

Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der LMU München

Vorstand: Herr Prof. Dr. med. Dr. h.c. H. A. Kretzschmar

**Untersuchung der Spaltung des zellulären Prionproteins
bei zerebralem Trauma und ischämischem Insult im Mausmodell**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Veronika Kohlmannsperger

aus

München

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter	Prof. Dr. med. Dr. h.c. H. A. Kretzschmar
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. C. Opherk Prof. Dr. med. N. Plesnila
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. B. Krebs
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	05.05.2011

Für Hans Leopold

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE)</i>	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	TSE der Tiere	2
1.1.3	TSE des Menschen	2
1.2	<i>Die Isomere PrP^C und PrP^{Sc}</i>	3
1.3	<i>Pathophysiologie des PrP^{Sc}</i>	4
1.3.1	Replikation des PrP ^{Sc}	4
1.3.2	Hypothese des “Loss” und “Gain of PrP ^C -Function”	4
1.4	<i>Das zelluläre Prionprotein</i>	5
1.4.1	Prnp und Prnd	5
1.4.2	Biosynthese des PrP ^C	6
1.4.3	Topologie des PrP ^C	7
1.4.4	Struktur des PrP ^C	7
1.4.5	Stoffwechsel und Spaltungsprodukte	9
1.5	<i>Potentielle Funktionen des zellulären Prionproteins</i>	10
1.5.1	Prnp-knock-out	10
1.5.2	Interaktionspartner und Signalwege	11
1.5.3	PrP ^C schützt vor Bax-vermittelter Apoptose	11
1.5.4	Essentielle Rolle der N-terminalen Domäne für die Funktion des PrP ^C	12
1.5.5	PrP ^C und Kupfer	13
1.5.6	Einfluss des PrP ^C auf die synaptische Übertragung	13
1.5.7	Funktionelle Bedeutung der Spaltprodukte des PrP ^C	14
1.6	<i>Neuroprotektive Wirkung des PrP^C in vivo</i>	14
1.6.1	Controlled Cortical Impact (CCI)	15
1.6.2	Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO)	15
1.7	<i>Zielsetzung</i>	16
2	Material und Methoden	18
2.1	<i>Tierzucht</i>	18
2.1.1	Tierhaltung	18
2.1.2	Genetik	19
2.2	<i>Neurochirurgie</i>	20
2.2.1	Controlled Cortical Impact (CCI)	20
2.2.2	Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO)	20
2.3	<i>Histologische Untersuchungen</i>	21

2.3.1	Anfertigen der Kryoschnitte	21
2.3.2	Fixierung und Rehydrierung von Kryoschnitten	22
2.3.3	Immunhistochemie.....	22
2.3.4	Nissl-Färbung.....	24
2.3.5	Konservierung der gefärbten Schnitte.....	24
2.4	<i>Volumetrie</i>	24
2.5	<i>Immunoblot-Analyse</i>	25
2.5.1	Färbung vor dem Lysieren	25
2.5.2	Lysierungsverfahren	26
2.5.3	Abschätzung des Volumenverlusts bei der Lysierung durch Verdunstung	27
2.5.4	Kontrolle der Schnittdicke der histologischen Schnitte	27
2.5.5	Detektionsgrenze der Immunoblot-Technik	27
2.5.6	Herstellung der Proben für das CCI- und MCAO-Projekt.....	27
2.5.7	Herstellung der Konzentrationsreihen für MCAO und CCI	28
2.5.8	Deglykosylierung mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F).....	29
2.5.9	Laden der Proteine	30
2.5.10	Herstellung eines Bis-Tris-Polyacrylamidgels	30
2.5.11	Elektrophorese.....	31
2.5.12	Coomassie Färbung zur Kontrolle der elektrophoretischen Auftrennung	32
2.5.13	Semidry Blotting Technik	32
2.5.14	Immunodetektion.....	33
2.5.15	Densitometrie.....	34
2.6	<i>Statistik</i>	39
2.7	<i>Experimentelles Protokoll</i>	39
3	Ergebnisse	40
3.1	<i>Präzision der Methoden und Vorversuche</i>	40
3.1.1	Überprüfung der Schnittdicke.....	40
3.1.2	Vollständigkeit des Lysierens	40
3.1.3	Detektionsgrenze der Immunoblot-Technik	41
3.1.4	Deglykosylierung mit PNGase F	42
3.2	<i>Controlled Cortical Impact (CCI)</i>	43
3.2.1	Histologie und Immunhistochemie	43
3.2.2	Volumetrische Messungen bei CCI	44
3.2.3	Immunoblot-Analyse und Densitometrie.....	45
3.3	<i>Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO)</i>	56
3.3.1	Histologie und Immunhistochemie	56
3.3.2	Volumetrie	57

3.3.3	Immunoblot-Analyse und Densitometrie.....	60
3.4	<i>Untersuchung der Spaltung des ΔPrP32-93</i>	70
4	Diskussion	74
4.1	<i>Präzision der histologischen Schnittdicke</i>	74
4.2	<i>Der Lysierungsprozesses</i>	74
4.3	<i>Detektionsgrenzen der Immunoblot-Analyse</i>	75
4.4	<i>Deglykosylierung mit PNGase F</i>	75
4.5	<i>Littermates</i>	76
4.6	<i>Modell der traumatischen und ischämischen Gewebeschädigung</i>	76
4.7	<i>Das histologische Expressionsmuster des PrP^C nach CCI und MCAO zeigt Parallelen</i> .	77
4.8	<i>Unterschiedliche Läsionsgrößen nach CCI und MCAO in Prnp^{+/+} und Prnp^{0/0}-Littermates</i>	78
4.9	<i>Prnp^{Δ32-93}- und Prnp^{0/0}-Littermates zeigen nach MCAO vergleichbare Läsionsvolumen</i>	78
4.10	<i>Histologisches Expressionsmuster von PrP^C und β-Aktin in Hinblick auf die Immunoblot-Analyse</i>	79
4.11	<i>Westernblot-Analyse des PrP^C nach CCI</i>	80
4.12	<i>Westernblot-Analyse des PrP^C nach MCAO</i>	80
4.13	<i>Westernblot-Analyse des PrP^{Δ32-93} nach MCAO</i>	81
4.14	<i>α-Cleavage des PrP^C bei CCI und MCAO ist erhöht</i>	82
4.15	<i>α-Cleavage des PrP^{Δ32-93} existiert und ist bei MCAO ist erhöht</i>	84
4.16	<i>β-Cleavage bei AS 88/89 : PrP^{Δ32-93} unterläuft keiner β-Cleavage</i>	85
5	Zusammenfassung	87
6	Literaturverzeichnis	89
7	Danksagung	103
8	Anhang	104
8.1	<i>Histologische Schittprotokolle</i>	104
8.2	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	110

1 Einleitung

Das zelluläre Prionprotein (PrP^{C}) ist ein in jeder untersuchten Spezies konstitutiv exprimiertes Protein. Die physiologische Funktion ist noch nicht aufgeklärt - es gibt jedoch aus der Pathophysiologie Evidenzen für eine Rolle in der Neuroprotektion. Entdeckt wurde das Protein 1982 in Zusammenhang mit den Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (synonym Prionkrankheiten), bei denen von einer Dysfunktion durch autokatalytische Konformationsänderung des PrP^{C} zu PrP^{Sc} ausgegangen wird. Dies führte zum Begriff Prion (proteinaceous infectious agent) als neue Erregerklasse, die anders als klassische Krankheitserreger kein Erbgut besitzt (Prusiner, 2001). Im Folgenden wird zunächst auf diesen geschichtlichen Hintergrund eingegangen, anschließend werden die besonderen Eigenschaften des PrP^{C} beleuchtet und schließlich dessen mögliche Funktionen und Reaktionen unter dem Aspekt der Neuroprotektion dargestellt.

1.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE)

1.1.1 Definition

TSE sind seltene degenerative und letal endende Erkrankungen des Zentralen Nervensystems, die Menschen und Tiere befallen. Der Ursprung des Auslösers PrP^{Sc} ist unbekannt (Colchester and Colchester, 2005). In der Biologie ist die Krankheitsgruppe einzigartig, da sie erblich (autosomal dominant), sporadisch sowie infektiös und speziesübergreifend auftreten kann (Kretzschmar and Feiden, 2002). Namen gebendes histologisches Merkmal sind schwammartige („spongiforme“) Veränderungen mit konfluierenden Vakuolen im Neuropil, begleitet von Ablagerungen, die als Plaques imponieren können. Wie andere degenerative Gehirnerkrankungen sind Prionkrankheiten begleitet von Nervenzellverlust und astrozytärer Gliose. Eine Entzündungsreaktion fehlt (Aguzzi, 2003). Aufgrund unterschiedlicher Befallsmuster verschiedener Hirnregionen haben Prionkrankheiten variable klinische Phänotypen. Allen gemeinsam ist die Latenz und die Letalität. Die klinische Verdachtsdiagnose wird unterstützt durch neuroradiologische Befunde, EEG-Ableitungen oder Liquoranalysen, kann jedoch letztlich nur (post mortem) histologisch gesichert werden.

1.1.2 TSE der Tiere

Unter den tierischen Formen waren die Traberkrankheit (Scrapie) der Schafe und der „Rinderwahnsinn“ (Bovine Spongiforme Enzephalopathie, BSE) epidemiologisch und wirtschaftlich am bedeutsamsten. Die Traberkrankheit ist seit über 250 Jahren bekannt (Leopoldt, 1759). Im Verlauf entwickeln die Schafe ein unkoordiniertes „trabendes“ Gangbild und Juckreiz, der über ständiges Kratzen („to scrape“) zu Wollschäden führt (Bulgin and Melson, 2007). Das Krankheitsbild BSE der Rinder hingegen ist geprägt von Schreckhaftigkeit und Ataxie. In Großbritannien wurde 1986 der erste BSE-Fall berichtet (Wells et al., 1987). 2001 verbreitete sich die Krankheit seuchenartig weltweit. Als auslösend gilt eine Kontamination des Tiermehls, zu der es durch Lockerung der Herstellungsvorschriften 1972 kam (Ricketts, 2004). Seit 2001 ist in der EU die Beifütterung von Tiermehl verboten (<http://www.bmelv.de>). TSE wurden auch bei anderen Nutz- und Haustieren sowie Zootieren beobachtet (Kirkwood et al., 1990; Wyatt et al., 1991).

1.1.3 TSE des Menschen

1920 wurde die CJD erstmals von den Neurologen Hans Creutzfeldt und Alfons Jakob als „spastische Pseudosklerose“ beschrieben (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921). In 85 % der Fälle ist die Ätiologie unbekannt (sporadische CJD) (Prusiner, 1991). Ca. 10 % sind hereditär (familiäre CJD). Es wurden verschiedene Mutationen des Prionprotein-Gens „Prnp“ auf Chromosom 20 identifiziert (Gambetti et al., 2003). Äußerst selten kam es zur iatrogenen Übertragung durch kontaminierte Instrumente, Hornhauttransplantation oder Therapie mit aus Leichenhypophysen extrahierten Wachstumshormonen (Brown et al., 1992). Unter CJD-Erkrankten finden sich > 90 % homozygote Genträger (Normalbevölkerung: 50 %) des Prnp-Codons 129, das polymorph für die Aminosäure Methionin oder Valin codiert. Es scheint hier einen Suszeptibilität steigernden oder modifizierenden Effekt auf die Entstehung der CJD zu geben (Mead, 2006). Die klassische (sporadische) CJD ist gekennzeichnet durch späten Beginn um das 60. Lebensjahr mit unbestimmtem Prodromalstadium, später durch progressive Demenz und Myoklonien, Ataxie, pyramidale oder extrapyramidale Dysfunktionen im Endstadium. In 70% der Fälle vergeht bis zum Eintritt des Todes ein halbes Jahr (Cali et al., 2006). Mit dem Auftreten einer neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD) 1996 musste auch eine Übertragung der BSE auf den Menschen als höchstwahrscheinlich angenommen werden (Beghi et al., 2004; Caramelli et al., 2006). Patienten mit nvCJD sind bei Beginn ihrer Erkrankung jünger (um das 30. Lebensjahr) und der Verlauf ist mit 14 Mona-

ten etwas länger (Collins et al., 2006). Von nur mehr historischem Interesse ist „Kuru“, eine frühe Form menschlicher übertragbarer Prionerkrankungen. Mitglieder des Stammes der Fore in Papua Neu Guinea infizierten sich durch Verzehr der Gehirne Verstorbener (Gajdusek and ZIGAS, 1957). Zu den hereditären TSE gehören das Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom (GSS) (Gerstmann et al., 1936) und die Letale Familiäre Insomnie (Lugaresi et al., 1986) mit zugeordneten Mutationen (Collins et al., 2001). Das GSS kommt in einem Durchschnittsalter von 45 Jahren zum Ausbruch und zeigt lange Verläufe (Liberski and Budka, 2004). Bei der Letalen Familiären Insomnie stehen medikationsresistente Schlaflosigkeit und Störungen des vegetativen Nervensystems im Vordergrund (Montagna, 2005). Es sind noch andere deutlich seltenere Mutationen im Gen des Prionproteins bekannt, auf die aber hier nicht näher eingegangen werden soll.

1.2 Die Isomere PrP^C und PP^{Sc}

Seit den 1950er Jahren wurde ein gemeinsamer Pathomechanismus der Spongiformen Enzephalopathien vermutet (Hadlow, 1959). Die Infektiösität von Scrapie war bereits 1936 bekannt (Cuille and Chelle, 1936), 1961 gelang die speziesübergreifende Übertragung auf die Maus (Chandler, 1961). Menschen infizierten sich mit diesem Stamm nicht, es wurden so genannte Speziesbarrieren angenommen (Moore et al., 2005). Innerhalb der Primaten gelangen jedoch Infektionen von Schimpansen durch intrazerebrale Inokulation von an CJD erkrankten humanen Gehirns (Gibbs, Jr. et al., 1968). Man postulierte zunächst als Auslöser der langsam verlaufenden Erkrankungen ein allen Spezies gemeinsames „slow virus“ (Sigurdsson, 1954). Die Infektiösität von Hirnextrakten erwies sich jedoch als resistent gegenüber Nukleinsäure modifizierende Verfahren. Weil Protein zerstörende Reagenzien zur Inaktivierung führten, wurde schließlich ein Agens aus Aminosäuren vermutet. Es stellte sich nun die Frage, wie sich das Agens entgegen des molekularbiologischen Dogmas (Crick, 1970) ohne Genmaterial replizieren könnte (Alper et al., 1967). Der Neurologe Stanley Prusiner formulierte die Hypothese eines autokatalytisch aktiven Prion (proteinaceous infectious agent) als neue Erregerklasse (Prusiner, 1998). Das gesuchte Prion Protein (PrP) war aufgrund seiner besonderen Resistenz gegen den Abbau durch die Proteinase K zu isolieren: das „PrPres“ (Proteinase K resistent) zeigte ein Molekulargewicht von 27-30 KDa (Bolton et al., 1982). Das dazugehörige Gen Prnp (cDNS-Sonde (Prusiner et al., 1984)) ließ sich überraschender Weise in infiziertem wie in normalem Hirn nachweisen (Chesebro et al., 1985; Oesch et al., 1985). Es wird zunächst als physiologisches „PrP^C“ (cellular) exprimiert. Erst die Bildung

eines Konformationsisomers führt zum pathologischen „PrP^{Sc}“ (Scrapie causing) (Stahl et al., 1993). Der genaue Mechanismus der Umfaltung ist unbekannt. Die Isomere unterscheiden sich in ihren biochemischen Eigenschaften: PrP^{Sc} besitzt überwiegend eine β -Faltblatt-Struktur und kaum α -Helices, bei PrP^C finden sich umgekehrt vor allem α -helikale Anteile und weniger β -Faltblätter (Pan et al., 1993). Aufgrund der amyloidogenen β -Faltblattstruktur akkumuliert PrP^{Sc} (Borchelt et al., 1990) und kann von Proteasen nur zu dem Fragment PrPres hydrolysiert werden (McKinley et al., 1991). PrP^C wird dagegen komplett abgedaut und ist ohne Denaturierung löslich (Oesch et al., 1985).

1.3 Pathophysiologie des PrP^{Sc}

1.3.1 Replikation des PrP^{Sc}

Der Replikationsmechanismus ist noch ungeklärt. Man geht von einer Autokatalyse aus, bei der das infektiöse PrP^{Sc} dem PrP^C seine pathogene Konformation „aufzwingt“. Jedes neu entstandene PrP^{Sc} beginnt seinerseits mit weiteren Umwandlungen. Im Rahmen dieses Prozesses kommt es zur Akkumulation und zum Untergang von Neuronen. Dabei werden zwei Modelle diskutiert, die nach reaktionskinetischen Berechnungen als realistisch gelten (Eigen, 1996): Das Refolding-Modell mit einem intermediären PrP* und einer Verschiebung des Gleichgewichts von PrP^C und PrP^{Sc} (Cohen and Prusiner, 1998), sowie das Nukleationsmodell mit einer amyloiden Anlagerung an einen induzierendem Keim (Lansbury, Jr. and Kosik, 2000).

1.3.2 Hypothese des „Loss“ und „Gain of PrP^C-Function“

Es konnte bislang jedoch nicht endgültig geklärt werden, wie die Entstehung des pathologischen PrP^{Sc} zum Nervenzelluntergang führt. Eine These, die mit der postulierten neuroprotektiven Funktion des physiologischen PrP^C vereinbar ist, stellt den so genannten „Loss of Function“ bei der Bildung von PrP^{Sc} dar. Jedoch entwickeln sich Tiere mit einem knock-out des Prnp weitgehend normal. Die neuroprotektive Funktion scheint also nicht von substantieller Bedeutung zu sein oder kann von anderen Mechanismen übernommen werden (Bueler et al., 1992). Wie für andere neurodegenerative Erkrankungen, z.B. M. Alzheimer, gibt es auch eine andere Hypothese, den „Toxic Gain of Function“, bei der akkumulierende Proteinaggregate eine von der physiologischen Funktion des Proteins unabhängige toxische Aktivität entwickeln. PrP^{Sc}-Aggregate könnten z.B. auf diese Weise den axonalen Transport blockieren oder

mit synaptischer Transmission interferieren. Prnp-knock-out-Tiere zeigen jedoch sogar bei intrazerebraler Inokulation hoher Dosen von PrP^{Sc} nicht die erwartete Neurodegeneration, d.h. von PrP^{Sc} per se geht offensichtlich keine wesentliche neurotoxische Wirkung aus (Bueler et al., 1993). Es kann daher diskutiert werden, dass entweder ein Funktionsverlust bei der Bildung des PrP^{Sc} entsteht, der unter normalen Labor- und Lebensbedingungen nicht von Bedeutung ist, oder während des Vorgangs der Heteromerisierung des PrP^C zum PrP^{Sc} eine toxische Wirkung entsteht, wobei das große Aggregat einen inerten Residualzustand darstellt. Angesichts der Expression des PrP^C in allen untersuchten Spezies und der hohen Konservierung des Gens (s.u.) wäre es zumindest nahe liegend, dass dem PrP^C eine grundlegende Bedeutung zukommt, die den evolutionsbiologischen Nachteil einer fatalen Prionerkrankung aufwiegt.

1.4 Das zelluläre Prionprotein

PrP^C findet sich bei allen untersuchten Vertebraten vom Hamster bis hin zum Kugelfisch (Suzuki et al., 2002). Das bedeutet einen frühen stammesgeschichtlichen Ursprung und eine hohe evolutionäre Konservierung des PrP^C-Gens „Prnp“ (Westaway and Prusiner, 1986). Die Prionproteine der Säugetiere sind > 90% homolog in Sequenz und Struktur (Lysek et al., 2005). So kann das im Folgenden beschriebene PrP^C der Maus – ein in der Prionforschung gut untersuchtes Versuchstier – als stellvertretend für andere Spezies betrachtet werden.

1.4.1 Prnp und Prnd

Das murine PrP^C ist auf dem relativ einfachen single-copy-Gen Prnp in 3 Exons, getrennt von 2 Introns, auf Chromosom 2 kodiert. ORF (open reading frame) ist das Exon am 3'-Ende, die Introns werden nicht translatiert, womit alternatives Spleißen ausgeschlossen ist (Westaway et al., 1991). Das Prnp wird ubiquitär von jeder Zellart exprimiert. In Korrelation mit der klinischen Manifestation der TSE findet sich das mit Abstand höchste m-RNA-Niveau in Neuronen des ZNS und im Lymphgewebe, die peripheren Organe zeigen eine 20-50-fach niedrigere Expressionsrate (Kretzschmar et al., 1986a; Ning et al., 2005). Das Gehirn enthält 3-5 µg PrP^C / g Gewebe (Moudjou et al., 2001), absolut macht PrP^C jedoch weniger als 0,1 % der Gesamtproteinmasse des ZNS aus (Turk et al., 1988). Das Prnp hat auf demselben Chromosom ungefähr 16 Kilobasen entfernt eine zu ca. 25 % homologe Kopie, genannt „Prnd“. Prnd kodiert für die N-terminal verkürzte PrP^C-Version „Doppel“ (*downstream prion protein like element*), die vorwiegend in Herz und Hoden, jedoch nicht in Neuronen exprimiert wird (Sil-

verman et al., 2000). Die Funktion ist nicht geklärt, männliche Mäuse ohne Doppel sind steril (Behrens et al., 2002).

1.4.2 Biosynthese des PrP^C

Wie bei den meisten sekretorischen Proteinen beginnt die Synthese des 254 Aminosäuren (AS) umfassenden PrP^C-Präproteins an zytosolischen Ribosomen mit der Translation einer N-terminalen Signalsequenz von 22 AS. An diese kann ein sogenanntes „signal recognition particle“ binden und über Interaktion mit seinem Rezeptor sowie einer Translokationspore den Ribosom-Peptid-Komplex in das raue endoplasmatische Retikulum importieren. Dort wird die Signalsequenz abgespalten (Hope et al., 1986). Während der Translation werden optional und abhängig vom Redoxstatus n-glykosidisch Oligosaccharide an Asparagin in Position 181 und 197 angehängt. Diese Core-Glykane hängen an einer intramolekularen Schleife, gebildet durch eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen in Position 179 und 214 (Kretzschmar et al., 1986b; Stimson et al., 1999). Nach Beendigung der Elongation wird ein C-terminales Peptid hinter Serin in Position 231 abgespalten und durch einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) ersetzt (Stahl et al., 1992). Bei der im Golgi-Apparat posttranslational fortgeführten Modifikation werden GPI-Anker und Core-Glykane weiter mit komplexen Zuckerketten charakteristisch für Spezies und Zellart ausgestattet (Haraguchi et al., 1989; Hooper, 2005). Nicht immer sind beide N-Glykosylierungsstellen besetzt, darüber hinaus können die Zuckerketten unterschiedliche Längen haben (Caughey et al., 1989). Daher bildet sich das native PrP^C in der Masse auf dem Immunoblot als breit „verschmierte“ Bande (smear) zwischen 27-37 kDa ab. Nach enzymatischer Deglykosylierung mit PNGase F (Plummer, Jr. and Tarentino, 1991) kann das Molekulargewicht exakter bestimmt werden und beträgt 27-29 kDa (Haraguchi et al., 1989). Vereinzelt kommen Hydroxylierung (Gill et al., 2000) und / oder Phosphorylierungen (Negro et al., 2000) des PrP^C vor. Der GPI-Anker und eine spezielle N-terminale Domäne signalisieren den vesikulären Transport des fertig prozessierten Proteins, schematisch dargestellt in Abbildung 1, vom Golgi-Apparat zur Zellmembran (Walmsley et al., 2003).

