52	0,97	1,00	0,94	#####	2,47
1,38	1,15	0,93	0,97	0,97	0,83	0,98	1,09	1,25	0,77	0,99	1,08	0,88	0,70	1,28	1,78
0,86	1,08	0,75	0,59	0,72	0,52	0,85	0,93	0,93	0,81	0,90	0,96	0,80	0,78	1,19	1,10
1,59	1,18	0,78	0,57	1,02	1,00	0,92	1,12	0,83	0,62	0,85	1,02	1,13	1,11	1,25	1,31
0,86	0,92	1,48	0,30	1,16	0,63	1,17	0,93	0,84	0,72	1,33	1,11	1,10	1,17	1,39	0,85
1,00	0,95	0,97	0,59	0,64	0,77	1,78	1,02	1,09	1,04	1,00	1,00	0,91	1,17	2,26	0,31
4,54	1,00	0,88	0,73	0,93	0,80	0,55	0,97	0,00	0,98	0,91	1,03	1,21	1,02	0,79	1,32
#####	0,97	0,56	0,91	0,88	0,66	0,77	0,83	#####	0,80	0,86	1,08	1,07	1,25	0,79	0,76
0,88	0,79	0,94	0,87	1,01	0,67	0,81	0,62	1,02	0,73	1,13	1,20	1,02	1,08	0,77	1,31
0,91	1,00	1,01	0,87	0,89	0,81	1,15	0,87	0,32	0,94	1,07	0,86	0,99	0,98	1,80	1,24
0,89	1,00	0,40	0,84	1,04	0,86	0,74	0,86	1,02	1,16	1,11	0,91	1,42	0,98	0,95	1,02
0,94	1,04	0,81	0,83	0,93	0,74	0,80	0,73	0,72	1,22	0,90	0,79	1,17	0,89	0,95	0,91
1,03	0,40	0,84	0,60	0,94	0,66	1,00	0,99	0,95	1,10	1,04	1,30	1,14	1,11	1,24	1,02
1,12	0,93	0,22	1,01	0,88	0,94	0,92	0,69	1,18	0,78	0,61	1,10	0,84	1,15	1,13	1,00
1,16	0,94	0,60	0,80	0,95	0,90	0,71	0,71	1,05	0,99	0,63	0,99	1,14	1,11	1,00	1,04
0,77	0,84	1,07	0,86	0,92	0,83	0,86	1,01	0,67	1,21	1,62	1,06	1,24	1,20	0,98	1,23
0,79	0,54	0,83	0,60	1,02	0,66	0,91	#####	0,81	1,11	1,02	1,04	1,08	1,01	1,16	#####