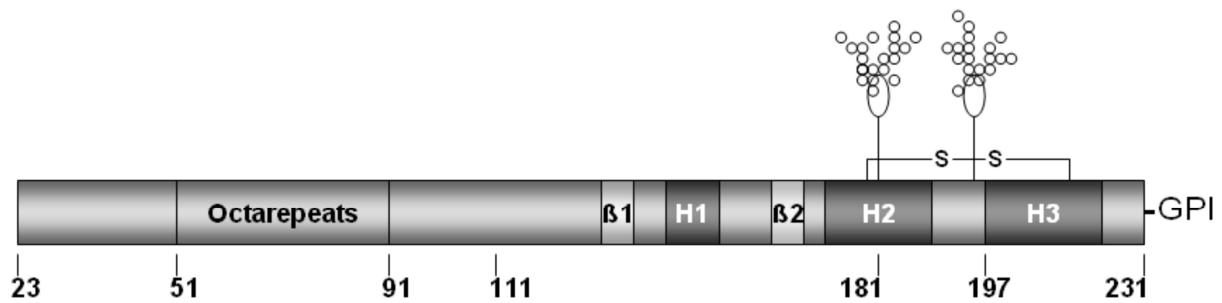


Abbildung 1: PrPC-Volllänge mit posttranslationalen Modifikationen (schematisch) Das N-terminale Fragment (AS 23-120) ist frei beweglich enthält die Oktarepeat-Region (AS 51-90). Der strukturierte C-terminale Teil (AS 121-231) gliedert sich in drei α -Helices (H1-3) und zwei antiparallele β -Faltblätter (β 1, β 2). H2 und H3 sind verbunden durch eine Disulfidbrücke (S-S) zwischen Cystein 179 und 214. Das fertig prozessierte PrPC (AS 23-231) besitzt zwei variabel glykosylierte Core-Glykane an Asparagin 181 und 197 sowie C-terminal einen Glykosyl-Phosphatidylinositol-Anker (GPI).

1.4.3 Topologie des PrP^C

Zu über 55% integriert sich PrP^C mit dem GPI-Anker in cholesterin- und cerebrosidreiche „raft“-Domänen der Membranaußenseite (Naslavsky et al., 1997). Neben dieser vorherrschenden sekretorischen Form (secPrP^C) gibt es noch zwei transmembrane Varianten: zum einen das ebenfalls an der Außenseite GPI-verankerte CtmPrP^C (35%, C-terminal transmembrane), das jedoch in einer lipophilen Schleife mit der N-terminalen Domäne wieder nach intrazellulär eintaucht; zum anderen das N-terminal nach extrazellulär zeigende NtmPrP^C (15%, N-terminal transmembrane) mit einer lipophilen Transmembrandomäne (AS 111-134) ohne GPI-Anker (Kim et al., 2001; Roucou et al., 2004). Diese Lokalisation spiegelt sich in der Sensitivität gegenüber Phospholipase C, die das PrP^C aus dem Membranverbund herauslösen kann (Griffoni et al., 2003).

1.4.4 Struktur des PrP^C

Als Modell gilt die mit der NMR (nuclear magnetic resonance) Spektroskopie bestimmte Struktur von rekombinantem PrP aus *Escherichia coli* (siehe Abbildung 2). Dabei muss die Einschränkung gemacht werden, dass diesem Glykosylierungen sowie GPI-Anker fehlen und die Untersuchung nicht unter natürlichen Bedingungen des geweblichen Milieus durchgeführt werden konnte. Am Aufbau des PrP werden zwei Bereiche unterschieden: ein ungefaltetes, frei bewegliches Polypeptid N-terminal (AS 23-120) und eine hoch strukturierte Domäne C-

terminal (AS 121-231). Etwa die Hälfte (AS 51-91) des N-terminalen Teils nimmt die „Okta-repeat-Region“, eine sich wiederholende Sequenz von acht AS (Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln), ein. Der C-terminale Teil setzt sich aus drei α -Helices und zwei antiparallelen β -Faltblättern, die die erste kleine Helix A einfassen, zusammen. Dieser strukturierte Teil des PrP hat mit den β -Faltblättern und der Disulfidbrücke zwischen Helix B und C einen relativ rigiden lipophilen Kern (Riek et al., 1997).

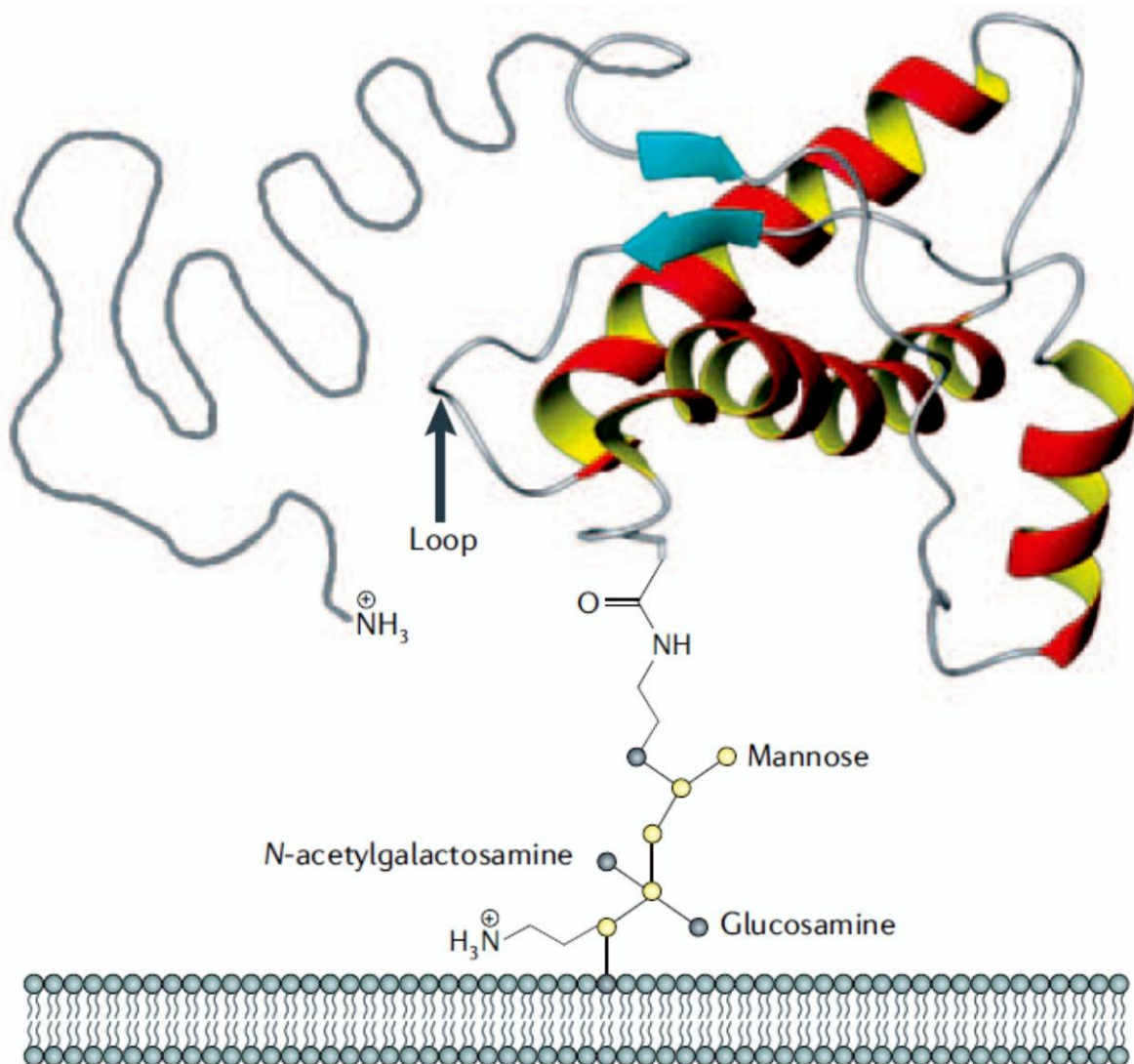


Abbildung 2: Tertiäre Struktur des zellulären Prionproteins (schematisch) Das PrP^c der Säugetiere besitzt folgende Grundstruktur: ein frei bewegliches Polypeptid N-terminal (AS 23-120) sowie eine hoch strukturierte Domäne C-terminal (AS 121-231) mit drei α -Helices und zwei antiparallelen β -Faltblättern. C-terminal ist es mit einem GPI-Anker in die äußere Zellmembran integriert (Aguzzi and Heikenwalder, 2006).

1.4.5 Stoffwechsel und Spaltungsprodukte

Etwa 10 % des fertig prozessierten PrP^C wird durch eine an der Membran lokalisierte Phospholipase innerhalb des GPI-Ankers gespalten und aus dem Membranverbund herausgelöst (Caughey, 1991). Der Großteil des PrP^C bleibt membranständig und geht mit einer Halbwertszeit von ungefähr 5 h (Borchelt et al., 1990) den regulären Weg der Membranproteine über Endozytose in Clathrin-coated-pits zum Abbau in Endolysosomen (Taylor and Hooper, 2007). Über 90 % des endozytierten PrP^C rezirkulieren. Während jeder Passage werden etwa 5 % durch proteolytische Spaltung degradiert (Harris et al., 1993). Man nimmt an, dass diese Prozessierung in aziden endosomalen Kompartimenten während Endozytose und Rücktransport zur Zellmembran stattfindet (Laffont-Proust et al., 2005). Wie schematisch in Abbildung 3 dargestellt, entstehen zwei größere Spaltprodukte: C1 (α -Cleavage) und C2 (β -Cleavage) mit korrespondierenden N-terminalen Fragmenten N1 und N2. In gesundem Nervengewebe findet vor allem die α -Cleavage statt, mit Spaltstelle an Aminosäure-Position 110 / 111 (Chen et al., 1995). Das korrespondierende N1-Fragment wird nach extrazellulär abgegeben (Vincent et al., 2000). Die Spaltstelle der β -Cleavage wird nahe der Oktarepeat-Region vermutet und in dieser Arbeit noch näher eingegrenzt. Mittels enzymatischer Deglykosylierung durch PNGase F lassen sich die C-terminalen Fragmente nachweisen. Das deglykosylierte C1-Fragment mit Molekulargewicht 16 kDa ist wie die Volllänge komplex glykosyliert und bleibt mit GPI-Rest in raft-Domänen der Zellmembran verankert (Laffont-Proust et al., 2006). Es ist wie die Volllänge hitzestabil. Sein isoelektrischer Punkt (pI) ist relativ sauer (C1 pH 6,0; PrP^C pH 7,8), da mit der N-terminalen Domäne ca. 10 basische AS fehlen (Chen et al., 1995). C2, das größere Spaltprodukt der β -Cleavage, zeigt sich im Immunoblot als zarte Bande bei 20 kDa (deglykosyliert). Mit längerer N-terminaler Domäne als C1, d.h. mehr basischen AS, wandert es in der zweidimensionalen Gelelektrophorese zwischen C1 und PrP^C. Potentielle spaltende Proteinasen der α -Cleavage könnten Metalloproteasen wie ADAM10 und TACE darstellen (Vincent et al., 2001). Die β -Cleavage könnte auch durch freie Radikale und abhängig von Kupfer ausgelöst werden (McMahon et al., 2001).

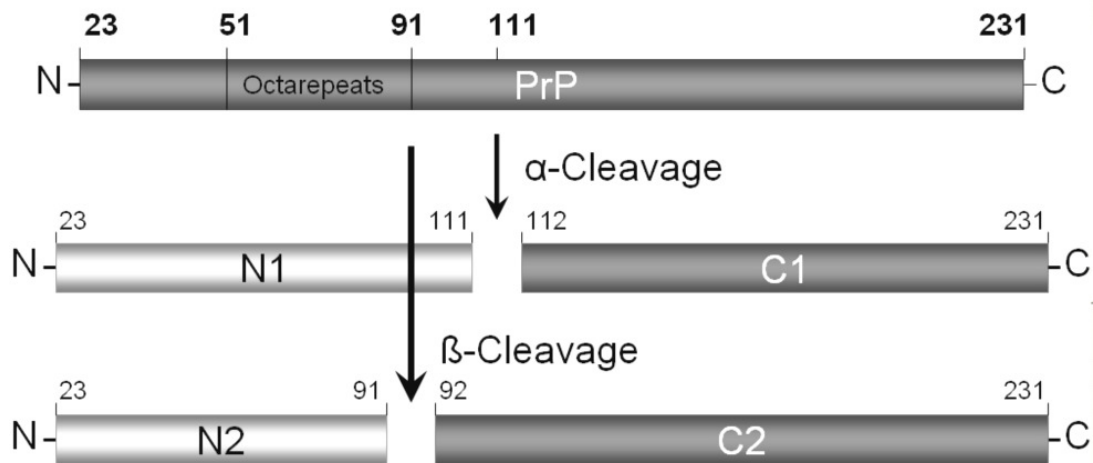


Abbildung 3: Spaltung des zellulären Prion-Proteins Dargestellt sind die Spaltprodukte der PrP^C- α - und β -Cleavage. Die Spaltstelle der α -Cleavage befindet sich zwischen den Aminosäuren Histidin in Position 111 und Methionin in Position 112. Die Spaltstelle der β -Cleavage ist entsprechend bisherigen Angaben hinter der Oktarepeat-Region (AS 51-91) angegeben (Mange et al., 2004).

1.5 Potentielle Funktionen des zellulären Prionproteins

Die Interpretation bisheriger Daten deutet auf eine komplexe Beteiligung des PrP^C in Neuroprotektion, synaptischer Übertragung und zellulären Signalwege verschiedenster Funktionsbereiche hin (Griffoni et al., 2003). Bedeutende Studien zur Funktionsbestimmung des PrP^C wurden an transgenen Mäusen mit Überexpression, Deletion oder komplettem knock-out des Gens Prnp durchgeführt.

1.5.1 Prnp-knock-out

Bis auf geringfügige verhaltensbiologische Unterschiede im zirkadianen Rhythmus (Tobler et al., 1996) und Lernfähigkeit (Nishida et al., 1997) zeigten die PrP^{0/0}-Mäuse „Zürich I“ und „Edinburgh“ unter normalen Bedingungen einen unauffälligen Phänotyp (Bueler et al., 1992; Manson et al., 1994). Als möglichen Kompensationsmechanismus nimmt man ein PrP^C-Homolog π an, das die Funktion des PrP^C bis zu einem gewissen Grad übernehmen könnte. Andere PrP^{0/0}-Linien wie Nagasaki, Zürich II oder Rikn zeigten letale Ataxien (Yokoyama et al., 2001). Wie man inzwischen weiß, waren diese nicht auf die Abwesenheit des Prnp zurückzuführen, sondern es kam bei über das ORF hinausreichenden Deletionen zu ektopter Doppel-Expression, die per se neurotoxisch wirkte (Moore et al., 1999). In Doppel exprimieren-

den Zellen hätte solch ein PrP^C-Homolog π eine niedrigere Affinität zu funktionellen Liganden (Flechsig and Weissmann, 2004).

1.5.2 Interaktionspartner und Signalwege

Die hohe Rezirkulationsrate des PrP^C legte zunächst eine mögliche Funktion als membrangebundener Rezeptor nahe (Shyng et al., 1993). Ein Ligand konnte jedoch bisher nicht gesichert werden. Es wurde allerdings eine Reihe so genannter PrP^C-Bindungspartner (PCBP) identifiziert, für die physiologische Relevanz etwaiger Interaktionen besteht jedoch noch Klärungsbedarf (Chen et al., 2003). Einige favorisierte Interaktionen werden nachfolgend kurz dargestellt: Durch extrazelluläre Interaktion wie mit dem Matrixprotein Laminin könnte PrP^C zusätzlich in Zelladhäsion und -migration sowie axonale Regeneration involviert sein (Martins et al., 2001). Es gibt zudem Hinweise, dass PrP^C als Bestandteil von raft-Domänen auf darin organisierte Signal-Proteine Einfluss nehmen könnte: in Zellkultur aktivierte es nach Antikörper vermittelter Vernetzung zusammen mit Caveolin-1 die Thyrosin-Kinase Fyn (Mouillet-Richard et al., 2000). Diese setzt durch Phosphorylierung der ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) zelluläre Signalkaskaden in Gang. Transkriptionsfaktoren, Proteine des Zellzyklus, Apoptose-Regulatoren, Elemente des Zytoskeletts gehören zu den über 160 bekannten Substraten dieser Kaskaden (Yoon and Seger, 2006). Das Stress-inducible-protein-1 (STI-1) vermittelt über Phosphorylierung der ERK 1/2 Proteinkinase Neuritogenese. In hippocampalen Neuronen mit rekombinantem STI-1 konnte gezeigt werden, dass die Auslösung dieses Signalwegs abhängig von PrP^C-Expression und -Bindung ist (Lopes et al., 2005). Nach Bindung des PrP^C an das STI-1 konnte der aktivierte Proteinkinase A / cAMP Signalweg retinale Explantate von Ratten gegen Zelltod schützen (Zanata et al., 2002).

1.5.3 PrP^C schützt vor Bax-vermittelter Apoptose

Die Beteiligung des PrP^C während der Induktion des programmierten Zelltodes stellt eine gesonderte Form der Interaktion dar. Untersuchungen zeigten, dass hippocampale Neurone von Prnp-knock-out-Mäusen verglichen mit dem Wildtyp auf Serumdeprivation bzw. oxidativen Stress verstärkt mit Apoptose reagierten (Kuwahara et al., 1999). Obwohl eine bemerkenswerte Ähnlichkeit der Oktarepeat-Region mit der Bcl-2-Homologie-Domäne (BH2) des pro-apoptotischen Bax und anti-apoptotischen Bcl-2 besteht, wird PrP^C nicht zur Bcl-2-Proteinfamilie gezählt (LeBlanc, 1998). Stattdessen konnte mittels yeast-two-hybrid-System

eine direkte synergistische Interaktion von PrP^C mit Bcl-2 nachgewiesen werden (Kurschner and Morgan, 1995). Ebenso wie die Coexpression des anti-apoptotischen Bcl-2 mit Bax schützt in Zellkultur eine PrP^C-Coexpression offensichtlich vor der Bax-vermittelten Apoptose (Bounhar et al., 2001). Die anti-apoptotische Aktivität des PrP^C inhibiert weiterhin die Freisetzung von zytotoxischem Cytochrom C beim Bax-vermittelten mitochondrialen apoptotischen Pathway (Kim et al., 2004). Das molekulare Target hierbei ist jedoch noch unbekannt. Möglich wäre eine getriggerte Supprimierung des Bax über eine der oben beschriebenen ERK 1/2 oder Proteinkinase A Signalkaskaden. Man nimmt an, dass für die anti-Bax-Wirkung die N-terminale Domäne von besonderer Bedeutung ist (s. u.).

1.5.4 Essentielle Rolle der N-terminalen Domäne für die Funktion des PrP^C

Neben Prnp-knock-out-Mäusen wurden weitere transgene Tiere zur Untersuchung der für die potentielle Funktion essentiellen Abschnitte des Proteins gezüchtet. Mäuse mit N-terminalen Deletionen (Δ PrP), insbesondere solchen der hoch konservierten kupferbindenden Oktapeptid-Region, zeigten eine reduzierte anti-apoptotische Wirkung ihres Δ PrP (Bounhar et al., 2001). Offensichtlich wiesen sie wie knock-out-Tiere auch erhöhte Spiegel von „reactive oxygen species“ (ROS) auf, die von manchen Autoren auf eine dem Enzym Superoxiddismutase ähnliche Aktivität des PrP zurückgeführt wurden (Brown et al., 1999; Sakudo et al., 2006). Ein experimentell an die Zellmembran fixierter und damit wahrscheinlich inaktiver N-terminaler Domäne führte ebenfalls zu erhöhten zerebralen ROS-Spiegeln und gesteigerter Empfindlichkeit gegenüber Kupferionen (Zeng et al., 2003). Andererseits steigerten zusätzlich eingefügte Oktapeptide die Kupfer-Bindung und anti-apoptotische Wirkung nicht, sondern manifestierten sich als toxische Mutationen (Leliveld et al., 2006). Wurden die Volllänge versus einem N-terminal deletiertem Prnp in Doppel-exprimierenden Mäusen der Null-Linie Nagasaki transgen eingeführt, konnte das Δ PrP nicht vor der Neurodegeneration bewahren (Atarashi et al., 2003). Bislang ist noch nicht geklärt, ob und welche Reaktionen des PrP^C für eine anti-apoptotische Wirkung von Bedeutung sein könnten. Zumindest legen diese und eine Vielzahl ähnlicher Untersuchungen nahe, dass die neuroprotektive Funktion des PrP^C in der hoch konservierten Oktapeptidregion der N-terminalen Domäne zu suchen ist.

1.5.5 PrP^C und Kupfer

Eine besondere Eigenschaft des N-terminalen Abschnittes des PrP^C ist die selektive Affinität zu Kupfer. Ein PrP^C-Molekül bindet abhängig vom pH-Wert bis zu fünf Kupferatome (Brown et al., 1997). Ob allerdings die Bindung direkte Auswirkungen auf den Kupferhaushalt und die Endozytose des PrP^C hat (Pauly and Harris, 1998) bleibt fraglich. PrP^C scheint zumindest angesichts seiner hohen Rezirkulationsrate und deren Abfall bei Mutation der kupferbindenden Oktarepeats mit in den Kupferhaushalt involviert zu sein (Perera and Hooper, 2001). Kupfer ist als Redox-Übergangselement Bestandteil vieler Enzymsysteme und kann in höherer Konzentration eine oxidative Wirkung entfalten (Bush, 2000). Tatsächlich zeigten Prnp-knock-out-Mäuse eine größere Vulnerabilität gegen Kupfertoxizität und damit verbundenen oxidativen Stress (Brown et al., 1998). Eine Modulation des in der Bekämpfung von oxidativem Stress zentralen Cu-Proenzym Superoxid-dismutase (SOD) durch PrP^C wird unterschiedlich diskutiert (Brown et al., 1997b; Kretzschmar et al., 2000; Rachidi et al., 2003). Einige Autoren nehmen an, dass in der Oktarepeat-Region des PrP^C eine eigene „SOD-like“-Aktivität sowie Gluthation-Reduktase-Aktivität von Bedeutung ist (Brown et al., 1999; Rachidi et al., 2005; White et al., 1999). Ergänzend ist auch an die kupferabhängige Katalyse eines anderen Reaktionskomplexes zu denken.

1.5.6 Einfluss des PrP^C auf die synaptische Übertragung

Die Rolle des vorwiegend synaptisch lokalisierten PrP^C in der Neurotransmission ist noch nicht geklärt (Fournier et al., 2000). Es gibt starke Evidenz, dass das PrP^C in die synaptische Transmission und Langzeitpotenzierung involviert ist (Collinge et al., 1994). Die synaptische Übertragung scheint desweiteren von der PrP^C-Expressionsstärke abhängig zu sein (Carleton et al., 2001). Bei Prnp-knock-out wurden Störungen synaptischer Ströme und Potentiale gefunden (Colling et al., 1996). Als Ursache hierfür wird die nachweisliche Modulation spannungsabhängiger L-Typ-Kalziumkanäle sowie Kalzium-aktivierter Kalium-Kanäle durch das PrP^C diskutiert (Herms et al., 2001; Korte et al., 2003). Diese Veränderungen in der synaptischen Kalzium-Homöostase könnten Beeinträchtigungen von Kurz- und Langzeitgedächtnis sowie bestimmter Lernprozesse, die Prnp-knock-out-Mäuse zeigten, bedingen (Nishida et al., 1997). Die Synapse ist bei der Manifestierung sowohl humaner als auch tierischer Prion-Krankheiten sehr früh betroffen (Liu et al., 2002).

1.5.7 Funktionelle Bedeutung der Spaltprodukte des PrP^C

Über die funktionelle Rolle der Proteolyse des PrP^C weiß man noch wenig. In Zellkultur wurde gezeigt, dass die Generierung der C-terminalen PrP^C-Spaltprodukte – insbesondere die β -Cleavage nahe der kupferbindenden Oktarepeat-Region – durch ROS-Exposition gesteigert werden konnte (McMahon et al., 2001). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Spaltung des PrP^C durch Zugabe eines Chelators divalenter Kationen inhibiert, jedoch nur durch Zugabe der Redox-Übergangselemente Kupfer und Eisen reaktiviert werden konnte (Jimenez-Huete et al., 1998). Es liegt die Vermutung nahe, dass die Spaltung des Proteins weniger einem unspezifischen Prozess des Protein-Katabolismus entspricht, sondern vielmehr eine Bedeutung in der Funktion des PrP^C haben könnte (Chen et al., 2003): Neurone mit Deletion der α -Cleavage-Schnittstelle zeigten unter oxidativem Stress eine verbesserte Überlebensfähigkeit als Wildtyp-Neurone. Es wurde daraus die Hypothese entwickelt, dass das C2-Fragment das biologisch aktive Spaltprodukt darstellen und durch eine schnell nachfolgende α -Cleavage inaktiviert werden könnte. Dies würde zusätzlich die höhere Detektionsrate des C1-Fragments erklären (Mange et al., 2004). Die Spaltstelle der α -Cleavage zwischen Histidin 111 und Methionin 112 befindet sich in der potentiell neurotoxischen amyloidogenen Domäne AS 106-126 des PrP^C (Jobling et al., 1999). Es wurde ferner auch gezeigt, dass in mit PrP^{Sc} infizierten Zellen ein C-terminales PrP^C-Fragment in der Länge des C2-Fragments akkumulierte (Parchi et al., 1999), weshalb die PrP^C-Spaltung auch pathophysiologisch von Bedeutung sein könnte. Die kleineren N-terminalen Spaltprodukte des PrP^C (etwa 9-12 kDa) sind sehr instabil und die Funktion ist unbekannt (Hornemann and Glockshuber, 1996). Inwiefern eines der Spaltungsfragmente oder der Moment der Spaltung an sich funktionell bedeutend ist, bleibt weiter zu untersuchen.

1.6 Neuroprotektive Wirkung des PrP^C in vivo

Oxidativer Stress ist eine der wichtigsten Ursachen für Zelluntergang des ZNS bei Hypoxie (Lehtinen and Bonni, 2006). Die höchsten Konzentrationen erreichen ROS (reactive oxygen species) unter dem hypoxischen Stress einer traumatischen (Lewen and Hillered, 1998) oder ischämischen Schädigung des zerebralen Gewebes (Fotheringham et al., 2000). Eine Vielzahl protektiver und antioxidativer Proteine wird bei gesteigerter zellulärer Antwort auf oxidativen Stress exprimiert (Touzani et al., 2001). Unter anderem wurde auch eine gesteigerte PrP^C-Expression bei Autopsien hypoxischer menschlicher Gehirne beobachtet (Esiri et al., 2000).

Sollte das Prionprotein eine zentrale Rolle in der Neuroprotektion spielen, müssten unter derartigen Hirnschädigungen die PrP^C-abhängigen Effekte deutlich werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden in-vivo-Tierversuchsmodelle zur Erzeugung zerebraler Läsionen durch Schädelhirntraumata (Hoshino et al., 2003) oder fokale Ischämie (McLennan et al., 2004; Vosko et al., 2006) in der Prionforschung etabliert.

1.6.1 Controlled Cortical Impact (CCI)

Die Technik des CCI-Modells erlaubt mittels eines pneumatischen Stoßgeräts die Erzeugung einer gut dosierbaren Traumatisierung des Gehirns. Die grundlegende Studie für weitere Untersuchungen mit CCI-Modellen in der Neurotraumatologie wurde 1991 zunächst an Rattenhirnen durchgeführt. Es wurden die Effekte verschiedener Intensitäten des CCI anhand neurologischer, kardiovaskulärer und histopathologischer Kenngrößen analysiert: die gemessenen technischen Parameter wie Stoßkraft und -geschwindigkeit korrelierten eindeutig mit dem histologischen Ausmaß der Gewebeschädigung und funktionellen Beeinträchtigungen (Dixon et al., 1991). Bei der Maus wurden die Auswirkungen eines CCI später ebenfalls genauer untersucht und vergleichbar aussagekräftige Ergebnisse ermittelt (Zweckberger et al., 2003). Zur Ermessung der Rolle des PrP^C bei einer traumatischen Hirnschädigung verglichen 2003 Hoshino et al. 8 Wochen alte männliche Prnp-knock-out-Mäuse auf C57/BL/6-Hintergrund mit heterologen Prnp+/-0-Littermates. Die Mäuse wurden einem CCI mit einer Intensität von 200 g/cm und 2 mm tiefer Impression des linken parietalen Kortex unterzogen. Vier Wochen nach Kontusion hatten die Prnp0/0-Mäuse signifikant größere Läsionsvolumina und schlechtere Neuroscores als ihre Prnp+/-0-Littermates manifestiert. Immunhistochemische Färbungen des mauseigenen IgG, ein sensitiver Marker für Schädigung von Hirngewebe durch Extravasation, zeigten zudem einen vergleichsweise extensiven Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke bei den Prnp0/0-Mäusen (Hoshino et al., 2003).

1.6.2 Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO)

Auch die Effekte zerebraler Ischämie durch experimentelle Okklusion der A. cerebri media mit und ohne Reperfusion sind gut dokumentiert (Hata et al., 1998). Bei der Maus wurde die Entwicklung der Infarktgröße abhängig von Ischämiedauer und verschiedenen postischämischen Reperfuionszeiten sowie das histologische Ausmaß des mikrovaskulären Schadens genauestens untersucht: kurze Ischämie (1 h) mit langer Reperfusion (24 h) verursachte weit-

aus größere Infarkte als schwere Ischämie (3 h) ohne Reperfusion. Die ischämische Region zeigte bei ersterem eine hoch signifikante Reduktion der Gefäßdichte und Kollagen-Typ-IV Immunoreaktivität auf: < 28 % verglichen mit der kontralateralen Hemisphäre. Am ausgeprägtesten waren die Basalganglien von der mikrovaskulären Schädigung betroffen (Vosko et al., 2006). In der Prionforschung fand das Modell einer MCAO erstmalig 2004 Anwendung: McLennan et al. untersuchten Hirne ausgewachsener männlicher 129/Ola Prnp^{+/+}, 129/Ola PrP^C0/0 sowie heterozygoter 129/Ola Prnp^{+/-} Mäuse 24h nach Elektrokoagulation der linken MCA (Permanente Okklusion ohne Reperfusion). Schein- und nicht operierte Maushirne dienten als Kontrolle. Prnp0/0-Mäuse zeigten verglichen mit dem Wildtyp einen extensiven Neuronenverlust. Bei Prnp^{+/+} und Prnp^{+/-} wies die Infarktzone keine, die Penumbra subletal geschädigter Neurone dagegen die stärkste PrP^C-Immunoreaktivität auf. Bei allen ischämischen Hirnen wurde die Läsionsfläche in 500 µm-Schnittstufen mit Hilfe einer semi-automatischen Software analysiert und um die Volumenzunahme durch das Hirnödem korrigiert. Es konnte objektiviert werden, dass Prnp0/0-Mäuse signifikant größere ischämische Läsionsvolumina als der Wildtyp aufwiesen. Zusätzlich wurden bei Kontrolltieren jedes Genotyps der Circulus Willisi und die beiden MCA mit Latex-Tinte dargestellt, um Vaskularisationsvariabilitäten auszuschließen (McLennan et al., 2004).

Die Ergebnisse beider Versuchsmodelle deuten darauf hin, dass neuronale Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Stress und respektive eine neuronale Gewebsschädigung von der PrP^C-Expression abhängig ist.

1.7 Zielsetzung

Aus den bisherigen Studien lässt sich eine neuroprotektive Rolle des exprimierten PrP^C ableiten, welche in vivo besonders bei kritischen Bedingungen wie dem oxidativem Stress unter Trauma oder Ischämie deutlich wird. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung einer Spaltung des PrP^C, die von äußeren Stressbedingungen abhängig zu sein scheint und eine funktionelle Modifikation des PrP^C darstellen könnte. In dieser Arbeit sollen daher die Spaltungsprodukte des PrP^C unter solchen Bedingungen in vivo näher untersucht werden. Basierend auf den Ergebnissen von Hoshino et al. (2003) sowie McLennan (2004) wurde vom Zentrum für Neuro-pathologie und Prionforschung (LMU) das Projekt „Zerebrales Trauma und ischämischer Insult im Mausmodell“ in Kooperation mit dem Institut für chirurgische Forschung (LMU, Ar-

beitsgruppe Prof. Dr. med. Plesnila) und der Neurologischen Klinik (LMU, Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Hamann) initiiert. Als Teil dieses Projekts beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Spaltung des PrP^C in vivo unter den ischämischen Versuchsbedingungen. Zunächst soll dazu an Littermates von Wildtyp-, Prnp-knock-out-Mäusen und transgenen Mäusen mit Deletion der für die neuroprotektive Funktion als relevant erachteten Oktarepeat-Region (PrP Δ 32-93) die Ausdehnung der Läsion untersucht, bzw. nachvollzogen werden. Darauf aufbauend soll nun die Auswirkung des Schadens hinsichtlich PrP-Expression und Veränderung der Spaltung im Vergleich mit schein- und unbehandelten Kontrollmäusen untersucht werden. In Zellkulturen konnte bereits gezeigt werden, dass unter oxidativem Stress vermehrt die N-terminal verkürzten PrP^C-Spaltprodukte C1 und C2 auftreten (Watt et al., 2005). Viele der in vitro gewonnenen Erkenntnisse konnten aber im Tiermodell noch nicht weiterführend untersucht werden. Für die Experimente wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, isolierte Hirnschnittareale einer Westernblot-Analyse zu unterziehen. In einer densitometrischen Auswertung der Immunoblots soll die Expression der Proteinvolllänge sowie des C1-Spaltprodukts von PrP^C und PrP Δ 32-93 quantitativ und in Referenz zum stabilen Zytoskelettmarker β -Aktin analysiert werden. Dabei werden die Proteinexpression in ipsi- und kontralateraler Hemisphäre sowie bei MCAO zusätzlich im nekrotischen Infarktareal verglichen. Anschließend soll untersucht werden, inwieweit das PrP Δ 32-93 einer β -Cleavage unterläuft und ob die Region der Spaltung näher eingegrenzt werden kann.

2 Material und Methoden

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

Die Tierzucht wurde im Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, LMU München, unter der Leitung von Dr. med. vet. Mitteregger durchgeführt.

Der operative Teil des Projektes wurde von folgenden Kooperationspartnern durchgeführt:

Von Herrn Prof. Dr. med. Plesnila und den Dres. med. Ardeshiri (mit Arbeitsgruppe), Institut für Chirurgische Forschung (LMU), wurden Maushirnschnitte und volumetrische Analysen nach Controlled Cortical Impact (CCI) zur Verfügung gestellt, vergleiche Abschnitt 2.2.1.

Von Herrn Prof. Dr. med. Hamann und Herrn Dr. med. Vosko (mit Arbeitsgruppe), Neurologische Klinik (LMU), wurden Maushirnschnitte und volumetrische Analysen nach Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) zur Verfügung gestellt, vergleiche Abschnitt 2.2.2.

Das Gewebematerial wurde von mehreren Arbeitsgruppen im Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (LMU) weiter untersucht. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich im Wesentlichen mit der Prioproteinexpression und –spaltung nach zerebraler Schädigung.

Entsprechend jedem Textabschnitt werden die Bestandteile verwendeter Puffer und Lösungen aufgelistet sowie der Herstellernachweis aller nicht üblicherweise in einem Standardlabor zur Verfügung stehenden Materialien und Geräte erbracht.

2.1 *Tierzucht*

2.1.1 Tierhaltung

Zur Sicherstellung eines hohen Hygiene-Standards waren die Tierhaltungsräume überdruckbelüftet und über ein geschlossenes Schleusensystem zu betreten. Die für die Versuche einge-

gesetzten männlichen Mäuse wurden unter diurnalen Bedingungen bei konstant 21 °C in Gemeinschaftskäfigen mit maximal 5 Tieren gehalten.

2.1.2 Genetik

Es wurden Prnp0/0-Mäuse der Prnp-knock-out-Linie „Zürich I“ (Weissmann and Flechsig, 2003) und Wildtyp-Mäuse mit 129/Sv-C57/B16 Hintergrund gekreuzt. Die Prnp+/- Rekombinanten wurden zur Züchtung der für die Versuche benötigten männlichen Prnp+/-, Prnp+/- und Prnp0/0 Littermates verwendet. Zur Untersuchung der Funktion der Oktarepeat-Region des PrP^C (AS 51-91) wurden transgene C4/0-Mäuse mit N-terminal verkürztem PrP Δ 32-93 (Flechsig et al., 2000) gezüchtet. Es wurden hemizygoter C4/0-Mäuse mit Prnp0/0-Mäusen verpaart, um männliche C4/0- und Prnp0/0-Littermates zu erhalten. Alle Mäuse wurden mittels PCR entsprechend publizierter Protokolle genotypisiert (Shmerling et al., 1998). In homozygoten C4-Tieren wurde eine dreifach höhere und in hemizygoten C4/0 eine 1,5-fach höhere PrP-Expression detektiert als im Wildtyp, vergleiche Abbildung 4.

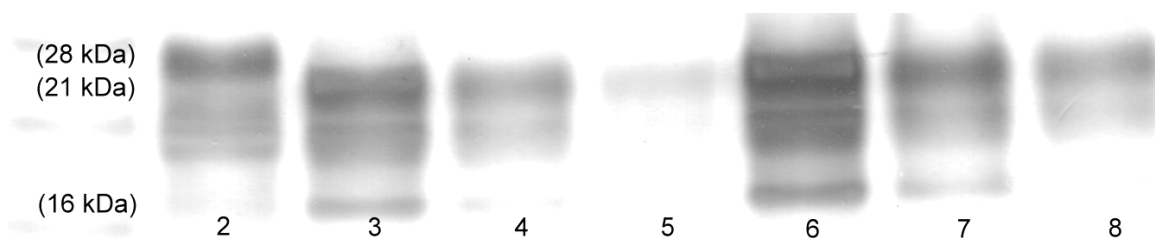


Abbildung 4: PrP-Expressionsstärken Wildtyp, PrP Δ 32-93 homozygot und heterozygot Um die im Vergleich zu Wildtyp-Tieren 3-fach höhere PrP-Expressionsstärke homozygoter C4-Mäuse darzustellen, wurden im Westernblot Gewebeproben von Wildtyp-Hirn und hetero- sowie homozygoter PrP Δ 32-93-Hirnen aufgetragen. Lane 1: Marker, Lane 2: Wildtyp-PrP, 28 kDa (Konzentration 100%), Lane 3: PrP Δ 32-93 heterozygot, 21 kDa (100%), Lane 4: PrP Δ 32-93 heterozygot (33%), Lane 5: PrP Δ 32-93 heterozygot (10%), Lane 6: PrP Δ 32-93 homozygot (100%), Lane 7: PrP Δ 32-93 homozygot (33%), Lane 8: PrP Δ 32-93 homozygot (10%). Es deutlich zu erkennen, dass PrP Δ 32-93 homozygot 33% (Lane 7) etwa die gleiche Intensität wie die Wildtyp-Probe (Lane 2) aufweist.

2.2 Neurochirurgie

2.2.1 Controlled Cortical Impact (CCI)

Das Tierversuch-Modell eines Schädelhirntraumas durch Controlled Cortical Impact (CCI) wurde zuerst für Ratten beschrieben (Dixon et al., 1991) und später die Anwendung bei Mäusen modifiziert (Smith et al., 1995). Die Narkose wurde mit 3 % Isoflouran eingeleitet und bei 1.5 % in einem 70% / 30% Gemisch von N₂O / O₂ aufrechterhalten. Über den gesamten chirurgischen Prozess mit anschließender Erholungsphase wurde mit Heizmatten die physiologische Körpertemperatur der Mäuse (rektal $37 \pm 0,1$ °C) konstant gehalten. Die Mäuse wurden in Bauchlage fixiert. Der rasierte Kopf wurde in der zur Interaurallinie horizontalen Ebene in ein stereotaktisches Rahmensystem eingespannt. Die Kopfhaut wurde links parietotemporal in Höhe des Bregma inzidiert. Nach Retraktion der Kopfschwarte wurde mittels eines Bohrers eine 5 mm durchmessende Kraniotomie über dem linken parietalen Kortex (etwa 0,5 mm posterior der Sutura coronalis und etwa 3 mm lateral der Sutura sagittalis) durchgeführt. Ein pneumatisch betriebener Stahlzylinder von 3 mm Durchmesser wurde über der Kraniotomie positioniert und das Trauma mit einer gewünschten Geschwindigkeit von 8 m/s und einer Eindringtiefe von 1 mm gesetzt. Je nach Versuchsgruppe schloss sich eine posttraumatische Erholungsphase von 15 Minuten bzw. 24 Stunden an. Die Sham-Mäuse wurden bis auf die Setzung des Traumas den gleichen Operationsbedingungen unterzogen und wurden nach 15 Minuten durch intrakardiale Perfusion eiskalter isotonischer Kochsalzlösung (5 g/l bovines Serumalbumin, 10 IU/l Heparin, 0,9 % NaCl) entblutet. Sofort im Anschluss wurden die Gehirne entnommen und auf Trockeneis konserviert. Alle Mäuse waren zum Zeitpunkt ihrer Tötung 2 Monate alt und wogen 25-35 g.

2.2.2 Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO)

Zur Okklusion der Arteria cerebri media (occlusion of the middle cerebral artery, MCAO) wurde das intraluminale Filament Modell eingesetzt (Vosko et al., 2006). Die Narkose wurde mit 3 % Isoflouran eingeleitet und bei 1.5 % in einem 70 % / 30 % Gemisch von N₂O / O₂ aufrechterhalten. Mit einem homöothermischen Decken-System und rektaler Temperaturmessung wurde die physiologische Körpertemperatur der Mäuse bei $37 \pm 0,1$ °C konstant gehalten. Der regionale cerebrale Blutfluss (rCBF) wurde bei allen Tieren mit Laser Doppler Flussmessung (Perimed, Järfäla, Schweden) überwacht, wofür ein Glasfaserendoskop über dem Versorgungsgebiet der A. cerebri media 2 mm posterior und 6 mm lateral des Bregma

angebracht wurde (Hata et al., 1998). Unter Schonung des N. vagus wurde die Arteria carotis communis auf Höhe ihrer Bifurkation in Arteria carotis interna und externa durch Inzision in medianer Halslinie freigelegt. Die A. carotis communis wurde temporär geclippt, nach kranial eröffnet und ein Nylon-Faden (je nach Gewicht des Tieres mit einem Durchmesser von 0,2 – 0,3 mm) mit Silikonbeschichtung (Ethicon, Johnson&Johnson, Norderstedt, Belgien) anterograd in die A. cerebri interna (bis 9 mm ab Bifurkation) vorgeschoben. An das Gewicht der Tiere angepasst wurde ein Fadendurchmesser zwischen 0,2 - 0,3 mm gewählt. Daraufhin reduzierten sich die Werte der basalen rCBF des Stromgebiets der A. cerebri media um über 70 %. Der Faden wurde nach Ablauf einer einstündigen Ischämie zurückgezogen, entsprechend der Initiierung der Rekanalisation. Die Wundfläche wurde mittels Gewebekleber verschlossen. Die Sham-Mäuse wurden den gleichen Operationsbedingungen unterzogen, jedoch wurde hier der Faden lediglich in die A. carotis communis eingeführt. Dies induzierte keine cerebrale Ischämie. Am Ende einer 24-stündigen Reperfusionphase wurden die Tiere unter tiefer finaler Narkose (Ketamin/Rompun) durch intrakardiale Perfusion kalter isotonischer Saline (bovines Serumalbumin (5 g/l), Heparin (10 IU/l) und 2 ml Natrium-Nitroprussid-Lösung (100 µl, 18 mg in 10 ml Saline) entblutet und gekühlt. Die Gehirne wurden rasch entnommen und auf Trockeneis konserviert. Alle Mäuse waren zum Zeitpunkt ihrer Tötung 2 Monate alt und wogen 25-35 g.

2.3 *Histologische Untersuchungen*

2.3.1 Anfertigen der Kryoschnitte

Das kryokonservierte Hirn wurde mittels Tissue-Tek® (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) auf dem Kryotom (HM 360, Microm, Deutschland) befestigt. Entsprechend der Schnittstufen des Schneideprotokolls wurden 10 µm bzw. 20 µm dicke koronare Kryoschnitte auf die Objektträger aufgezogen. Jeder 50. Schnitt wurde für die volumetrische Analyse gesammelt. Festgelegte Abschnitte wurden verworfen. Die übrigen Schnitte wurden für immunhistochemische Färbungen und Gewebeanalysen verwendet. Für die Immunblot-Analyse wurden Schnitte der Schnittstufe 3,0 – 4,0 mm ab rostral herangezogen (siehe histologische Schnittprotokolle im Anhang).

2.3.2 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 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 in 70 %-igem Ethanol rehydriert, anschließend mit Aqua dest. gespült und zweimal je 10 Minuten in PBS pH 7,3 gewaschen.

2.3.3 Immunhistochemie

Unmittelbar vor der Färbung wurden die fixierten Schnitte bei Raumtemperatur 10 Minuten in 70 %-igem Ethanol rehydriert. Anschließend wurde das Gewebe mit Aqua dest. gespült und zweimal je 10 Minuten in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung gewässert. Die Protokolle aller immunhistochemischen Färbungen wurden per Hand entwickelt und auf einer halbautomatischen histologischen Färbemaschine (Ventana BenchMark, Strassburg, Frankreich) wie folgt durchgeführt:

PrP^C-Färbung

1. Antigen-Retrieval: Gewebe-Andau mit Protease 1 (Ventana, Strassburg, Frankreich)
2. 15-minütiges Blocken unspezifischer Bindungen mit 0,05 % Kasein (I-Block™, Tropix, Bedford, MA, USA) bei 37° C
3. 2 Waschschrte mit Reaction Buffer (Ventana, Strassburg, Frankreich)
4. 32-minütige Inkubation bei 37°C mit dem gegen rekombinantes Volllänge-Maus-Prionprotein, AS 23-231 gerichteten Primäantikörper CDC1 Kaninchen-Anti-Maus (Eigenproduktion), 1:500 verdünnt in 100 µl Antibody Dilutant (Ventana, Strassburg, Frankreich)
5. 1 Waschschrte mit Reaction Buffer (Ventana, Strassburg, Frankreich)
6. Detektion des Primäantikörpers durch 32-minütige Inkubation bei 37 °C mit dem biotinylierten sowie Streptavidin bindenden polyklonalen Sekundäantikörper Schwein-Anti-

Kaninchen (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland), 1: 150 verdünnt in 100µl Antibody Dilutant (Ventana, Strassburg, Frankreich)

7. 1 Waschschrift mit Reaction Buffer (Ventana, Strassburg, Frankreich)
8. 12-minütige Inkubation bei 37 °C mit an Alkalische Phosphatase gekoppeltem Streptavidin (Enhanced SA-AP/Ventana-Reagenz, Ventana, Strassburg, Frankreich)
9. 1 Waschschrift mit Reaction Buffer (Ventana, Strassburg, Frankreich)
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, das durch die Aktivität der Alkalischen Phosphatase als rot-fluoreszierender 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 Waschschriffe mit Reaction Buffer (Ventana, Strassburg, Frankreich)
13. Gegenfärbung mit Hämalun und DAPI per Hand
14. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70 %, Ethanol 96 %, 5 Minuten Ethanol 100 %).