0,89	0,67	1,12	1,07	0,96	1,01	0,98	1,66	2,00	1,32	1,43	1,32	1,21	1,62	0,99	1,54
0,78	0,70	0,94	0,82	0,82	0,78	1,10	2,49	1,37	0,99	1,16	1,18	1,24	1,74	0,88	1,42
1,06	0,81	0,82	1,08	0,75	0,76	0,78	1,42	1,22	1,19	1,20	1,19	1,16	0,97	1,12	1,35
0,90	0,54	0,94	0,70	0,68	0,55	0,79	1,42	1,12	0,88	1,08	0,94	0,94	0,97	1,06	0,88
0,97	0,96	1,06	0,87	0,64	0,65	0,91	1,33	1,06	1,04	1,09	1,02	1,03	1,10	0,78	1,17
1,23	0,70	0,94	1,00	0,88	0,58	0,82	0,98	1,09	0,74	0,97	0,99	0,86	0,91	0,70	1,20
1,05	0,75	1,19	1,22	0,89	0,87	0,80	1,42	0,95	0,87	0,98	1,44	0,88	0,95	0,67	1,06
0,96	0,50	1,16	0,86	0,78	0,68	0,73	0,66	1,02	0,83	1,18	1,31	0,79	1,02	0,80	0,65
0,83	0,90	0,82	1,06	0,65	0,76	0,96	1,58	0,71	0,80	1,03	1,22	0,83	1,03	0,76	0,73
0,74	0,84	0,98	0,89	0,82	1,01	0,40	1,87	0,62	1,33	0,92	1,09	0,83	1,05	0,65	0,67
0,62	0,81	1,15	0,92	0,84	0,78	0,75	1,58	1,21	0,97	0,85	1,19	0,93	1,03	0,62	1,02
0,68	0,46	0,94	1,17	0,97	0,77	1,04	1,70	0,66	0,94	0,78	0,82	0,91	0,67	1,18	0,61
1,25	1,07	2,41	1,52	0,99	1,07	#####	1,54	0,85	0,75	0,96	1,12	1,02	0,96	0,49	0,28
1,12	1,08	1,34	1,51	0,93	5,71	0,79	0,98	0,78	1,03	1,38	0,94	1,23	0,90	0,57	0,62
#####	0,85	2,98	1,15	1,36	1,07	1,39	2,76	1,02	0,77	0,86	0,98	0,77	0,85	0,54	0,53
1,39	0,00	1,30	0,35	0,95	0,36	0,00	1,19	1,08	0,79	0,81	0,96	0,86	0,81	0,46	#####
3,94	1,15	1,46	1,42	1,38	1,64	1,21	2,72	0,87	0,79	0,91	0,89	0,96	1,75	1,04	#####
1,14	0,71	1,46	5,01	1,73	1,42	1,12	1,38	0,71	0,74	0,91	0,80	0,77	1,47	0,80	1,02
1,62	0,72	0,86	#####	1,01	1,21	1,22	1,44	0,74	0,64	0,88	1,17	1,10	1,48	1,04	0,99
1,07	0,31	1,00	0,00	1,58	#####	0,97	1,63	0,82	0,64	1,26	0,80	1,35	1,76	1,20	0,32
1,10	0,92	1,19	1,40	2,30	2,46	1,40	2,13	1,56	1,01	0,96	1,09	0,51	0,22	1,31	0,60
0,61	1,04	0,71	0,45	1,21	1,69	0,54	1,36	0,87	0,85	0,92	1,13	0,90	0,49	0,55	1,48
0,99	0,86	0,94	1,07	1,00	1,91	1,34	1,13	1,57	0,78	0,92	0,92	0,84	#####	0,59	0,83
0,75	0,41	0,93	0,75	1,01	0,55	0,92	0,81	1,17	0,77	0,79	#####	0,86	0,29	0,43	0,36
0,90	0,76	0,97	1,02	0,80	0,72	1,07	1,04	#####	0,84	0,95	2,56	0,94	0,79	1,05	0,98
0,55	0,92	0,50	0,80	1,01	1,02	0,79	1,07	1,34	1,13	0,84	0,61	1,14	0,68	0,50	0,73
0,69	1,10	0,66	1,61	0,97	0,79	0,86	0,74	0,84	1,57	0,88	0,78	0,97	0,89	0,50	0,52
1,22	0,35	0,96	0,88	1,00	0,29	1,02	1,04	1,76	0,45	1,27	0,52	1,02	0,86	0,86	0,72
1,35	0,79	1,28	1,04	0,79	0,82	0,72	0,47	1,15	1,17	1,38	0,98	1,04	0,96	0,94	0,55
0,96	0,80	1,03	0,94	1,04	1,03	0,50	0,56	1,30	0,88	1,03	0,90	1,14	1,06	0,63	0,54
1,47	0,92	1,15	0,77	0,95	0,86	0,56	1,11	1,37	0,71	1,36	0,92	0,96	1,08	0,66	0,97
1,65	0,66	0,82	0,89	1,03	0,00	0,87	0,55	0,99	0,77	0,93	0,75	1,13	1,01	0,79	#####

1,95	1,00	0,21	3,75	1,08	1,21	1,22	1,23
0,72	1,00	0,97	1,06	0,98	1,35	1,19	2,04
0,83	0,91	0,99	1,83	1,12	1,17	1,07	1,12
1,19	1,01	1,17	1,04	1,13	1,05	1,05	1,13
0,95	1,07	7,76	1,14	1,03	1,11	1,21	1,27
#####	0,69	1,17	1,21	1,13	0,95	1,10	0,96
1,21	0,95	0,81	1,31	1,07	1,05	1,22	1,08
0,83	0,89	0,90	1,08	1,11	1,00	1,12	1,02
0,90	0,99	0,94	1,05	1,06	1,03	1,24	0,99
0,73	0,90	0,98	1,00	1,13	1,15	1,07	0,95
0,88	0,92	1,05	0,91	1,13	0,95	1,10	1,04
0,16	0,78	1,02	0,42	0,78	0,68	0,94	1,09
0,91	0,93	1,11	1,11	0,92	0,92	1,07	0,95
0,91	0,94	0,51	1,16	0,80	0,63	1,01	1,05
0,39	0,79	0,89	0,96	0,71	0,47	1,06	0,94
0,59	0,75	0,99	1,09	0,64	0,47	0,98	#####
0,27	1,01	0,95	0,75	1,18	1,22	1,02	#####
0,58	0,90	1,05	1,41	1,07	1,36	1,07	0,87
0,32	0,91	1,27	#####	#####	1,01	1,05	0,87
0,94	0,86	0,69	0,76	1,05	0,64	0,96	0,84
0,95	1,03	0,99	1,15	0,76	0,76	0,83	1,74
0,72	1,13	0,90	2,84	0,80	0,94	1,09	1,05
0,62	1,17	1,29	1,14	0,83	0,80	1,21	0,93
0,79	0,93	1,15	1,21	0,88	0,89	1,17	0,94
0,87	1,04	1,06	1,81	0,89	1,23	0,88	1,00
0,90	1,03	1,33	1,36	0,79	1,27	1,15	1,14
0,93	0,99	1,13	1,02	1,03	1,13	1,15	1,15
1,12	0,87	1,00	1,33	1,01	0,95	1,12	1,33
2,27	1,32	1,34	1,22	1,15	1,11	1,03	1,14
0,79	0,97	1,21	1,14	1,08	1,13	1,10	1,07
1,21	1,05	0,91	1,13	1,08	1,19	1,23	1,18
1,02	0,32	0,59	0,53	0,77	0,58	0,88	#####

3. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Microgramm
µl	Microliter
µm	Micrometer
A.	Arteria
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Akt	RAC-alpha Serin/Threonin-Protein Kinase
AP	Alkalische Phosphatase
Apaf-1	apoptosis protease activating factor-1
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bax	B-Cell Lymphoma 2-associated protein X
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
Bcl-x _L	B-Cell Lymphoma extra long
Bcl-x _s	B-Cell Lymphoma extra small
Bid	Bcl-2 like inducer of death
BSA	bovine serum albumin
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Caspase	Cysteiny-Aspartat-spezifische Protease
Cdh	Cadherin
Cdk	cyclin dependent kinase
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Disease
Cl	Chlorid
cm	Zentimeter
ctmPrP	C-terminal transmembranes Prionprotein
CWD	Chronic Wasting Disease
Cyt C	Cytochrom C
d. h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DAPK	death-associated protein kinase
DAXX	death-associated protein XX
DIABLO	direct IAP-binding protein with low pI
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Doppel	downstream prion protein like element
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
ERK	extracellular signal-regulated kinase
etc.	et cetera
FasL	Synonym: TNFL6 (Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6) bzw. Fas Ligand
fCJD	Familiäre CJD
FFI	Fatal Familial Insomnia
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie
g	Gramm