β-Aktin-Färbung

Auch die immunhistochemische Färbung des β-Aktins wurde auf der Färbemaschine durchgeführt. Bis auf Weglassen des Antigen-Retrieval-Schrittes zu Beginn der Färbung und die Verwendung eines anderen Primärantikörpers (polyklonaler Anti-β-Aktin-Antikörper Actin I-19, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland, Verdünnung 1:500 verdünnt in 100 µl Antibody-Dilutant) erfolgte die β-Aktin-Färbung mit demselben Programm wie die PrP^C-Färbung.

Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzfärbung von β-Aktin und PrP^C wurden mit dem Fluorochrom CY3 konjugierte Sekundärantikörper (1:100 verdünnt in 100 µl Antibody-Dilutant, Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff 42,6-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (1:10.000, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gegengefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden nicht in Alkohol dehydriert, sondern mit Wasser überschichtet.

2.3.4 Nissl-Färbung

Die Kresylviolett-Färbung nach Franz Nissl (Nissl, 1894) ist eine Methode zur Darstellung basophiler Verbindungen von Nukleinsäuren des Zellkerns und des der Kernhülle angehörenden rauhen endoplasmatischen Retikulums (Nissl-Substanz). Da sich Nissl-Substanz in Nervenzellen nur im Zellkörper und nicht in Zellfortsätzen befindet, kann graue von weißer Substanz abgegrenzt werden. Die Nissl-Färbung ermöglicht es sehr gut Veränderungen empfindlicher Neurone unter Apoptose oder Nekrose (Pyknose, Karyorhexis, Veränderungen der Proteinsynthese in der Nissl-Substanz) darzustellen. Die gefrorenen Kryoschnitte wurden in 70 % Ethanol dehydriert. Anschließend wurden sie 1h mit 0,002 % Kresylviolett gefärbt und mit Aqua dest. gespült. Unter mikroskopischer Kontrolle folgte die Kern-Differenzierung in aufsteigender Alkoholreihe und Zugabe von Eisessig (96 % Ethanol, 100 % Ethanol + 8 Tropfen von 100 %-igem Eisessig, 100 % Ethanol, je zwei Minuten).

2.3.5 Konservierung der gefärbten Schnitte

Mit Ausnahme der Immun-Fluoreszenz-Färbungen wurden alle gefärbten Schnitte nach der Dehydrierung in Ethanol abschließend in Xylol gespült und mit einem Deckgläschen und Eindeckmedium (Coverquick, Labornord, Mönchengladbach, Deutschland) konserviert. Die Immun-Fluoreszenz-Färbungen wurden nur mit Wasser und einem Deckgläschen vor Austrocknung geschützt und unverzüglich mikroskopiert.

2.4 Volumetrie

Von den Hirnen der CCI- und MCAO-Versuche wurden von 3 mm ab rostral (Entfernen des olfaktorischen Bulbus) bis etwa 5 mm hinter Bregma koronare Serienschnitte angefertigt. Für die volumetrische Analyse wurde jeder 50. der 10 µm dicken Schnitte gesammelt (siehe histologische Schneideprotokolle) und nach Nissl gefärbt, wobei sich das nekrotische Gewebe blass abgrenzte. Die Schnitte wurden mit einem hochauflösenden Flachscanner (Epson, Meerbusch, Deutschland) digitalisiert. Mit Optimas Imaging Software (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) wurden nach Eichung der Bildgröße die Flächen der Läsion und der Hemisphären metrisch bestimmt. Die Partialvolumina zwischen den Schnittstufen wurden mit folgender Formel berechnet und zusammengesetzt:

$$\text{Läsionsvolumen} = \sum_{i=1}^{n-1} \text{area}_i \times 500\mu\text{m}$$

(beginnend bei 500 μm , $i = 1$, bis 7500 μm , $n = 15$)

2.5 Immunoblot-Analyse

Für eine differenzierte Analyse der PrP^C-Spaltprodukte war es notwendig einzelne Regionen der Hirnschnitte zu untersuchen: bei Ischämiemäusen die Infarktzone, das umgebende ipsilaterale Gewebe mit Penumbra sowie die kontralaterale Hemisphäre, bei Traumamäusen ipsi- und kontralaterale Hemisphäre. Zur Untersuchung dieser mikroskopischen Gewebemengen aus den histologischen Schnitten wurde ein hoch sensitives Immunoblot-Verfahren mit einer volumenbezogener Technik der Gewebe-Lysierung entwickelt (Krebs et al., 2006). Dabei werden zunächst Areale im histologischen Schnitt ausgesucht und deren Gewebevolumen vermessen. Anschließend wird dieses Gewebe mit einem Lysierungspuffer lysiert und denaturiert, so dass die enthaltenen Proteine mittels einer miniaturisierten Gelelektrophorese aufgetrennt werden können. Es erfolgen nun Übertrag und Immobilisation auf einen Immunoblot, der nachfolgend mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert wird. Eine enzymatische Färbung dient der Visualisierung der detektierten Proteine.

2.5.1 Färbung vor dem Lysieren

Gemäß der Zielsetzung war für die Immunoblot-Analyse eine orientierende Färbung der Schnitte notwendig, um die verschiedenen Hirnregionen abgrenzen zu können, bzw. die Gewebnekrosen sichtbar zu machen. Es wurde eine abgewandelte Form der Kresylviolett-Färbung von Nukleinsäure nach Nissl entwickelt. Diese Technik ohne vorangehende Gewebefixierung erlaubt, die Proteine, welche sich nicht anfärben, in möglichst nativen Zustand zu belassen – trotz histologischer Voruntersuchung. Zusätzlich erleichtert ein farbiges Lysat die Kontrolle der vollständigen Abnahme des Gewebes vom Objektträger. Die bei -80° C eingefrorenen Schnitte wurden auf einer Wärmeplatte (ca. 35°C) rasch erwärmt, um einen feuchten Beschlag zu vermeiden. Das Gewebe wurde nun 2 min in 100 % Ethanol entwässert und anschließend mit 0,002 % Kresylviolettlösung in 70% Ethanol etwa 5 min gefärbt bis die Hirnregionen abgrenzbar waren. Überschüssige Farbe wurde in 100 % Ethanol gelöst. Die Schnitte wurden getrocknet und rasch weiterverarbeitet.

2.5.2 Lysierungsverfahren

Die oben beschriebenen Regionen der histologischen Schnitte wurden mit einem spitzen Skalpell durch Einritzen feiner Trennlinien unter mikroskopischer Kontrolle markiert. Für ein möglichst schonendes und vollständiges Extrahieren der Proteine aus dem Gewebeverband wurde ein spezieller Lysierungspuffer (60 mM Tris-HCl, pH 7,2, 2 % SDS, 50 mM DTT, 10 % Glycerin, 1 mM EDTA) verwendet. Dabei bewirkt SDS eine Auflösung des Gewebes ohne mikroskopisch sichtbare Fragmente innerhalb weniger Minuten und Dithiothreitol (DTT) zusätzlich stark reduzierend. Glycerin dient der Einstellung der Hygroskopie und Viskosität, die für die Handhabung der geringen Probevolumina von großer Bedeutung ist. Die Proteasen werden rasch denaturiert und in ihrer Aktivität inhibiert. Für das vollständigen Auflösen von 1 mm^2 (bei Schnittdicke $20 \text{ }\mu\text{m} = 0,02 \text{ mm}^3$) erwies sich ein vorgesehene Puffervolumen von ca. $2 \text{ }\mu\text{l}$ (2 mm^3) als optimal. Bei zu geringer Puffermenge tritt eine Schleimbildung des Lysats auf (vermutlich DNS-Fäden), die zur ungenügenden Auflösung und Abnahme führen. Ein größeres Puffervolumen verbessert den Lysierungsprozess nicht und stellt nur eine unnötige Verdünnung dar. Für die Lyse der abgegrenzten Regionen wurde jeweils das erforderliche Volumen des Lysierungspuffers (siehe unten) mit einer Pipette aufgezogen und davon vorsichtig soviel Lysierungspuffer auf die entsprechende Region aufgebracht, so dass das aufzulösende Gewebeareal vollständig bedeckt war, aber keine Pufferflüssigkeit über die mit dem Skalpell eingeritzte Markierung hinauslief. Ein Pufferüberschuss kam in das vorbereitete Gefäß. Um möglichen Pufferverlust durch Verdunstung bei Raumtemperatur zu minimieren, wurde der Objektträger zum Lysieren neben ein Coolpack (-20° C) gelegt. Hierbei wurde ausgenutzt, dass die kalte, mit Wasser übersättigte Luft zu Boden sinkt und dabei kontinuierlich den Objektträger „überfließt“. Nach 2 Minuten hatte sich das Gewebe im Lysierungspuffer makro- und mikroskopisch komplett gelöst. Das homogene leicht visköse Lysat wurde mit der Pipette aufgezogen und zu dem restlichen Puffervolumen gegeben. Mit einem weiteren Tropfen aus dem Lysat wurde die Region auf dem Objektträger nach dem Lysieren gespült, um eventuell verbliebene Lysatreste möglichst komplett abnehmen zu können. Dies wurde durch die vorangehende Färbung des Gewebes mit Kresylviolett erleichtert. Das Lysat wurde nun nochmals durch Auf- und Hinunter-Pipettieren und auf dem Vortex-Gerät gemischt. Ein eventueller Schaum oder Tropfen am Rand des Gefäßes wurden vor der Weiterverarbeitung zum Probenvolumen zurück-zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in einem PCR-Cycler (DNA Thermal Cycler, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) für 10 Minuten bei 95° C weiter denaturiert und schließlich auf 4° C gekühlt. Die Objektträger wurden bezüglich der Vollständigkeit der Lyse, bzw. verbliebener Reste eines Gewebeverbandes kontrolliert.

2.5.3 Abschätzung des Volumenverlusts bei der Lysierung durch Verdunstung

Ein Maushirn-Schnitt von 10 μ m Dicke wurde im Ganzen durch Auftragen von Lysierungspuffer lysiert. Der maximal mögliche Verlust an Lysierungspuffer durch Verdunstung bei Raumtemperatur wurde evaluiert. Dazu wurde der Objektträger mit einer Präzisionswaage (CP224S, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) vor und nach Auftragen des Lysierungspuffers sowie nach Abnehmen des Gewebelysats gewogen. Die Objektträger wurden nicht mit Hilfe von Coolpacks gekühlt.

2.5.4 Kontrolle der Schnittdicke der histologischen Schnitte

Für die korrekte Messung des zu untersuchenden Gewebevolmens musste die Schnittdicke der histologischen Schnitte genau vermessen werden. Dazu wurden mit dem unten angegebenen Kryotom Kontrollschnitte angefertigt (Einstellung 10 μ m und 20 μ m) und mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) angefärbt. Mit Hilfe der konfokalen Laser-Mikroskopie (TCS System SP2, Leica, Wetzlar, Deutschland) konnte nun die Messung der Schnittdicke mit hoher Genauigkeit durchgeführt werden.

2.5.5 Detektionsgrenze der Immunoblot-Technik

Zur Abschätzung der Limitationen des Verfahrens wurde das minimale mit dem Immunoblot-Verfahren detektierbare Gewebevolumen eines Hirngewebeschnitts ermittelt. Zu diesem Zweck wurde bei einem koronaren Maushirn-Schnitt von 20 μ m Dicke (kontrolliert mit konfokaler Laser-Mikroskopie) die Fläche eines kleinen Kortexausschnitts nahe Bregma mit dem Skalpell markiert und digital bestimmt. Aus diesen Werten wurde das Gewebevolumen exakt berechnet. Die darin enthaltene durchschnittliche Zahl an Neuronen wurde histologisch erfasst. Anschließend wurde die Fläche mit 2 μ l Lysierungspuffer / mm² aufgelöst. Diese Probe wurde in 10-facher Wiederholung 1:1 mit Lysierungspuffer verdünnt, um eine logarithmische Verdünnungsserie zu erhalten.

2.5.6 Herstellung der Proben für das CCI- und MCAO-Projekt

Für die Immunoblot-Analyse wurden kryofixierte und Nissl gefärbte koronare Maushirnschnitte der 3,5 mm ab rostral verwendet. Bei Hirnschnitten des Trauma-Versuchs sowie bei Sham- und Kontroll-Tieren wurden die Hemisphären I und C (ipsi- und kontralateral) durch

Einritzen einer medialen Trennlinie getrennt. Bei den Ischämie-Hirnen wurden die zu untersuchenden Areale N (Nekrose), I (ipsilateraler Rest der geschädigten Hemisphäre) und C (kontralaterale Hemisphäre) unter mikroskopischer Kontrolle markiert. Die Fläche von N entsprach typischerweise 1/3 Hemisphäre und von I 2/3 Hemisphäre. Die Areale wurden nacheinander, im Fall der Ischämie mit der kleinsten Fläche N beginnend, mit Lysierungspuffer aufgelöst (vergleiche Abbildung 5). Eine Maushirn-Hemisphäre wurde mit 42 μ l Lysierungspuffer aufgelöst, entsprechend N mit 14 μ l, I mit 28 μ l. Die abschließende Behandlung zur Deglykosylierung (s.u.) verdoppelte das Probenvolumen. Für die spätere quantitative Auswertung der Proteinbanden wurden die Proben mit einer standardisierten Konzentrationsreihe (s.u.) auf jedem Gel verglichen.

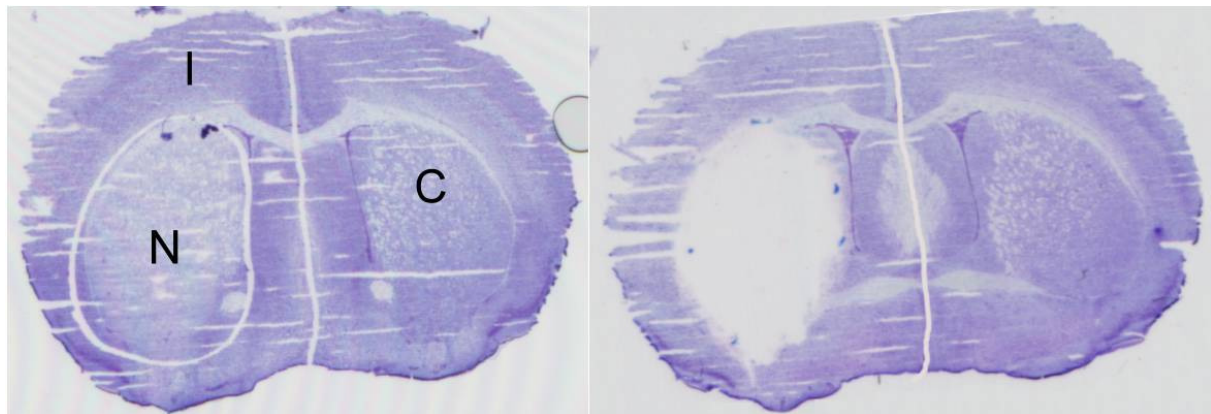


Abbildung 5: Lysierung Die zu homogenisierenden Schnittregionen (hier bei MCAO Nekrose (N), ipsilaterale (I) und kontralaterale Hemisphäre (C)) wurden mit dem Lysierungspuffer nacheinander mit dem kleinsten Areal (N) beginnend aufgelöst und das Lysat mit der Pipette vom Objektträger abgenommen.

2.5.7 Herstellung der Konzentrationsreihen für MCAO und CCI

Zur späteren Quantifizierung der Banden wurden auf jedes Gel standardisierte Konzentrationsreihen von äquivalentem Maushirngewebe aufgetragen. Der Übersichtlichkeit halber wird mit den Volumina der auftragsfertigen Proben gerechnet.

Von allen Proben wurden jeweils identische Volumina (100 %) auf das Gel aufgetragen (s.u.), nämlich 14 μ l (bei einem Fassungsvermögen einer Geltasche von 25 μ l). Für eine Konzentrationsreihe mit 4 Werten errechnen sich z.B. folgende Volumina:

K1 (150 %) = 21 μ l

K2 (100 %) = 14 μ l, entspricht Probenvolumen

K3 (75 %) = 10,5 μ l

K4 (50 %) = 7 μ l

Gesamt 52,5 μ l (pro Gel)

Für 10 Konzentrationsreihen wurden 525 μ l auftragfertiges bzw. die Hälfte = 262,5 μ l direktes Lysat benötigt. Ein durchschnittlicher Kryo-Maushirnschnitt hat ein Volumen von ca. 6 mm x 9 mm x 0,02 mm = 1,08 mm³ = 1,08 mg und wurde mit 84 μ l (42 μ l à Hemisphäre) Lysierungspuffer aufgelöst. Für die Konzentrationsreihe wurden keine Kryoschnitte verwendet, sondern eine äquivalente Menge kryofixierten Maushirngewebes: d.h. für 10 Gele mussten (262,5 μ l / 84) x 1,08 mg = 3,375 mg Hirngewebe auf einer Präzisionswaage abgewogen und mit 262,5 μ l Lysierungspuffer aufgelöst werden. Mit den folgenden Reagenzien der Deglykosylierung (PNGase F Kit) und der Versetzung mit SDS (Lämmli-Puffer) verdoppelte sich das Volumen des unbehandelten Lysats auf 525 μ l.

2.5.8 Deglykosylierung mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F)

Das variabel aminoglykosylierte PrP^C lässt sich am Immunoblot nur ohne den glykosidischen Shift des Molekulargewichts exakt quantifizieren. Das industriell aus dem Flavobacterium meningosepticum gewonnene Enzym Peptid-N-Glykosidase F (Peptid-N⁴-(N-acetyl- β -D-glucosaminy)-Asparagin-Amidase) spaltet N-glykosidisch an Asparaginseitenketten gebundene Glykoglykane ab (Plummer, Jr. and Tarentino, 1991). Die enzymatische Deglykosylierung wurde mit dem Reagenziensystem des Herstellers (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) nach modifiziertem Standardprotokoll durchgeführt: den Proben wurde 1/5 des Ausgangsvolumens an Glykoprotein-Denaturierungs-Puffer (0,5 % SDS, 40 mM DTT) zugegeben. Das Gemisch wurde 10 min bei 95 °C im PCR-Cycler denaturiert. Nach anschließendem Abkühlen auf 4 °C wurden jeweils 1/5 Ausgangsvolumen NP40-Puffer (1 % Nonylphenol 40), G7-Puffer (50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,5) und PNGase-Suspension (500,000 Units/ml in 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 % Glycerin, pH 7,5) zugefügt. Der enzymatische Verdau lief 12 h im PCR-Cycler bei Optimaltemperatur 37 °C. Beendet wurde die Reaktion durch 10 minütiges Erhitzen auf 95 °C.

2.5.9 Laden der Proteine

Unmittelbar vor der Gel-Elektrophorese wurde den Proben bei 95 °C über 10 min im PCR-Cycler unter Zugabe von 1/5 Ausgangsvolumen „Lämmli-Puffer“ (50 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 10 % β -Mercaptoethanol, 10 % Glycerin, 0,1 % Bromophenolblau, pH 6,8) erhitzt (Laemmli, 1970). Beim Erhitzen gehen Wasserstoffbrückenbindungen der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur verloren. Das DTT des Lysispuffers wie auch β -Mercaptoethanol reduzieren kovalente Disulfidbrücken. So kann sich das anionische Detergens SDS im Verhältnis 1,4:1 an basische und aromatische Aminosäurereste anlagern. SDS überkompensiert Protein-Eigenladungen: mit den exponierten SO_4^{2-} -Gruppen des SDS werden die Proteine zu Polyanionen und können nun ausschließlich nach ihren Größen aufgetrennt werden. Der Farbstoff erleichtert das Befüllen der Geltaschen und lässt bei der Elektrophorese die Lauffront abschätzen. Glycerin sorgt für die nötige Dichte der Probe, die sich am Boden Geltasche gleichmäßig legen muss. Der pH 6,8 ist dem Sammelgel angeglichen.

2.5.10 Herstellung eines Bis-Tris-Polyacrylamidgels

Für die Auftrennung der SDS-beladenen Proteine im elektrischen Feld wurde ein diskontinuierliches Gelsystem auf Polyacrylamid-Basis, das sogenannte SDS-PAGE (sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmli, 1970), genutzt. Ein PAG hat zwei Teile: ein „weitmaschiges“ Sammelgel mit saurem pH (stacking gel, ca. 1 cm, mit Probentaschen) auf Seiten der Kathode für einen schnellen Durchtritt aller SDS-Protein-Komplexe, die am Übergang in das mit der Anode verbundene „feinmaschige“ Trenngel mit basischem pH (resolving gel oder running gel) fokussiert werden. Dort werden sie durch den Widerstand einer feinporigen Gelmatrix aus Polyacrylamid aufgetrennt. Polyacrylamid ist das Polymerisationsprodukt des Acrylsäureamids und wurde mit N,N-Methylen-bisacrylsäureamid quervernetzt. Das grobporige Sammelgel enthielt maximal 5 % Polyacrylamid. Der Porendurchmesser des Trenngels ist je nach Molekulargewicht des untersuchten Proteins zu variieren, für das kleine PrP^C (28 kDa) wurde ein engmaschigeres Gel mit 12 % Acrylamid gewählt. Das Gel wurde mit BisTris (Bis (2-hydroxyethyl) amino-tris (hydroxymethyl) methan) gepuffert. Die Substanz hat einen pKa von 6,4 und ist für Proben im pH-Bereich 5,5–7,5 einsetzbar. Ausgelöst und katalysiert wurde die Polymerisation durch Versetzung mit den Radikalbildnern Ammoniumperoxosulfat (APS) als Starter und Tetramethylethylendiamid (TEMED) als Katalysator. Zuerst wurde die Trenngel-Mischung (12-%-ig: 6,25 ml 40-%-ige Acrylamidlösung, 5 ml Running-Gel-Puffer (18,15 g Tris ad 75 ml H₂O, pH 8,8 mit HCl ad 100 ml H₂O), 0,2 ml 10

% SDS, 6,7 µl TEMED, 100 µl APS, 8,56 ml H₂O) zügig durch ein einen 0,45 µm Filter zwischen zwei absolut fettfreie, abgedichtete Glasplatten gegossen (2/3 der Höhe) und mit Isopropanol überschichtet. Das Trenngel war nach ca. 45 Minuten auspolymerisiert und konnte nach Absaugen des Isopropanols mit dem Sammelgel (1,25 ml 40 %-ige Acrylamidlösung, 2,5 ml Stacking-Gel-Puffer (3,0 g Tris ad 40 ml H₂O, pH 6,8), 100 µl 10 % SDS, 6 ml H₂O, 7 µl TEMED, 100 µl APS) überschichtet werden. Die Größe der Gele für die densitometrischen Auswertungen betrug ca. 6 cm x 8 cm, für hochauflösende Immunoblot-Untersuchungen wurden Gele mit Laufhöhen über 25 cm hergestellt. Durch abschließendes Einsetzen eines Kamms in das Sammelgel wurden Taschen ausspart, die hinterher mit Proben befüllt wurden. Für einen hohen Durchsatz der großen Anzahl von Proben wurden zusätzlich industriell hergestellte 12 % Bis-Tris-Gele (NuPAGE® Novex Bis-Tris Gel 12 %, 1,0 mm, 10 wells, Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt.