GAD	Glutamic Acid Decarboxylase (Glutaminsäuredecarboxylase)
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom
H	Wasserstoff (Hydrogen-)
HCl	Salzsäure (Hydrochlorid)
HDAC	Histon-Deacetylase
HPO ₄	Hydrogenphosphat
IAPs	inhibitor of apoptosis proteins
iCJD	Iatrogene CJD
IE	Internationale Einheiten
IκB	inhibitor of NF-κB
IKK	IκB Kinase
Ischämiemäuse	Mäuse, die einer Operation mit Induktion einer einstündigen Ischämie mit 24-stündiger Reperfusion (Histologie-Studien) bzw. 4-stündiger Reperfusion (Protein-Microarray-Studien) unterzogen wurden
JNK	c-jun-N-terminal kinase
kb	Kilobasen
kDA	Kilo-Dalton, Molekulargewicht von Proteinen
l	Liter
M	Mol
MA	Massachusetts
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
max.	maximal
MCA	middle cerebral artery
MEK	MAPK-ERK Kinase (MAPKK)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
m-RNA	messenger Ribonukleinsäure
N	Stickstoff
N	Anzahl
N.	Nervus
Na	Natrium
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (das H steht für Wasserstoff); systematischer Name: Coenzym Q Oxidoreduktase
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (das H steht für Wasserstoff); systematischer Name: Coenzym II oder Codehydrogenase II
NBT	Nitroblue Tetrazolium Salt
NF-κB	nuclear factor-kappaB
NGF	nerve growth factor
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR 2A (NR2A)	NR2A-Untereinheit des NMDA-Rezeptors
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (Glutamat-Rezeptor)
NO	Stickoxid
ntmPrP	N-terminal transmembranes Prionprotein
nvCJD	Neue Variante der CJD
OH	Hydroxy-
ORF	open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR4	Prostate Apoptosis Response 4
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)

PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI	Propidiumiodid
PI-3-Kinase (PI3K)	Phosphatidylinositol-3-kinase
PK	Proteinase K
PKA/B/C	Proteinkinase A/B/C
Prion	proteinaceous infectious only particle
Prnp	Gen des Prionproteins
Prnp ^{-/-}	Prionprotein-Knock-out
Prnp ^{+/-}	Mäuse, die heterozygot in Bezug auf das Prionprotein sind
Prnp ^{+/+}	Prionprotein-Wildtyp
PrP	Prionprotein
PrP ^C	zelluläres (cellular) Prionprotein
PrP ^{res}	Proteinase K resistenter Rest des PrP ^{Sc}
PrP ^{Sc}	pathogene Isoform des PrP ^C (PrP Scrapie)
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
Raf	Ras-activated factor bzw. rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
rCBF	regionaler cerebraler Blutfluss
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygene species (reaktive Sauerstoffradikale)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SA-AP	Streptavidin, gekoppelt an Alkalische Phosphatase
Sc	Scrapie
sCJD	Sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
Scrapie	Traberkrankheit
SDS	Sodium Dodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standard Error of the Mean
SFI	Sporadic Fatal Insomnia
Shammäuse	Mäuse, die denselben Operationsbedingungen wie die Ischämiemäuse, nur ohne Induktion einer Ischämie, unterzogen wurden
SMAC	second-mitochondrial-derived activator of caspases
SOD	Superoxid-Dismutase
Std.	Stunden
TEMED	Tetramethylethylendiamid
TME	Transmissible Mink Encephalopathy
TNF	tumor necrosis factor
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
Tween20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	Units
USA	United States of Amerika
UV	ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
VDAC	voltage-dependent anion channel
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

4. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Hans Kretzschmar für die Überlassung dieses sehr interessanten Projekts sowie für die zur Verfügung gestellten guten Forschungsbedingungen am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung.

Herrn Dr. med. Bjarne Krebs danke ich für seine exzellente Betreuung.

Ich bedanke ich mich bei Frau Dr. med. vet. Gerda Mitteregger und Frau Dr. rer. nat. Wei Xiang für ihre stets freundliche und kompetente Beratung.