2.5.11 Elektrophorese

Das Gel wurde in die Elektrophorese-Apparatur (Modell P8D8, Owl Separation Systems, Portsmouth, NH, USA) eingespannt und der Kamm entfernt. Die Anoden- und Kathodenkammer wurden mit leitendem Laufpuffer bis über den Spiegel der Taschen befüllt. Als leitender Puffer wurde der MOPS-Laufpuffer eingesetzt (50 mM Tris, pH 7.2, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA, 50 mM 3-(N-Morpholino)-propanesulfonicacid), der eine scharfe Auftrennung von Molekulargewichten um 30 kDa durch retrograde Diffusion in das Trenngel begünstigt. Mit einer speziellen lang ausgezogenen Pipette wurden die Taschen mit den Proben beschickt. Das im Lysierungspuffer enthaltene schwere Glycerin wirkte dem Auftrieb der SDS-Protein-Komplexe entgegen. In die erste Tasche wurden statt einer Probe 5 µl des Markers geladen (SeeBlue® Pre-Stained Standard, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), ein fertiges vorgefärbtes Protein-Standardgemisch mit „Lämmli-Puffer“ für die spätere Zuordnung der untersuchten Proteine anhand ihres Molekulargewichts. Damit die Gele beim Prozess der Elektrophorese nicht überhitzten, wurde das in die Apparatur integrierte Kühlkammersystem an die Wasserleitung (ca. 10° C) angeschlossen. Es wurde eine kontinuierliche Spannung von 100 V über ca. 40 min angelegt. In der ersten Phase verdichtet sich schnell die eingefüllte Probe beim Eindringen in das Sammelgel (1. Fokussierung). In der 2. Phase wird das Sammelgel mäßig schnell durchlaufen und die Proteine verdichten sich erneut beim Übertritt in das basische Trenngel (2. Fokussierung). Nun erfolgt in der 3. Phase der langsame Auftrennungsprozess im Trenngel: kleinere Komplexe wandern schneller zur Anode als große, d.h. das Molekular-

gewicht ist umgekehrt proportional zur Wanderungsgeschwindigkeit (siehe Abbildung 6). Ein ausreichender Auftrennungsgrad wurde erreicht, wenn die Lauffront eine vom Boden der Geltaschen gemessene Strecke von ca. 2,5 cm (bzw. bei hochauflösenden Untersuchungen ca. 23 cm) erreicht hatte.

2.5.12 Coomassie Färbung zur Kontrolle der elektrophoretischen Auftrennung

Die Färbung mit Coomassie ist eine Standard-Methode um im Polyacrylamid enthaltene Proteine sichtbar zu machen. Sie diente der Kontrolle, ob die Geltaschen mit derselben Proteinmenge beschickt wurden und ob sich die Proteine korrekt aufgetrennt haben. Eine anschließende Weiterverarbeitung (z.B. Immunoblot) ist nicht möglich. Das Gel wurde ca. 10 Minuten in die Färbelösung (0,1 % Coomassie Brilliantblau R, 50 % Methanol, 7 % Essigsäure) gelegt. Die Säure fixierte die Proteine im Gel, der Farbstoff lagerte sich nahezu irreversibel an basische und aromatische Aminosäuren. Überschüssige Farbe wurde durch Wässern des Gels in 50 % Methanol entfernt.

2.5.13 Semidry Blotting Technik

Zwei Filterpapiere (Whatman, Dassel, Deutschland), zugeschnitten auf die Größe des Gels, wurden 2 min in Transfer-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,1 % SDS, pH 8,3) getränkt. Die hydrophobe Polyvinyl-Difluorid-Membran (Immobilon, Millipore, Eschborn, Deutschland), ebenfalls mit Fläche des Gels, wurde mittels 100 % Methanol befeuchtet und mit Transferpuffer gepuffert. Das Gel wurde mit Transferpuffer befeuchtet. Mit einem Plastikspatel wurden die Taschen und der Rand unter der Lauffront abgestochen, um einen inhomogenen Stromfluss zu verhindern. Zum Transfer der SDS-Protein-Komplexe wurden Gel und Membran im Sandwich-System zwischen die Filterpapiere geschichtet: das erste Filterpapier kam auf den Boden (Anode) des Blot-Geräts (Semi Phor, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA), darauf blasenfrei die PVDF-Membran (am leichtesten ließen sich Luftblasen durch hin und her Rollen eines Glaszylinders beseitigen), wiederum darauf das Gel und zum Schluss das zweite Filterpapier. Der Stapel wurde vorsichtig mit dem Deckel (Kathode) beschwert. Das Gerät wurde an eine konstante Stromstärke von 70 mA / 50 cm² Gelfläche über 2,5 h angeschlossen (Towbin et al., 1979). Die SDS-Protein-Komplexe wanderten in Richtung Anode und sammelten sich in den Poren der PVDF-Membran (vergleiche Abbildung 6). Die Membran wurde mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (137

mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) über 5 min auf den für die Antikörperbindung geeigneten physiologischen pH 7,4 umgepuffert (Äquilibrieren). Zusätzlich wurde ein Großteil des SDS gelöst, so dass viele Proteine ihre Epitopstruktur annehmen konnten.

2.5.14 Immunodetektion

Nach dem Transfer und Äquilibrieren wurde die PVDF-Membran 1 h bei Raumtemperatur (RT) mit PBS-Puffer (0,05 g Casein (I-Block™, Tropix, Bedford, MA, USA), 0,5 % Tween20 (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) ad 1 L Phosphat gepufferte Saline (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄), pH 7,4) geblockt, um unspezifische Bindungsstellen der Membran mit dem inertem Casein zu blockieren. So banden bei der anschließenden Immunodetektion die Antikörper selektiv ihr Epitop und es entstand kein Banden-Hintergrund. Zur Entfernung eventueller Reste wurde die Membran nach dem Blocken dreimal gewässert. Danach wurde mit der Primär-Antikörper-Inkubation begonnen. Der PrP^C-Antikörper 4H11 (monoklonal Maus, Produktion H. Schätzl, Institut für Virologie der LMU München), gerichtet gegen die Helix 1 (AS 145-153) des PrP^C, wurde in der Verdünnung 1:2000 in PBS-Puffer eingesetzt. Die Membran wurde 12 h über Nacht bei 4°C inkubiert. Der sehr reaktive Antikörper Actin I-19 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) gegen β-Aktin wurde 1:5000 verdünnt und als zweite Primär-Antikörper-Inkubation eingesetzt (1h bei RT). Nach jeder Primär-Antikörperinkubation wurde die Membran gewässert und es folgten drei 15-minütige Waschschrte bei RT mit PBS-Puffer. Es wurde noch einmal gewässert und 1h bei RT mit Alkalische Phosphatase verbundenem Sekundär-Antikörper „Polyklonal Ziege Anti-Maus“ für die Detektion des 4H11 bzw. „Anti-Kaninchen“ für die Detektion des Actin (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) 1:2000 verdünnt in PBS-Puffer, inkubiert. Durch Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einen Primärantikörper wurde eine Signalverstärkung erreicht. Wieder wurde die Membran gewässert, dreimal 15-minütig mit PBS-Puffer bei RT gewaschen und noch einmal gewässert. Zur Färbung wurde sie mit Alkalische-Phosphatase-Puffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris, pH 9,5) 1 min auf pH 9,5 äquilibriert und in die Färbelösung überführt. Diese bestand aus Alkalische-Phosphatase-Puffer mit 0,1 % Lösung von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) sowie 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (BCIP), Stammlösung jeweils 1:1 in 100 % Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wurde zeitnah angesetzt, da sich die Chromogene spontan verbrauchten. Die an die Sekundär-Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase

dephosphoryliert das BCIP, das daraufhin mit dem NBT in einer Redox-Farbreaktion einen unlöslichen blauen Farbstoff generiert (vergleiche Abbildung 6). Nach etwa 30 min waren die mit Sekundär-Antikörpern markierten Protein-Banden ausreichend angefärbt (Leary et al., 1983). Die Reaktion wurde, wenn die schwächsten Banden zart sichtbar waren, durch Wässern und Umpuffern in PBS-Puffer (pH 7,4) gestoppt. Für ein gleichmäßiges Ergebnis wurde bei allen Inkubations- und Waschschrinen eine automatische Wippe eingesetzt.

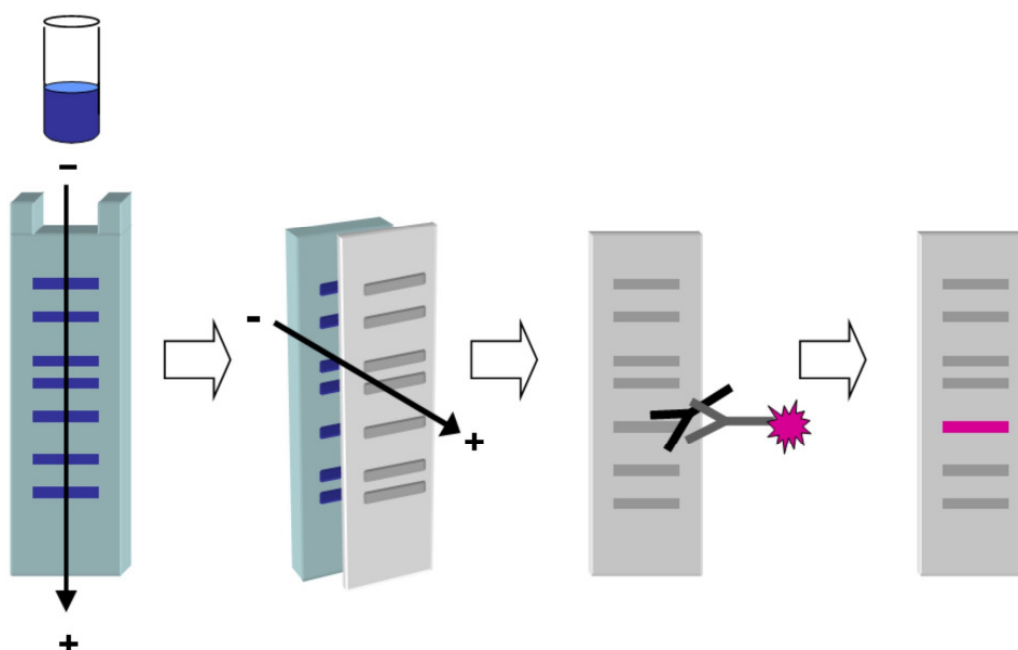


Abbildung 6: Gelelektrophorese und Immunoblot-Technik Die Proteine der Probe wurden im Gel elektrophoretisch nach Molekulargewicht aufgetrennt (SDS-PAGE) (1). Die Proteinbanden wurden mit Hilfe elektrischer Spannung aus dem Gel heraus in eine Membran transferiert (2). Die Detektion der Banden erfolgte in standardisierten Inkubations- und Wässerungsschritten: zunächst wurde die Membran mit dem gegen das gesuchte Protein gerichteten Primärantikörper inkubiert. Zur Signalverstärkung folgte eine Inkubation mit gegen den Primärantikörper gerichteten und an das Enzym „Alkalische Phosphatase“ gekoppelten Sekundärantikörpern. Mit Hilfe des Enzyms wurde in einem weiteren Inkubationsschritt ein Farbstoff umgesetzt, der die Proteinbande sichtbar werden ließ (3,4).

2.5.15 Densitometrie

Die Immunoblots 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, UK) quantifiziert. Die halbautomatische Navigation des Programms erlaubte eine individuelle Auswahl der auszuwertenden Lanes und Protein-Banden. Wie dargestellt in Abbildung 8 und Abbildung 9 wurden die Proteinbanden an

der exakten Pixel-Position ihres Intensitätspeaks zur Messung bestimmt. Auf jedem Blot befand sich die Probe eines Protein-Standard-Gemischs mit bekannten Molekulargewichten, siehe Abbildung 7. Mit diesen Werten konnte das Programm das exakte Molekulargewicht jeder Proteinbande anhand ihres Intensitätspeaks berechnen (siehe Abbildung 10). Die definierten Proteinmengen der Verdünnungsreihe aus Kontrollhirn-Lysat wurden zur Bestimmung der Proteinmenge der Proben herangezogen. Die Pixel-Intensitätswerte der Banden wurden dem Prozentwert der Verdünnung zugeordnet. Aus diesen Werten wurde mit Hilfe des Programms für die Proteine β -Aktin und PrP^C-Volllänge eine Regressionsanalyse („Eichkurve“) errechnet. Der prozentuale Intensitätswert entsprach der relativen Angabe der in der Probe enthaltenen Proteinmenge („quantity calibration“), siehe Abbildung 11. Auf diese Funktionen normalisiert wurden die Intensitätswerte des β -Aktins und PrP^C in den Proben prozentual angegeben. Der relative Anteil der PrP^C-Spaltprodukte wurde anhand der Regressionsfunktion der PrP^C-Volllänge berechnet (C1 und PrP^C-Volllänge werden am selben Epitop mit Antikörper 4H11 erkannt).

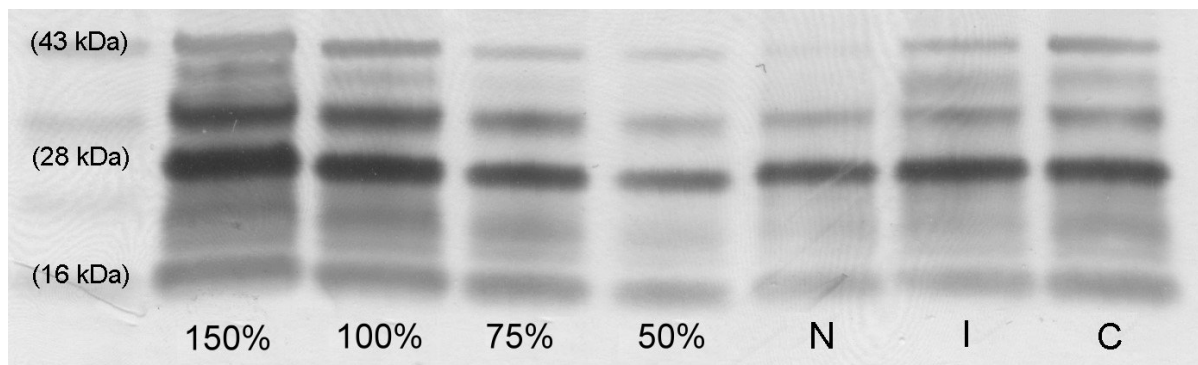


Abbildung 7: Immunoblot mit Verdünnungsreihe und den Proben einer *Prnp*^{+/-}-Maus nach 1h MCAO mit 24h Reperfusionphase Lane 1 enthält ein Protein-Standard-Gemisch mit bekannten Molekulargewichten. In Lane 2-5 sind festgelegte Mengen der Verdünnungsreihe aus Wildtyp-Kontrollhirn-Lysat aufgetragen, 100 % entsprechen der Auftragsmenge (14 μ l) der Proben des Ischämie-Hirns (Nekrose (N), ipsi- (I) und kontralaterale Hemisphäre (C), Lanes 6-8). Die Immunoblots wurden eingescannt und mit der TotalLap Software densitometrisch ausgewertet.

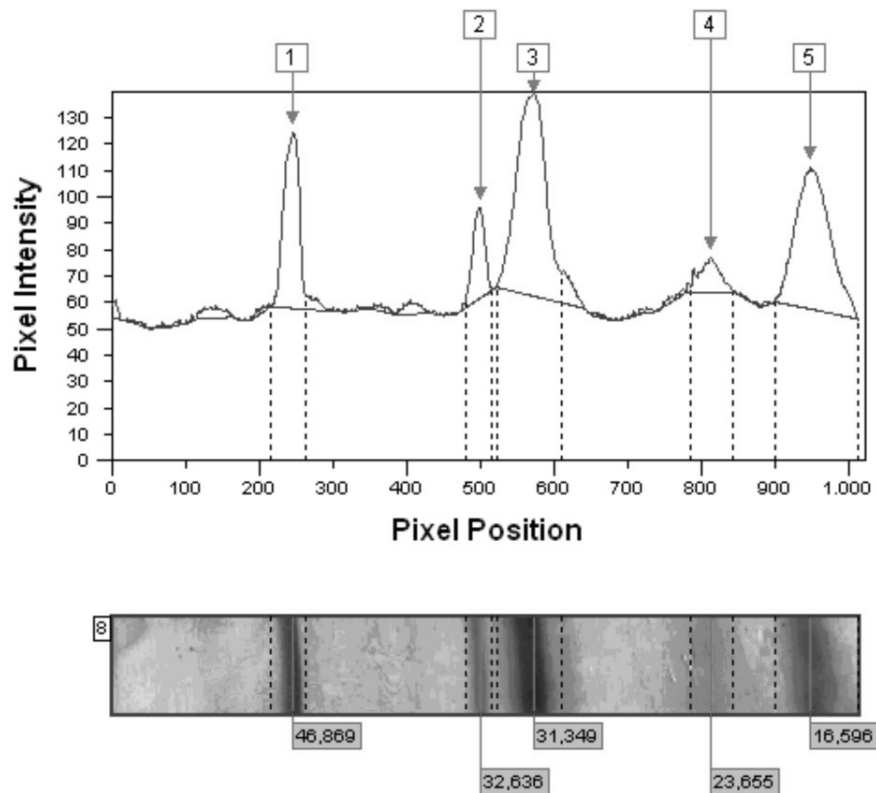


Abbildung 8: Analyse der Proteinbanden einer Hirnlysate-Probe einer *Prnp*^{+/+}-Maus Immunodetektiert wurden die Proteine β -Aktin bei ca. 47 kDa (1) und PrPC mit der Volllänge bei ca. 31 kDa (3) sowie den PrPC-Spaltprodukten C2 bei ca. 24 kDa (4) und C1 bei ca. 17 kDa (5), Bande 2 ist unspezifisch (vergleiche auch Abbildung 7). Für jede Bande wurde das Maximum der Pixel-Intensität (Pixelintensität = durchschnittliche Helligkeit der Pixel im ausgewählten Bereich) bestimmt. Zusätzlich war es möglich anhand einer Standard-Protein-Probe das exakte Molekulargewicht der Banden zu errechnen.

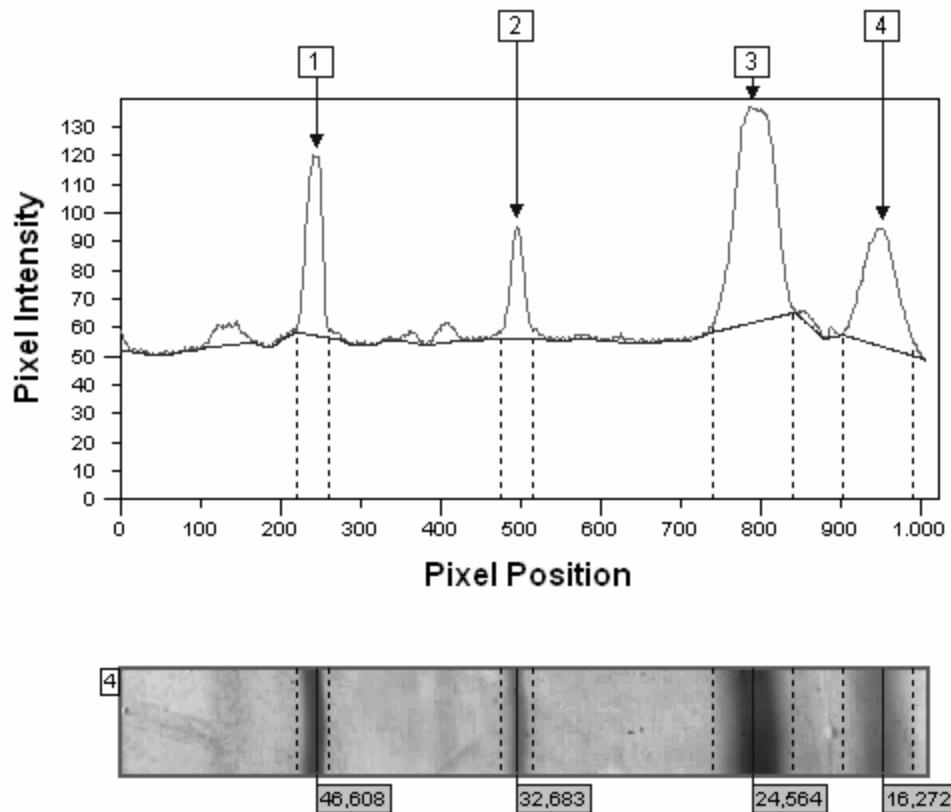
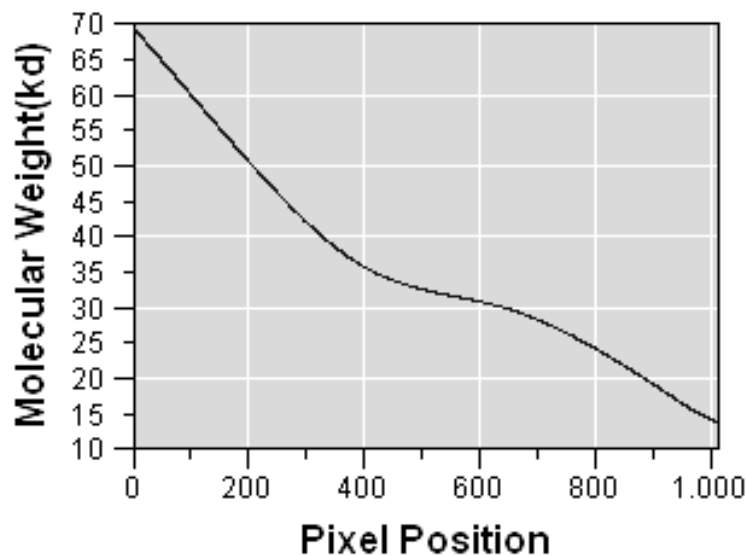
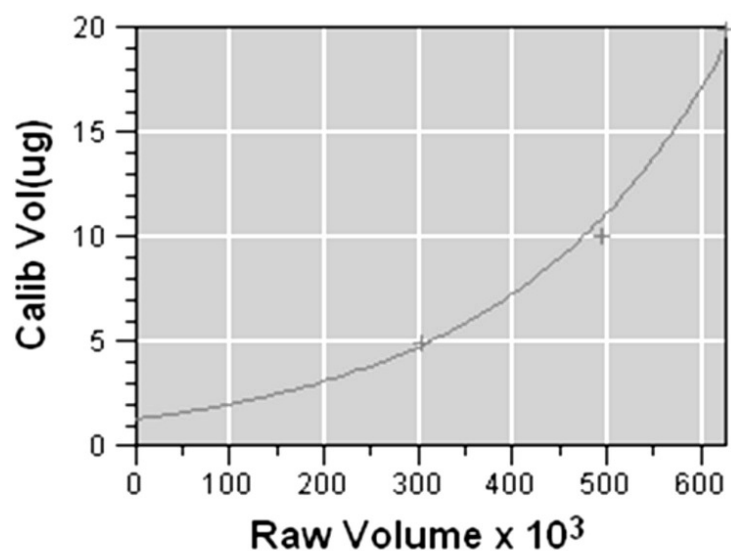


Abbildung 9: Analyse der Proteinbanden einer Hirnlysate-Probe einer *Prnp Δ 32-93*-Maus. Immuno-detektiert wurden die Proteine β -Aktin bei ca. 47 kDa (1) und der *Prnp Δ 32-93*-Volllänge bei ca. 25 kDa (3) sowie dem Spaltprodukt C1 bei ca. 17 kDa (5). Bande 2 ist unspezifisch. Für jede Bande wurde das Maximum der Pixel-Intensität (Pixelintensität = durchschnittliche Helligkeit der Pixel im ausgewählten Bereich) bestimmt. Zusätzlich war es möglich anhand einer Standard-Protein-Probe das exakte Molekulargewicht der Banden zu errechnen.



Cubic spline
 Formula: n/a
 R² Value: n/a

Abbildung 10: Beziehung von Laufhöhe (x) und Nominalgewicht (y) der Markerproteine Die bekannten Molekulargewichte der Markerproteine (siehe auch Abbildung 7) wurden der detektierten Pixelposition (Laufhöhe) zugeordnet. Aus diesen Koordinaten erstellte die Software eine Regressionsfunktion zur exakten Bestimmung des Molekulargewichts der detektierten Proteine der Proben.



Linear log curve
 $\ln y = 4,27E-006x + 0,2765$
 R² Value: 0,9892

Abbildung 11: Quantity Calibration Mit Hilfe der Bandenintensität der definierten Proteinmengen der Verdünnungsreihe (siehe Abbildung 7) wurde für jedes detektierte Protein eine Regressionsfunktion ermittelt. Die Bandenintensitäten der Proben wurden relativ zur Verdünnungsreihe in prozentalem Volumen angegeben. Das R²-Value (Bestimmtheitsmaß, maximal 1) gibt die Güte der Modellfunktion an.

2.6 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit dem SPSS Softwaresystem (SPSS for Windows, Version 9.0, SPSS, Chicago, IL, USA) und EXCEL2003 (Microsoft GmbH, 85716 Unterschleißheim, Germany) durchgeführt. Für jede Messreihe wurden ein arithmetischer Mittelwert sowie die Standardabweichung ermittelt. Der parametrische zweiseitige t-Test für unabhängige Stichproben wurde zur Determinierung signifikanter Unterschiede zwischen zwei Gruppen verwendet. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant angenommen.

2.7 Experimentelles Protokoll

CCI (1. Versuchsreihe)	Prnp+/+ 15 min post CCI	n = 5
	Prnp+/+ 24 h post CCI	n = 5
CCI (2. Versuchsreihe)	Prnp+/+ Kontrolle	n = 10
	Prnp+/+ Sham	n = 10
	Prnp+/+ 15 min post CCI	n = 10
	Prnp+/+ 24 h post CCI	n = 10
MCAO	Prnp+/+ 1h MCAO mit 24h Reperfusionphase	n = 7
	Prnp+/+ Sham	n = 4
	PrPΔ32-93 1h MCAO mit 24h Reperfusionphase	n = 5
	PrPΔ32-93 Kontrolle	n = 4

3 Ergebnisse

3.1 Präzision der Methoden und Vorversuche

3.1.1 Überprüfung der Schnittdicke

Die Präzision des Kryotoms wurde mittels konfokaler Laser-Mikroskopie überprüft. Die Schnittdicke von jeweils $n = 4$ der 20 μm und 10 μm dicken mit Fluoreszenzfarbstoff gefärbten Maushirnschnitten wurde mit einer Genauigkeit von 10 nm untersucht. Wie dargestellt in Tabelle 1 betrug die durchschnittliche Dicke bei den 10 μm -Schnitten 10,61 μm (min. 9,89 μm - max. 11,23 μm), bei den 20 μm -Schnitten 17,56 μm (min. 14,65 μm - max. 21,55 μm).

10 μm Schnitte			20 μm Schnitte		
Beginn (μm)	Ende (μm)	Differenz (μm)	Beginn (μm)	Ende (μm)	Differenz (μm)
1532,43	1543,57	11,14	1542,28	1557,08	14,8
1530,7	1541,93	11,23	1544,18	1558,83	14,65
1530,34	1540,23	9,89	1535,01	1554,27	19,26
1528,21	1538,38	10,17	1536,39	1557,94	21,55
Mw. (μm)		10,61	Mw. (μm)		17,56
Stabw. (μm)		0,68	Stabw. (μm)		3,41

Tabelle 1: Schnittdicke An jeweils $n = 4$ 20 μm sowie 10 μm dicken Kryoschnitten wurde mittels konfokaler Lasermikroskopie die durchschnittliche Schnittdicke überprüft. Unter Differenz sind die gemessenen Abstände in μm mit errechnetem Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

3.1.2 Vollständigkeit des Lysierens

Die Genauigkeit des Lysierens wurde in einem Vorversuch untersucht. Vor und nach jedem Schritt wurde das Gewicht des Objektträgers mit Nissl-gefärbtem Hirnschnitt mit einer Präzisionswaage bestimmt, um den Verlust an Gewebelysat im Verlauf der Homogenisierung abzuschätzen (siehe Tabelle 2). Unmittelbar nach Auftrag von 20 μl Lysierungspuffer wurde eine Gewichts-differenz von 20,4 μg gemessen (bedingt durch die hohe Dichte der im Puffer enthaltenen Salze und des Glycerins). Der Verlust an Lysierungspuffer durch Verdunstung betrug nach bewusst lang gehaltener 3-minütiger Wartezeit bei Raumtemperatur (21 °C) 0,9 μg (4,4 %). Bei der praktischen Durchführung betrug die Wartezeit für die Wirkung des Lysierungspuffers maximal 1 min. Nach Abnahme des Lysats mit der Pipette verblieben ohne

nachzuspülen 0,4 µg auf dem Objektträger. Dies entspricht einer Gewebeablösung von 98 % bei Raumtemperatur.

Lysierungsprozess				
Prozess	Gewicht mg	Differenz mg		
OT + Schnitt	4867,0			
ad 20 µl Puffer	4887,4	20,4		
nach 3 min.	4886,5	-0,9	Verdunstung	4,40%
Abnahme des Schnittes	4867,4	-19,1	Rest auf OT	2,05%

Tabelle 2: Lysierungsprozess Nach jedem Schritt des Lysierungsprozesses wurde das Gewicht des Objektträgers (OT) bestimmt. Aus den Gewichtsdifferenzen wurden anteilig verdunsteter Puffer und nach dem Lysieren auf dem Objektträger verbliebener Lysatrest errechnet.

3.1.3 Detektionsgrenze der Immunoblot-Technik

Es sollte das minimale mit dem Immunoblot-Verfahren detektierbare Gewebevolumen eines kryofixierten Hirngewebeschnitts ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde bei einem koronaren Maushirn-Schnitt von 20µm Dicke mit dem Skalpell ein kleiner Kortexausschnitt markiert. Der Schnitt wurde eingescannt und nach digitaler Bestimmung der Fläche (0,34 mm²) das Gewebevolumen berechnet. Anschließend wurde das Areal lysiert. Die Probe wurde in 10-facher Wiederholung 1:1 für eine logarithmische Serie verdünnt. Im Immunoblot wurde in jeder Verdünnungsstufe der stabile Zytoskelettmarker β-Aktin immunodetektiert. In der 4. Verdünnungsstufe, entsprechend einer Fläche von 0,021 mm² bzw. einem Gewebevolumen von 42 nl, war die Bande des Zytoskelettmarkers β-Aktin noch sehr gut zu sehen (siehe Abbildung 12). Ein Volumen von 42 nl entsprechend einer Fläche von 0,021 mm², exemplarisch dargestellt in Abbildung 13, ist in etwa äquivalent zu 15 kortikalen Neuronen.

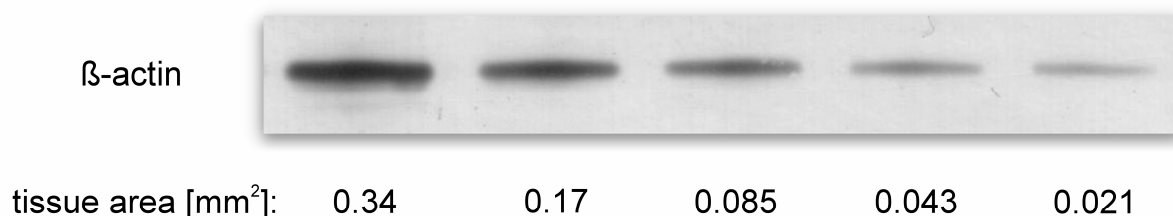


Abbildung 12: Immunoblot mit Verdünnungsserie eines Maushirnschnitts Das Lysat einer Ausschnittfläche eines Maushirnschnitts wurde in logarithmischer Serie 1:1 verdünnt. In der Immunoblot-Analyse wurde das stabile Zytoskelettprotein β-Aktin immunodetektiert. Die Abbildung zeigt die ersten fünf Verdünnungen mit Angabe der zugehörig errechneten Gewebefläche. Die Bande bei 0,021 mm² (42 nl Gewebevolumen) war noch hinreichend detektierbar.

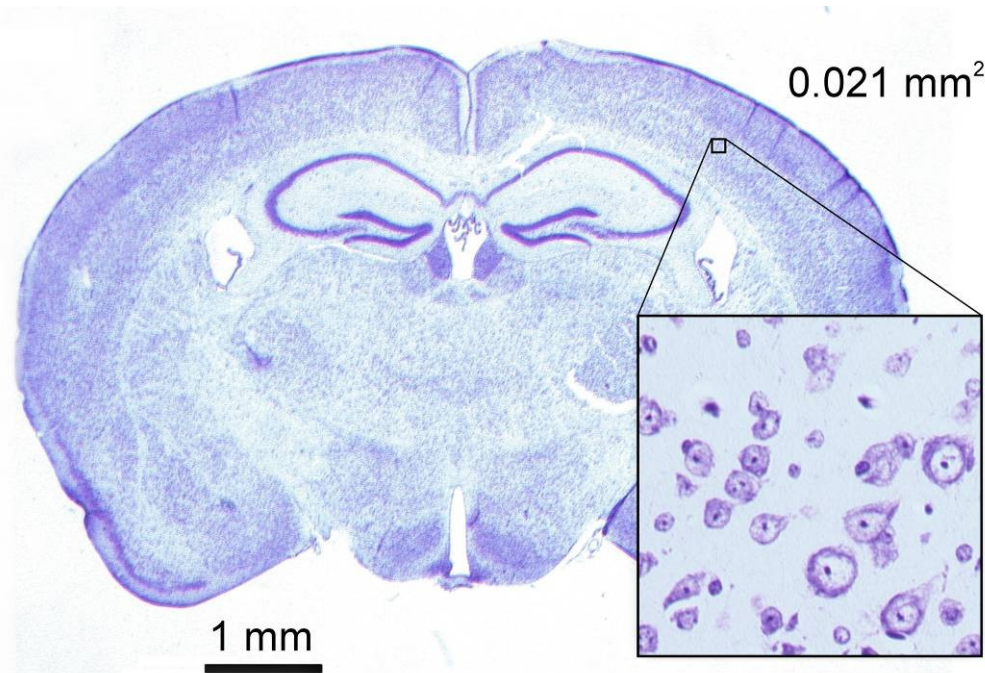
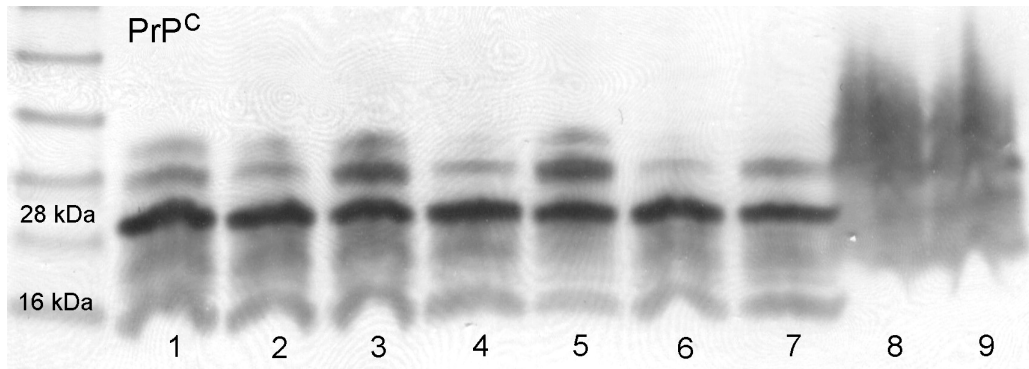


Abbildung 13: *Nissl-Färbung eines koronaren Maushirnschnitts* Der vergrößerte Ausschnitt zeigt exemplarisch eine Kortex-Fläche von $0,021 \text{ mm}^2$ entsprechend 42 nl Gewebewolumen der Immunoblot-Verdünnungsreihe. $0,021 \text{ mm}^2$ eines $20 \mu\text{m}$ dicken Kortex-Schnitts enthalten etwa 15 Neurone.

3.1.4 Deglykosylierung mit PNGase F

Um eine optimale Deglykosylierung und Auftrennung der niedermolekularen Prionprotein-Volllänge mit den Spaltprodukten C1 und C2 im Kryolysat zu erzielen wurden verschiedene Konzentrationen des Enzyms PNGase F sowie des denaturierenden Sodiumdodecylsulfat (SDS) in Lysierungspuffer sowie Puffern des PNGase-Kits getestet, vergleiche Abbildung 14. Es wurde nach einer Konzentration des SDS gesucht, die eine maximale Denaturierung der Proteine ermöglichte ohne das deglykosylierende Enzym zu stark anzugreifen. Am geeignetsten erwies sich der Einsatz jeder Komponente des PNGase-Kits mit 1/5 des Ausgangsvolumens der Probe (siehe Material und Methoden). Ohne die enzymatische Deglykosylierung mit PNGase F bildete sich das Prionprotein im Immunoblot mit deutlicher Verschiebung des Molekulargewichts (ca. 35 kDa) und zahlreichen unspezifischen Banden ab. Eine quantitative Beurteilung der Volllänge und der Spaltprodukte war nur nach weitgehend vollständiger Deglykosylierung möglich. Die PrP^C-Volllänge wurde bei ca. 28 kDa, das Spaltprodukt C2 bei ca. 21 kDa sowie das Spaltprodukt C1 bei ca. 16 kDa detektiert.



Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SDS (%)	1	1	1	1	1	1	1	0,1	0,1
PNGase (μl) (PNGase-Kit)	1	0,5	0,25	1	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5
Denaturierungspuffer (PNGase-Kit)	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Zeit (h)	1	1	1	1	1	12	12	1	12

Abbildung 14: Vollständigkeit der Deglykosylierung Für eine bestmögliche Auftrennung des PrP^C wurden an jeweils 10 μl Hirnschnitt-Lysat verschiedene PNGase- und Pufferkonzentrationen sowie Dauer des enzymatischen Verdau getestet (vergleiche Tabelle unten und Kapitel 2.5.7). Am geeignetsten erwies sich die Zusammensetzung in Lane 4: hier wurde eine saubere Proteinauftrennung ohne Verschmieren bei kleinstmöglichem Rest unspezifischer Banden erzielt. Die Dauer des enzymatischen Verdau hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis.

3.2 Controlled Cortical Impact (CCI)

3.2.1 Histologie und Immunhistochemie

Die traumatische Verletzung der linken Hemisphäre schloss zumeist den Mortorkortex mit höher gelegenen Anteilen der Hippocampus-Formation sowie kleine Teile des sensorischen Kortex ein. Die primäre mechanische Verletzung durch den Stößel verursachte eine stempel-förmige Impression des Kortex umgeben von einem blassen Saum nekrotischen Gewebes. Die immunhistochemische Färbung des PrP^C (PrP^C-Antikörper CDC1) in Prnp^{+/+}-Hirnen 24 h nach CCI zeigte eine abgeschwächte Anfärbung des nekrotischen Impressionstraumas und der Penumbra (siehe Abbildung 15). Angrenzend an die Penumbra waren zahlreiche angeschwollene Axone mit sehr starker Farbreaktion zu sehen. Bei einzelnen Neuronen war zusätzlich das Zytoplasma angefärbt, viele Pyramidalzellen der Hippocampus-Formation zeigten eine vermehrte Immunreaktivität. Zusätzlich wurden zur Kontrolle von allen Schnittstufen Färbungen des ubiquitären Zytoskelettmarkers β-Aktin angefertigt. Im nekrotischen Areal war 24

h nach Trauma eine deutliche Minderung der β -Aktin-Farbreaktion feststellbar. Die β -Aktin-Verteilung im vitalen Gewebe war weitgehend homogen.

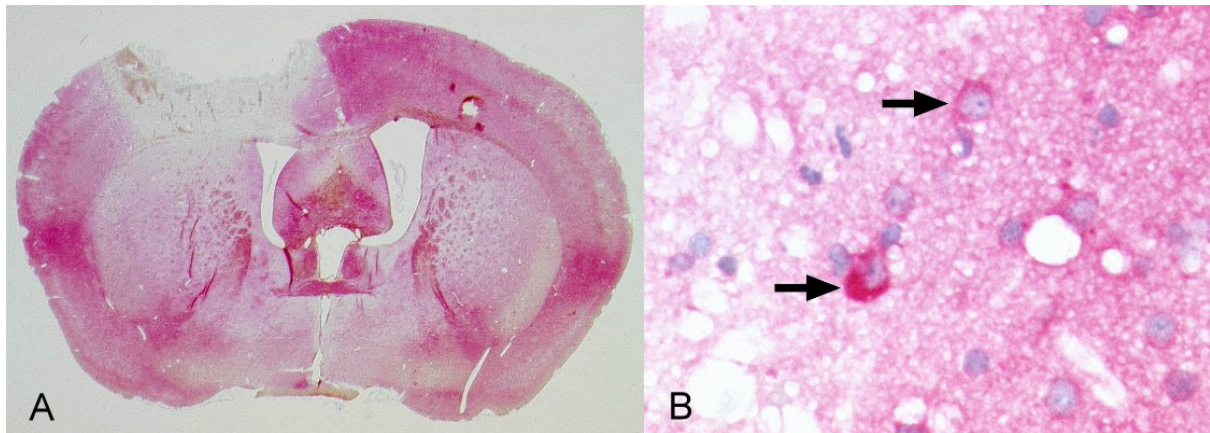


Abbildung 15: *PrP^C-Färbung eines Prnp^{+/+}-Maushirns 24h nach Trauma* A: 24 h nach CCI war die linkskortikale Impressionenläsion mit schwach angefärbter Penumbra deutlich abgrenzbar B: Bei höherer Vergrößerung fanden sich in der Penumbra zahlreiche geschwollene Axone und vereinzelte stark immunoreaktive Neurone (→). Die Färbung erfolgte mit dem panreaktiven polyklonalen PrP-Antikörper CDC1.

3.2.2 Volumetrische Messungen bei CCI

Die unmittelbare Läsion des Impressionstraumas wurde 15 min nach CCI untersucht: es zeigten sich vergleichbar kleine Kontusionsvolumina von $6,5 \% \pm 2,0 \%$ des totalhemisphärischen Volumens bei den Prnp0/0 (n = 7) sowie $7,0 \% \pm 0,4 \%$ bei den Prnp+/+ Mäusen (n = 6). Das maximale Ausmaß der sekundären Läsion wurde bei allen Mäusen 24 h nach CCI in Höhe des Bregma gefunden. Beim Vergleich der relativen Läsionsvolumina der drei Gruppen 24 h nach CCI, dargestellt in Abbildung 16, zeigten die Prnp0/0 Mäuse (n = 7) das größte Läsionsvolumen mit $11,3 \% \pm 1,0 \%$ des totalen hemisphärischen Volumens. Das Läsionsvolumen der hemizygoten Prnp+/0 Mäuse (n = 7) erreichte $10,5 \% \pm 1,0 \%$ des totalen hemisphärischen Volumens. Die Prnp+/+ Wildtyp-Mäuse (n = 6) zeigten die kleinsten Läsionsvolumina mit $9,8 \% \pm 0,8 \%$ des totalen hemisphärischen Volumens. Demnach vergrößerte sich die primäre Läsion (15 min nach CCI) in 24 h 1,73-fach in Prnp0/0 und 1,52-fach in Prnp+/+ Mäusen. In allen Hirnen war nach 24 h ein Mittellinien-Shift nach rechts zu sehen mit vergleichbarem Volumen-Verhältnis von ipsilateraler zu kontralateraler Hemisphäre: 1,1 % bei Prnp-knock-out, 1,2 % bei hemizygoten Prnp+/0 und 1,1 % beim Prnp-Wildtyp.

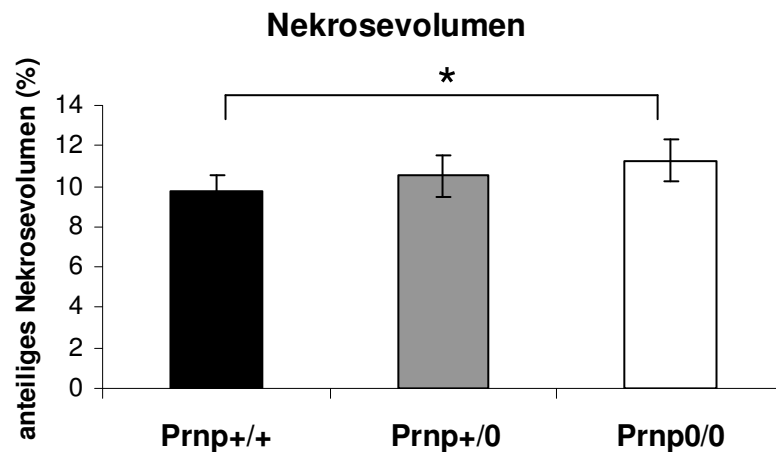


Abbildung 16: Relative Läsionsvolumina 24h nach CCI in Prnp+/+, Prnp+/- und Prnp0/0 Mäusehirnen Das größte Läsionsvolumen bezogen auf das Volumen der ipsilateralen Hemisphäre wiesen die Prnp0/0-Tiere auf, signifikant größer als die Wildtyp-Littermates (*p < 0,05)

3.2.3 Immunoblot-Analyse und Densitometrie

Die Immunoblot-Analyse wurde an kresylviolettgefärbten Kryo-Hirnschnitten der größten Infarkt-Ausdehnung (3 mm ab Bregma) durchgeführt. Verglichen wurden Mäuse 15 min und 24h nach CCI mit Sham- und unbehandelten Kontrolltieren. Die Proben wurden vor der Gelelektrophorese mit PNGase F deglykosyliert, um das Molekulargewicht exakt bestimmen zu können. Bei Detektion mit dem PrP-Antikörper 4H11 zeigte sich die PrP^C-Volllänge als scharfe und stark gefärbte Bande bei 28,5 kDa. Eine zusätzliche tiefere Bande wurde bei 16 kDa beobachtet und entspricht dem C1-Fragment des PrP^C. Das C2-Fragment des PrP^C war dazwischen schwach sichtbar bei 21 kDa. Als Referenzprotein wurde zusätzlich β -Aktin (43 kDa), ein ubiquitärer und stabiler Zytoskelettmarker, mit dem Primär-Antikörper Actin I-19 immunodetektiert. Die Intensität der Banden wurde anhand der Kalibrierung densitometrisch quantifiziert. Es wurden die Intensitätswerte (dimensionslos, bezogen auf die Prozentwerte der Konzentrationsreihe auf jedem Gel) des β -Aktins, der PrP^C-Volllänge sowie des C1-Fragments bezogen auf das histologische Gewebenvolumen ermittelt. Die Intensitätswerte der PrP^C-Volllänge und des C1-Fragments wurden zusätzlich mit den Werten des β -Aktins jeder Lane abgeglichen, um Gewebeschwankungen der Proben durch Nekrose oder Ödem beurteilen zu können.