Herrn Michael Schmidt und Frau Stephanie Walter danke ich für ihre wertvolle Hilfe im Labor. Mein Dank gilt zugleich allen Kolleg(inn)en der histologischen Abteilung.

Besonderer Dank gilt auch dem Neurochirurgen Dr. Milan Vosko, der den tierexperimentellen Teil geleitet hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich Mannsmann und Herrn Dr. Müller des Instituts für Biometrie und Epidemiologie der LMU für ihre kompetente Beratung bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

Der GSF danke ich dafür, dass sie mir für das Scannen der Protein-Microarrays ihren Protein-Microarray-Scanner freundlicherweise zur Verfügung stellten.

Ich danke meinen Eltern, die mich stets liebevoll auf meinem Weg unterstützt haben.

5. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Svenja Nölting
Geburtsdatum: 20.08.1982
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1989 - 1993: Grundschule Parsdorf
1993 – 2000: Gymnasium Vaterstetten
2000 - 2002: Gymnasium Grafing, Abitur
2002 - 2008: Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
2004: Physikum
12/2008: Staatsexamen
Approbation als Ärztin
Seit 12/2008: Assistenzärztin und wissenschaftliche Mitarbeiterin an der 2. Med. Klinik des Klinikums Großhadern der LMU München (Direktor: Prof. Dr. B. Göke)

Wissenschaftliche Tätigkeit

2004-2007: Dissertation: „Identifizierung potentieller molekularer Mechanismen der neuroprotektiven Wirkung des Prionproteins im murinen Ischämiemodell" am Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung der LMU München (Direktor: Prof. Dr. med. H. Kretzschmar)
Seit 2009: Neuroendokrine Tumoren - Neuroimmunoendokrinologie (PD Dr. med. C. J. Auernhammer)
2. Med. Klinik des Klinikums Großhadern der LMU München

Publikationen

Bjarne Krebs, Veronika Kohlmannsperger, **Svenja Nölting**, Rüdiger Schmalzbauer, Hans A. Kretzschmar,

Western blotting histological sections; A method to perform Western blots of microscopic areas of histological sections. (J. Histochem. Cytochem. 54(5):559-65, 2006)

Gerda Mitteregger, Milan Vosko, Bjarne Krebs, Xiang Wei, Veronika Kohlmannsperger, **Svenja Nölting**, Gerhard F. Hamann, Hans A. Kretzschmar,

The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein. (Brain Pathol. 17(2):174-83, 2007)

Eingereicht bei der Fachzeitschrift „Der Internist“:
Svenja Nölting, Mathias Nicolaus, Jürgen Behr, Rainer Baumgartner, Heiko Mete, Peter Boekstegers, Michael Lehrke, Burkhard Göke, Jörg Schirra, Christoph J. Auernhammer
Progrediente Dyspnoe bei Karzinoidsyndrom

Posterbeiträge

Treffen des Bayerischen Forschungsverbundes Prionen 2006, München

The role of the octarepeat region and its histidines in neuroprotective function of PrP^C

Gerda Mitteregger, Jan Burk, Bjarne Krebs, Wei Xiang, Veronika Kohlmannsperger, **Svenja Nölting**, Milan Vosko, Gerhard F. Hamann and Hans A. Kretzschmar

Vorträge

Neuroprotective function of cellular prion protein (Cardiovascular Research Laboratories, David Geffen School of Medicine, UCLA, Los Angeles, 2006)

Identifizierung potentieller molekularer Mechanismen der neuroprotektiven Wirkung des Prionproteins im murinen Ischämiemodell (Neuropathologie, LMU, München, Juni 2007)

7. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig versucht habe, eine Dissertation oder Teile einer Dissertation einzureichen bzw. einer Prüfungskommission vorzulegen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den 10.05.2008

(Svenja Nölting)