Vergleich der Prnp+/+-Littermate-Mäuse 15 min und 24h post CCI

In einem ersten Versuch wurden die Hemisphären von jeweils n = 5 Prnp+/+-Littermate-Mäusen der Gruppen 15 min und 24 h post CCI untersucht. Die Messungen zeigten in der

ipsilateralen Hemisphäre eine signifikante Reduktion ($p < 0,01$) der Intensität des β -Aktins 24h nach CCI (ipsilateral $67,2 \pm 6,4$ und kontralateral $100,6 \pm 31,0$) im Vergleich zu 15 min nach CCI (ipsilateral $79,4 \pm 19,7$ und kontralateral $78,5 \pm 8,2$), siehe Abbildung 17. Wie in Abbildung 18 dargestellt, war die Intensität der PrP^C-Volllänge ebenfalls ipsilateral 24 h nach CCI ($34,5 \pm 10,0$) im Vergleich mit 15 min nach CCI ($64,7 \pm 17,8$) signifikant gesunken ($p < 0,02$), beim Vergleich der kontralateralen Hemisphären (24 h post Trauma $54,8 \pm 15,6$ und 15 min post Trauma $74,8 \pm 22,3$) findet sich ein Trend. Auch das PrP^C-Fragment C1 zeigte in beiden Hemisphären ein Absinken 24h nach CCI (ipsilateral $43,8 \pm 29,2$ und kontralateral $62,1 \pm 25,1$) verglichen mit 15 min nach CCI (ipsilateral $70,1 \pm 17,1$ und kontralateral $87,7 \pm 9,2$), $p < 0,06$ beim Vergleich der ipsilateralen Hemisphären, siehe Abbildung 19. In Relation zu dem Zytoskelettmarker β -Aktin sanken 24 h nach CCI verglichen mit 15 min nach CCI die Intensitäten sowohl der PrP^C-Volllänge (24 h post Trauma ipsilateral $48,5 \pm 24,3$ und kontralateral $63,0 \pm 31,3$ sowie 15 min post Trauma ipsilateral $85,1 \pm 41,0$ und kontralateral $102,7 \pm 72,2$) als auch des PrP^C-Fragments C1 (24 h post Trauma ipsilateral $51,5 \pm 31,2$ und kontralateral $66,4 \pm 55,2$ sowie 15 min post Trauma ipsilateral $86,8 \pm 83,6$ und kontralateral $105,5 \pm 56,0$) in beiden Hemisphären, vergleiche Abbildung 20 und Abbildung 21. 24 h nach CCI zeigte die Ratio der PrP^C-Fragment C1 zur PrP^C-Volllänge ipsilateral (24 h post Trauma $82,2 \pm 49,9$ und 15 min post Trauma $50,2 \pm 18,0$) wie kontralateral (24 h post Trauma $75,3 \pm 33,5$ und 15 min post Trauma $49,6 \pm 8,6$) einen Anstieg zugunsten des C1-Fragments, dargestellt in Abbildung 22, allerdings mit erheblichen Schankungen der Werte – das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht.

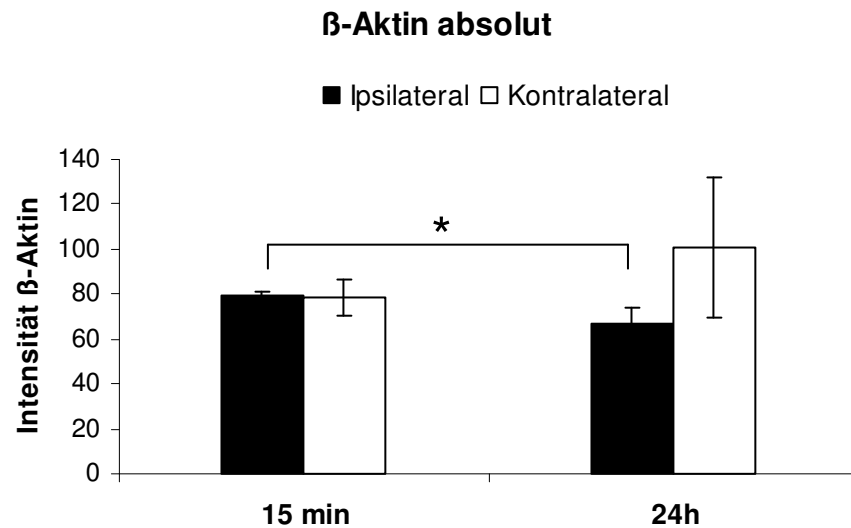


Abbildung 17: Quantifizierung des β-Aktins nach CCI (Vorversuch) 24 h nach CCI zeigen die absoluten Intensitätswerte des Zytoskelettmarkers β-Aktin eine signifikante Reduktion in der ipsilateralen Hemisphäre im Vergleich mit der ipsilateralen Hemisphäre der Versuchsgruppe 15 min nach CCI (* $p < 0,01$). Die Messwerte für die kontralaterale Hemisphäre der Mäuse 24 h nach CCI streuen stark.

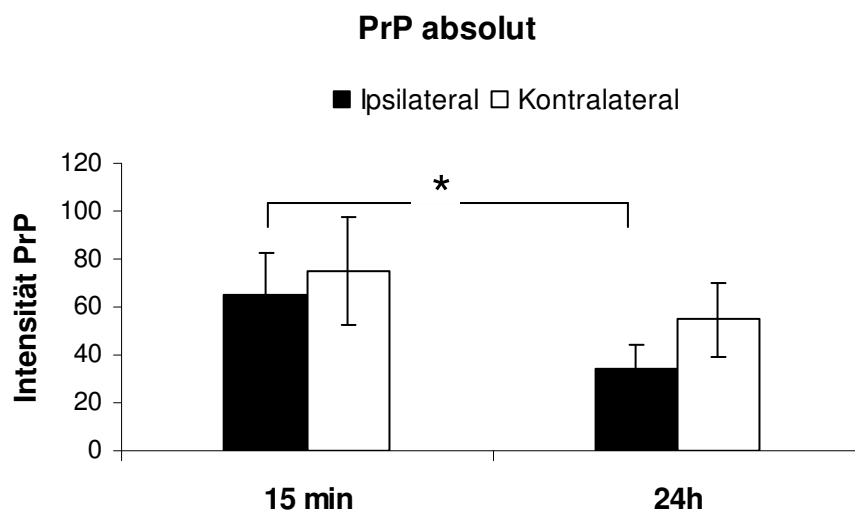


Abbildung 18: Quantifizierung der PrPC-Volllänge nach CCI (Vorversuch) 24 h nach CCI zeigen die absoluten Intensitätswerte des Zytoskelettmarkers β-Aktin eine signifikante Reduktion in der ipsilateralen Hemisphäre im Vergleich mit der ipsilateralen Hemisphäre der Versuchsgruppe 15 min nach CCI (* $p < 0,02$). Die Werte der kontralateralen Seite zeigen einen Trend.

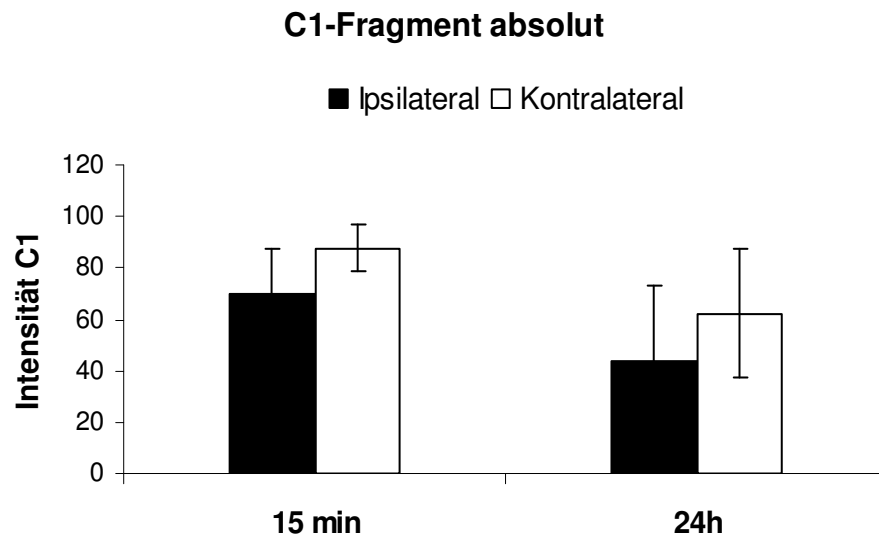


Abbildung 19: Quantifizierung des C1-Fragments nach CCI (Vorversuch) 24 h nach CCI zeigen die absoluten Intensitätswerte des C1-Fragments in beiden Hemisphären eine Reduktion im Vergleich mit der Versuchsgruppe 15 min nach CCI (beim Vergleich der ipsilateralen Hemi-sphären betrug das p-Value 0,06).

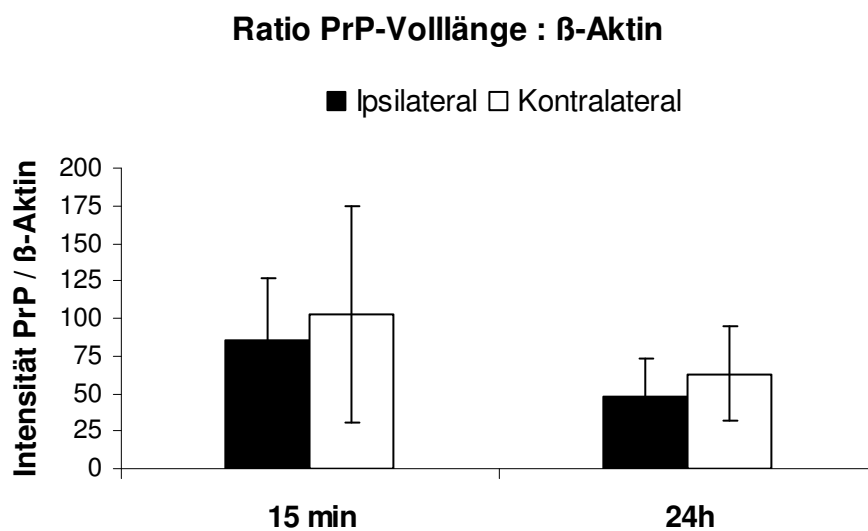


Abbildung 20: Ratio PrPC-Volllänge und β -Aktin nach CCI (Vorversuch) 24 h nach CCI zeigt die Ratio der PrPC-Volllänge mit dem Zytoskelettmarker β -Aktin in beiden Hemisphären eine Reduktion im Vergleich mit der Versuchsgruppe 15 min nach CCI.

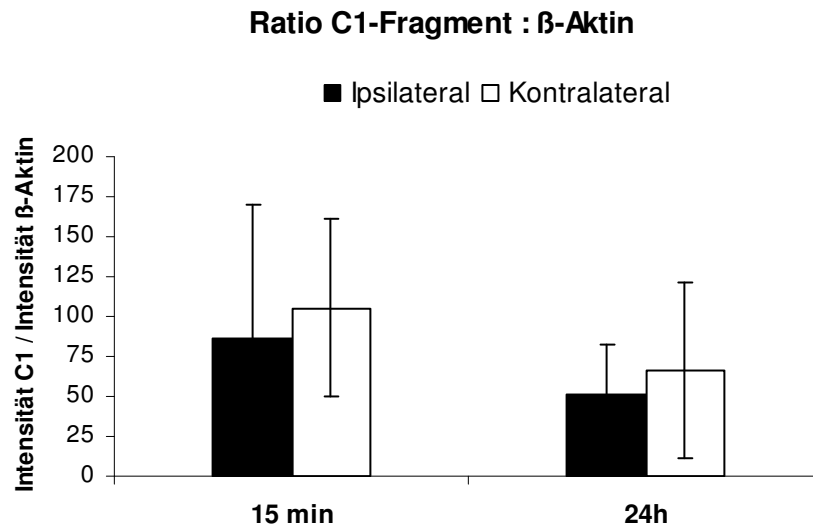


Abbildung 21: Ratio C1-Fragment und β -Aktin nach CCI (Vorversuch) 24 h nach CCI zeigt die Ratio des C1-Fragment mit dem Zytoskelettmarker β -Aktin in beiden Hemisphären eine Reduktion im Vergleich mit der Versuchsgruppe 15 min nach CCI.

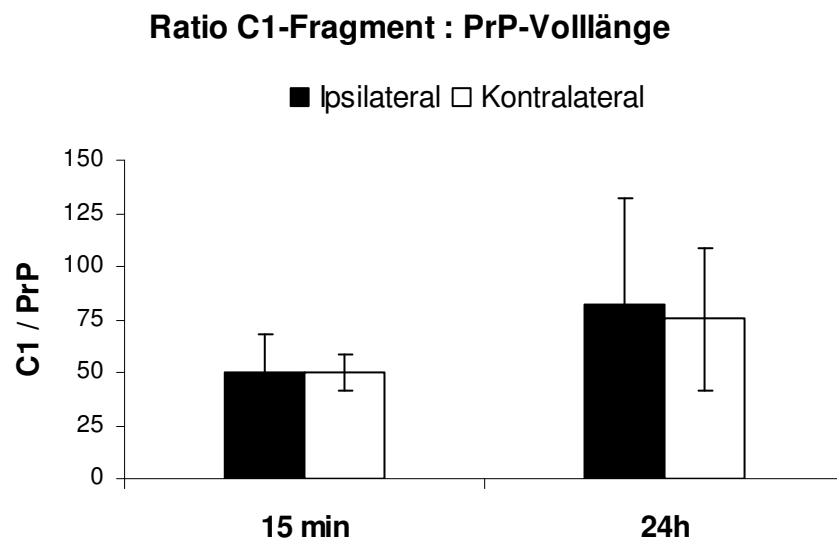


Abbildung 22: Ratio C1-Fragment und PrPC-Volllänge nach CCI (Vorversuch) 24 h nach CCI zeigt die Ratio des C1-Fragments mit der PrPC-Volllänge in beiden Hemisphären. Die Werte der Ratios streuen stark. Der Anstieg zugunsten des C1-Fragments im Vergleich mit der Versuchsgruppe 15 min nach CCI ist nicht signifikant.

Vergleich der Prnp+/+-Littermate-Mäuse Kontrolle, Sham, 15 min und 24h post CCI

Um die beobachteten Auswirkungen des CCI genauer zu untersuchen, wurde der Versuch erweitert: Es wurden jeweils $n = 10$ Prnp+/+-Littermates der Gruppen 15 min nach CCI und 24h nach CCI mit Sham-behandelte sowie unbehandelten Kontrollen verglichen. Abbildung 23 und Abbildung 24 zeigen exemplarisch Immunoblots dieser Versuchsreihe. Wie in Abbildung 25 dargestellt zeigten die dimensionslosen Intensitätswerte des Zytoskelettmarkers β -Aktin nach Trauma eine signifikante Reduktion in der ipsilateralen Hemisphäre (24 h post Trauma $116,4 \pm 31,2$ sowie 15 min post Trauma $106,8 \pm 24,3$) im Vergleich mit der ipsilateralen Hemisphäre der Versuchsgruppen Sham ($152,3 \pm 24,7$) und Kontrolle ($129,6 \pm 21,7$), alle $p < 0,05$. Die Werte der kontralateralen Hemisphären zeigen einen Trend und streuen bei den Kontrollmäusen stark (24 h post CCI $135,1 \pm 28,2$, 15 min post CCI $112,3 \pm 28,4$, Sham $145,1 \pm 29,6$, Kontrolle $202,5 \pm 201,3$). Die PrP^C-Volllänge zeigte sowohl ipsi- als auch kontralateral nach CCI (24 h post CCI ipsilateral $101,4 \pm 29,5$ und kontralateral $118,9 \pm 27,4$ sowie 15 min post CCI ipsilateral $88,9 \pm 38,3$ und kontralateral $107,2 \pm 26,3$) beim Vergleich mit der Shamgruppe (ipsilateral $196,8 \pm 57,6$ und kontralateral $203,2 \pm 70,3$) eine signifikante Reduktion der Intensitätswerte auf das Niveau der Kontrollmäuse (ipsilateral $108,8 \pm 38,2$ und kontralateral $124,5 \pm 49,7$), alle $p < 0,01$, siehe Abbildung 26. Weiterhin zeigte sich beim Vergleich mit den Sham-Tieren (ipsilateral $157,8 \pm 68,1$ und kontralateral $156,7 \pm 68,2$) 15 min nach CCI in beiden Hemisphären (ipsilateral $76,2 \pm 46,8$ und kontralateral $97,0 \pm 57,5$) eine signifikante Reduktion der absoluten Intensitätswerte des C1-Fragments unter das Niveau der Kontrollmäuse (ipsilateral $114,4 \pm 74,9$ und kontralateral $111,8 \pm 53,4$). 24h nach CCI (ipsilateral $96,8 \pm 56,1$ und kontralateral $106,1 \pm 56,5$) fand sich im Vergleich mit den Sham-Littermates ipsilateral eine signifikante Reduktion, kontralateral ein entsprechender Trend, alle $p < 0,05$, siehe Abbildung 27. Diese Daten bestätigten die immunhistochemischen Färbungen quantitativ.

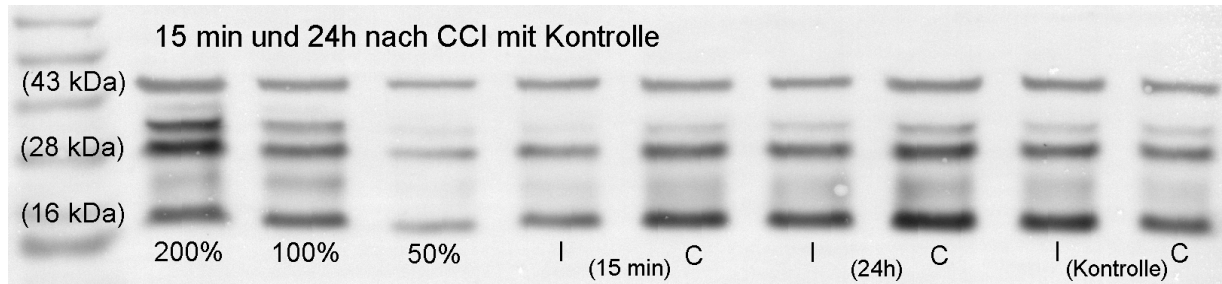


Abbildung 23: Beispiel-Blot Littermates 15 min und 24h nach CCI sowie Kontrolle Immunodetektiert wurden β -Aktin (43 kDa) und deglykosyliertes PrPC mit Volllänge (28 kDa) und Fragmenten C1 (16 kDa) sowie C2 (zarte Bande bei ca. 21 kDa). Lane 1 enthält einen Proteinmarker, Lane 2-4 eine Konzentrationsreihe aus Prnp^{+/+}-Sham-Hirnlysate. In Lane 5-10 sind Proben der ipsi- und kontralateralen Hemisphären (I und C) von Prnp^{+/+}-Mäusen 15 min und 24h nach CCI sowie einer Kontroll-Littermate-Maus aufgetragen. Die Banden Proben der ipsilateralen Hemisphären (I) nach CCI stellen sich aufgrund der Gewebeläsion etwas schwächer als kontralateral (C) dar. Die Intensitätsverschiebung der Banden von PrPC-Volllänge zugunsten des Fragments C1 nach CCI verglichen mit den Banden der Verdünnungsreihe (Sham-Hirnlysate) ist deutlich zu sehen.

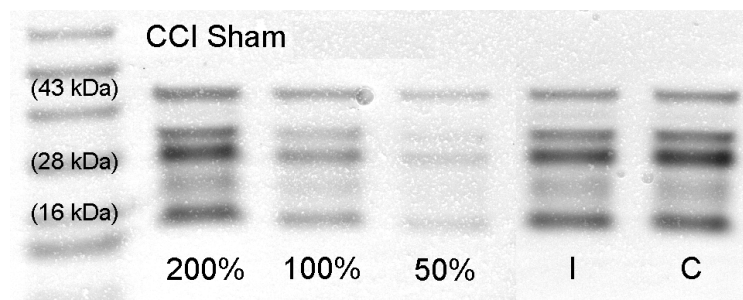


Abbildung 24: Beispiel-Blot der Proben einer Maus mit CCI-Sham-Behandlung Lane 1 enthält einen Proteinmarker, Lane 2-4 eine Konzentrationsreihe aus Prnp^{+/+}-Sham-Hirnlysate. In Lane 5,6 sind Proben der ipsi- und kontralateralen Hemisphären (I und C) von Prnp^{+/+}-Sham-Mäusen aufgetragen. Im Unterschied zu den CCI-Mäusen zeigen die Sham-Tiere keine Intensitätszunahme der C1-Banden (vergleiche die vorangehende Abbildung 23).

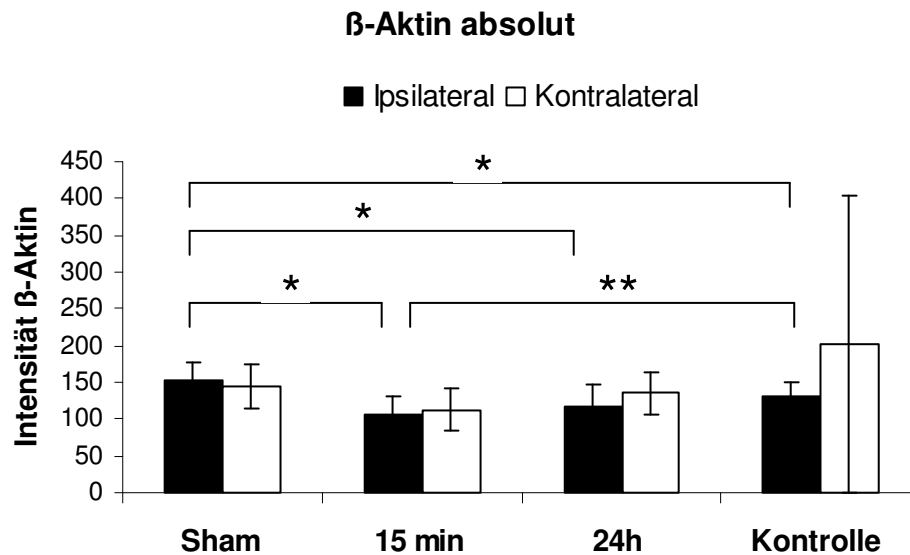


Abbildung 25: Quantifizierung des β -Aktins bei *Prnp*^{+/-}-CCI sowie Sham- und Kontroll-Littermates Nach CCI zeigen die absoluten Intensitätswerte des Zytoskelettmarkers β -Aktin eine signifikante Reduktion in der ipsilateralen Hemisphäre im Vergleich mit der ipsilateralen Hemisphäre der Versuchsgruppen Sham und Kontrolle (alle * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$). Die Werte der kontralateralen Hemisphären zeigen einen Trend. Die Messwerte für die kontralaterale Hemisphäre der Kontrollmäuse streuen stark.

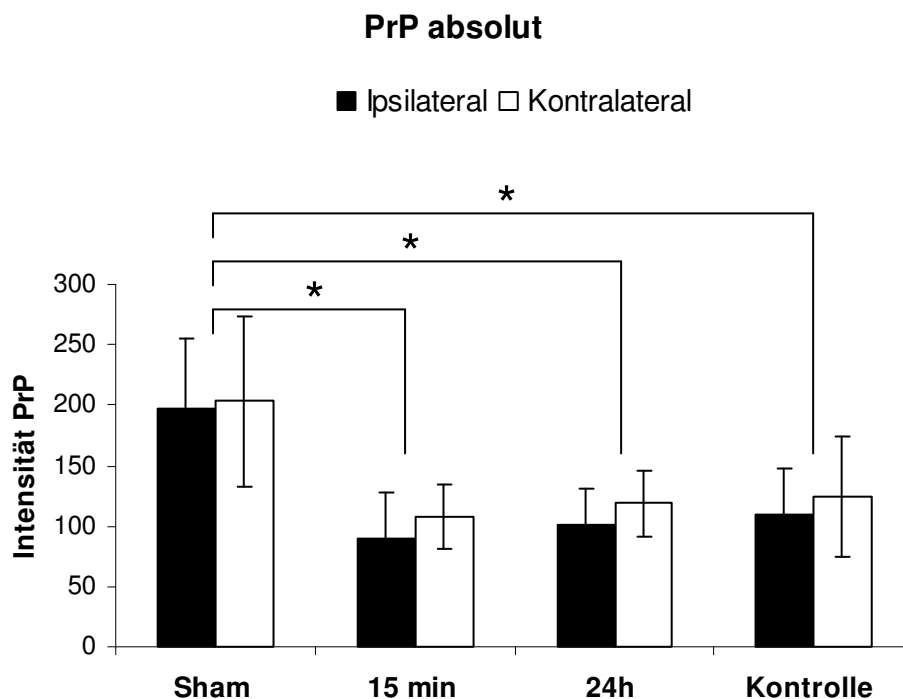


Abbildung 26: Quantifizierung der PrPC-Volllänge bei *Prnp*^{+/-}-CCI sowie Sham- und Kontroll-Littermates Beim Vergleich mit der Shamgruppe zeigt sich nach CCI jeweils im Vergleich der Hemisphären sowohl ipsi- wie auch kontralateral eine signifikante Reduktion der absoluten Intensitätswerte der PrPC-Volllänge auf das Niveau der Kontrollmäuse (alle * $p < 0,01$).

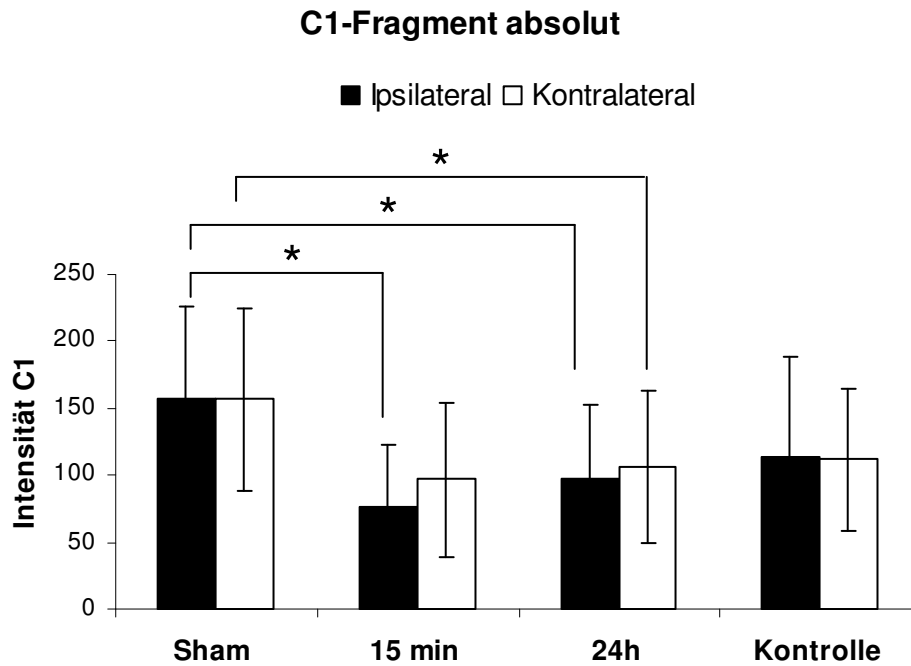


Abbildung 27: Quantifizierung des C1-Fragments bei *Prnp*^{+/+}-CCI sowie Sham- und Kontroll-Littermates Beim Vergleich mit der Shamgruppe zeigt sich nach CCI in der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre 15 min nach CCI eine signifikante Reduktion der absoluten Intensitätswerte des C1-Fragments unter das Niveau der Kontrollmäuse. 24h nach CCI zeigt sich im Vergleich mit den Sham-Littermates ipsilateral eine signifikante Reduktion, kontralateral zeigt sich ein Trend (alle * $p < 0,05$).

Die höhere Anzahl n erlaubt bei diesem Versuch eine bessere Betrachtung der Protein-Ratios. Es wurden jeweils ipsilaterale bzw. kontralaterale Hemisphären untereinander verglichen. Die PrP^C-Volllänge in Relation zu dem Referenzprotein β -Aktin zeigte sich nach CCI sowohl in der Gruppe der 15 min post CCI (ipsilateral $86,9 \pm 14,0$ und kontralateral $96,2 \pm 14,9$) als auch der Gruppe 24h post CCI (ipsilateral $89,9 \pm 21,9$ und kontralateral $90,0 \pm 15,8$) auf dem Niveau der Kontrollmäuse (ipsilateral $85,7 \pm 30,0$ und kontralateral $83,8 \pm 25,1$). In dieser Relation waren die Ratios der drei Gruppen beim Vergleich mit den Sham-Tieren (ipsilateral $130,2 \pm 35,5$ und kontralateral $141,7 \pm 58,7$) in beiden Hemisphären signifikant erhöht (alle $p < 0,05$), vergleiche Abbildung 28. Die Ratio des Spaltungsprodukts C1 mit β -Aktin nach CCI (24 h post CCI ipsilateral $91,6 \pm 48,0$ und kontralateral $85,1 \pm 38,7$ sowie 15 min ipsilateral $88,0 \pm 35,3$ und kontralateral $85,7 \pm 42,9$) sowie die Kontrolltiere (ipsilateral $97,3 \pm 70,9$ und kontralateral $102,0 \pm 74,5$) zeigten eine relativ große Streuung. Der niedrige Wert der Sham-behandelten Littermates (ipsilateral $78,4 \pm 16,4$ und kontralateral $75,4 \pm 21,8$) ist nicht signifikant, dargestellt in Abbildung 29. Die Ratio C1 / PrP^C-Volllänge (24 h post CCI ipsilateral $93,0 \pm 45,9$ und kontralateral $86,8 \pm 36,0$, 15 min ipsilateral $89,5 \pm 32,5$ und kontralateral $87,1 \pm 40,8$, Sham ipsilateral $78,5 \pm 16,4$ und kontralateral $75,4 \pm 21,7$, Kontrolle ipsilateral $100,7$

$\pm 68,0$ und kontralateral $111,8 \pm 72,4$) streut ebenfalls stark und erreicht im Vergleich nicht das Signifikanzniveau, siehe Abbildung 30.

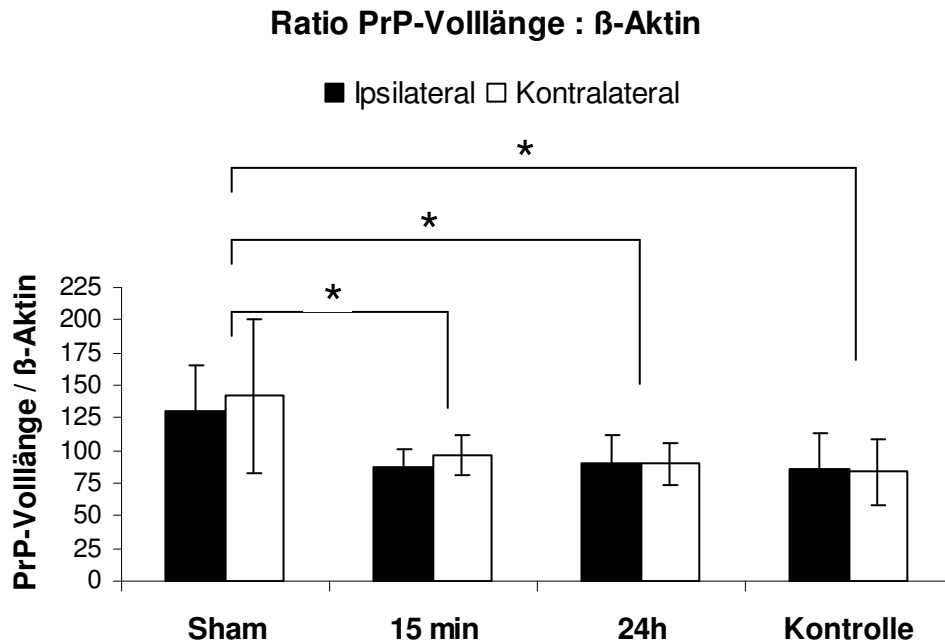


Abbildung 28: Ratio PrPC-Volllänge zu β -Aktin bei *Prnp*^{+/+}-CCI sowie Sham- und Kontroll-Littermates Beim Vergleich der jeweiligen Hemisphären mit der Shamgruppe zeigt sich nach CCI sowohl ipsilateral, als auch der kontralateral eine signifikante Reduktion der PrP^C-Volllänge (in Relation zu dem Referenzprotein β -Aktin) auf das Niveau der Kontrollmäuse (alle * $p < 0,05$).

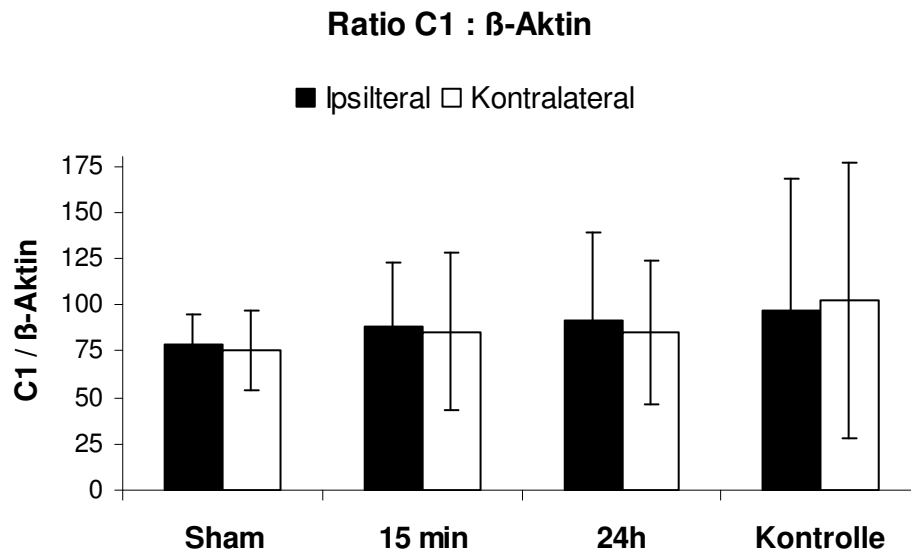


Abbildung 29: Ratio C1-Fragment und β -Aktin bei *Prnp+/+*-CCI sowie Sham- und Kontroll-Littermates Das Verhältnis des PrPC- α -Cleavage-Produkts C1 zu dem Referenzprotein β -Aktin wurde anhand der densitometrischen Daten errechnet. Es zeigte sich ein Anstieg des Spaltprodukts nach CCI verglichen mit Sham-behandelten Littermates. Die Littermates der unbehandelten Kontrollgruppe zeigen eine hohe Streuung der Messwerte.

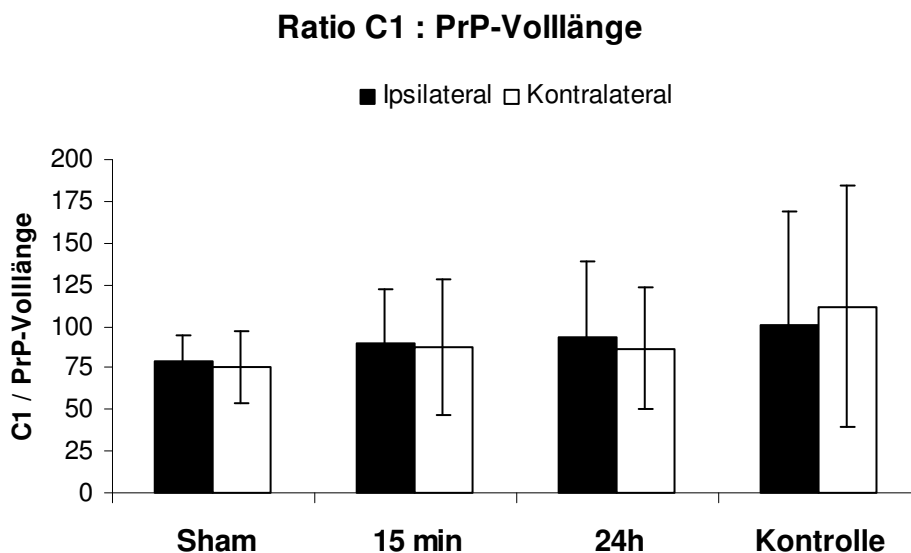


Abbildung 30: Ratio C1 : PrP-Volllänge bei *Prnp+/+*-CCI sowie Sham- und Kontroll-Littermates Das Verhältnis des PrPC- α -Cleavage-Produkts C1 zur PrP-Volllänge wurde anhand der densitometrischen Daten errechnet. Es zeigte sich ein Anstieg des Spaltprodukts nach CCI verglichen mit Sham-behandelten Littermates. Die unbehandelten Littermates (Kontrolle) zeigen eine hohe Streuung der Messwerte.

3.3 *Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO)*

3.3.1 Histologie und Immunhistochemie

Die Nervenzellen der Infarkt-Region zeigten in den Nissl gefärbten Schnitten eine sehr schwache Färbung und erschienen geschrumpft mit schmalen pyknotischen oder fragmentierten Kernen. Häufig wurden vakuoläre Veränderungen beobachtet. Der polyklonale CDC1-Antikörper (Kaninchen), gerichtet gegen rekombinantes Volllänge-Maus-PrP^C, reagierte stark an Neuronen und auch Gliazellen besonders in Hippocampus und Neokortex der Prnp^{+/+}- und C4/0-MCAO-Tiere. In der nekrotischen Infarktregion fand sich keine immunologische PrP-Farbreaktion. Die Penumbra der Infarkt-Region zeigte dagegen punktuell intensive PrP^C-Immunoreaktivität. An Prnp^{0/0}-Littermates-Kontrollschnitten zeigte sich keine Reaktion des gegen PrP gerichteten Antikörpers (siehe Abbildung 31). Sowohl in Prnp^{0/0}- als auch in C4/0-Mäusen war im Gegensatz zu Prnp^{+/+}-Mäusen eine ausgeprägte Schwellung der ischämischen Hemisphäre mit Mittellinienverlagerung zur kontralateralen Seite festzustellen. Nach 24-stündiger Reperfusionphase nach 1 h Ischämie wurden in allen Gruppen klar begrenzte Läsionen in der ischämischen Hemisphäre gefunden. In Prnp^{0/0}- und C4/0-Mäusen reichten Läsionen vom Vorderhirn bis einige Millimeter hinter das Bregma. Analog fand sich bei allen Gruppen in der Infarktregion kaum β -Aktin Immunoreaktivität. Die Verteilungsmuster von PrP^C und β -Aktin wurden mittels Immunfluoreszenz-Färbemethode dargestellt (vergleiche Abbildung 32). Es zeigte sich eine betonte Färbung des β -Aktins in den Basalganglien und äußeren Kortexschichten und schwächere Färbung des Corpus callosum. Das Muster des PrP^C verhielt sich zum β -Aktin nahezu entgegengesetzt.

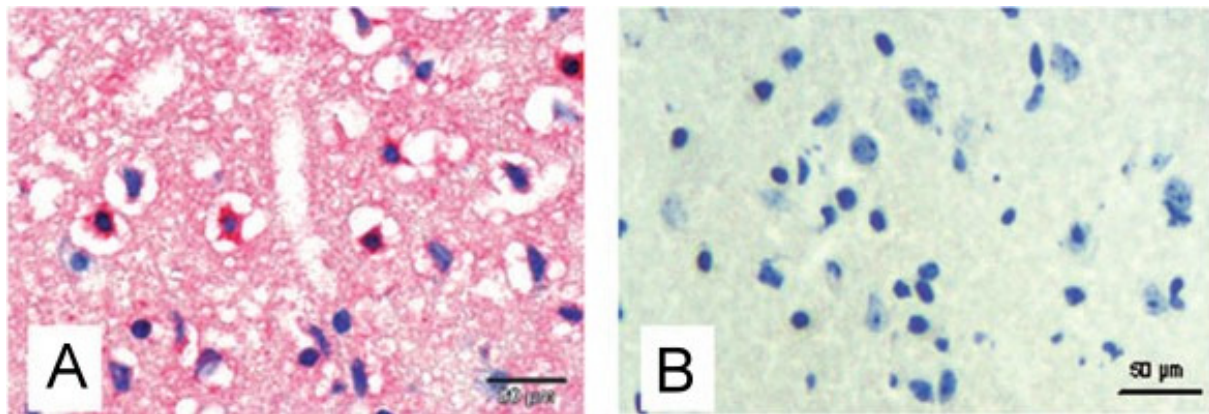


Abbildung 31: Immunhistochemische Färbungen mit dem polyklonalen PrPC-Antikörper CDC1
 A: Der Ausschnitt aus der Infarkt-Penumbra einer PrP+/+-Maus nach MCAO zeigt eine Anzahl stark immunreaktiver Neurone, während andere Neurone und Gliagewebe negativ erscheinen B: In den Kontroll-Schnitten der Prnp0/0-Littermates wurde keine Reaktion des Antikörpers detektiert.

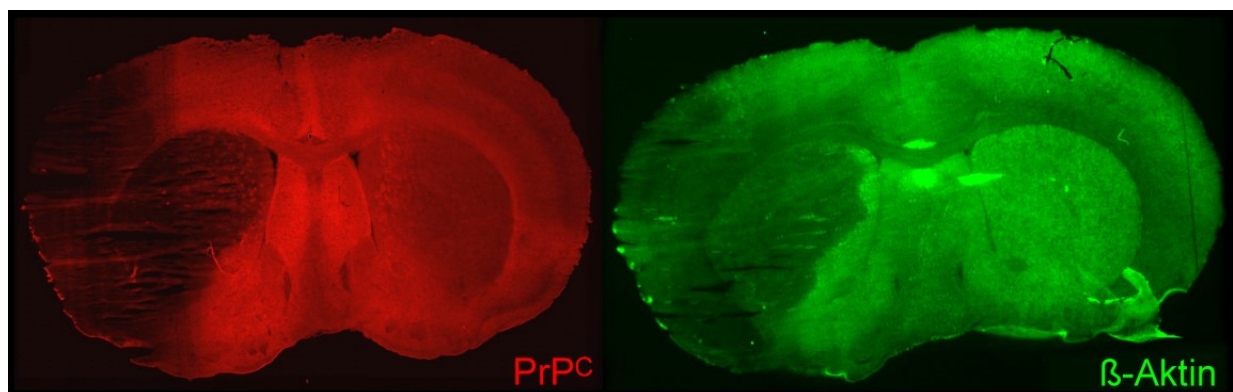


Abbildung 32: PrPC- und β -Aktin-Immunfluoreszenz-Färbung Von formalinfixierten koronaren Kryo-Hirnschnitten einer Prnp+/+-Maus nach MCAO wurden Immunfluoreszenz-Färbungen angefertigt. In beiden Hirnen findet sich eine geminderte Farbreaktion des nekrotischen Infarktgewebes. PrP^C und β -Aktin zeigen im vitalen Gewebe nahezu gegensätzliche Verteilungsmuster: der stabile Zytoskelettmarker β -Aktin findet sich vermehrt in äußeren Kortex-Schichten und Basalganglien, PrPC vermehrt in tieferen Kortexschichten, Septumkernen und Hypothalamus.

3.3.2 Volumetrie

Verglichen wurden Prnp+/+-Mäuse (n = 7) und C4(PrP Δ 32-93)/Prnp0/0-Mäuse (n = 8) mit Prnp0/0-Littermates (n = 9). Von jeder Schnittstufe aller 1 h MCAO mit 24 h Reperfusion unterworfenen Hirne wurde eine Nissl-Färbung angefertigt. Die schwach angefärbten Areale der Schädigung waren bereits makroskopisch deutlich abgrenzbar und wurden nach mikroskopischer Aufnahme mit Optimas Imaging Software metrisch bestimmt. Die ischämischen

Läsionen reichten vom Vorderhirn bis einige Millimeter hinter das Bregma mit maximaler Ausdehnung in Höhe des Bregma. Abbildung 33 zeigt exemplarisch die Verteilung des Läsionsvolumens einer Prnp^{+/+}-Maus über die histologischen Schnittstufen. Die Läsionsvolumina betragen $10,06 \text{ mm}^3 \pm 4,8 \text{ mm}^3$ in Prnp^{+/+} Mäusen, $34,78 \text{ mm}^3 \pm 12,99 \text{ mm}^3$ in Prnp^{0/0} Mäusen und $33,54 \text{ mm}^3 \pm 14,93 \text{ mm}^3$ in C4/0 Mäusen. Bei den Prnp^{0/0} und C4/0 Mäusen war ein schwer ausgeprägtes Ödem der betroffenen Hemisphäre mit Mittellinienverschiebung feststellbar. Die Volumina der Hemisphären betragen bei Prnp^{+/+} Mäusen $50,19 \text{ mm}^3 \pm 19,5 \text{ mm}^3$ ipsilateral und $50,89 \text{ mm}^3 \pm 19,88 \text{ mm}^3$ die kontralateral. Bei den Prnp^{0/0} Mäusen waren es $86,45 \text{ mm}^3 \pm 18,4 \text{ mm}^3$ für die ipsilaterale Hemisphäre und $79,20 \text{ mm}^3 \pm 15,03 \text{ mm}^3$ für die kontralaterale Hemisphäre. Bei den C4/0 Mäusen wurden $86,44 \text{ mm}^3 \pm 29,28 \text{ mm}^3$ ipsilaterales und $76,12 \text{ mm}^3 \pm 24,66 \text{ mm}^3$ kontralaterales Hemisphärenvolumen gemessen. Läsionsvolumen und Hemisphärenvolumina der Prnp^{0/0} und C4/0 Mäuse verhielten sich nahezu identisch. Die Ratio Infarkt volumen zu ipsilateralem Hemisphärenvolumen, dargestellt in Abbildung 34, zeigte einen hemisphärischen Anteil des Infarkts von $20 \% \pm 3 \%$ in Prnp^{+/+} Mäusen, $39 \% \pm 10 \%$ in Prnp^{0/0} Mäusen und $37 \% \pm 6 \%$ in C4/0 Mäusen. Die Ratio ipsilaterale zu kontralateraler Hemisphäre lag bei $99 \% \pm 5 \%$ in den Prnp^{+/+} Mäusen, $114 \% \pm 10 \%$ in Prnp^{0/0} Mäusen und $113 \% \pm 6 \%$ in C4/0. Dieses Ergebnis zeigt einen Shift zur kontralateralen Hemisphäre in C4/0 und Prnp^{0/0} Mäusen und steht für ernsthafte Auswirkungen des ischämischen Schadens in beiden Linien in vergleichbarer Weise. Die Unterschiede Prnp^{+/+}-Mäuse vs. Prnp^{0/0}- bzw. vs. C4/0-Mäuse waren signifikant ($p < 0,05$).

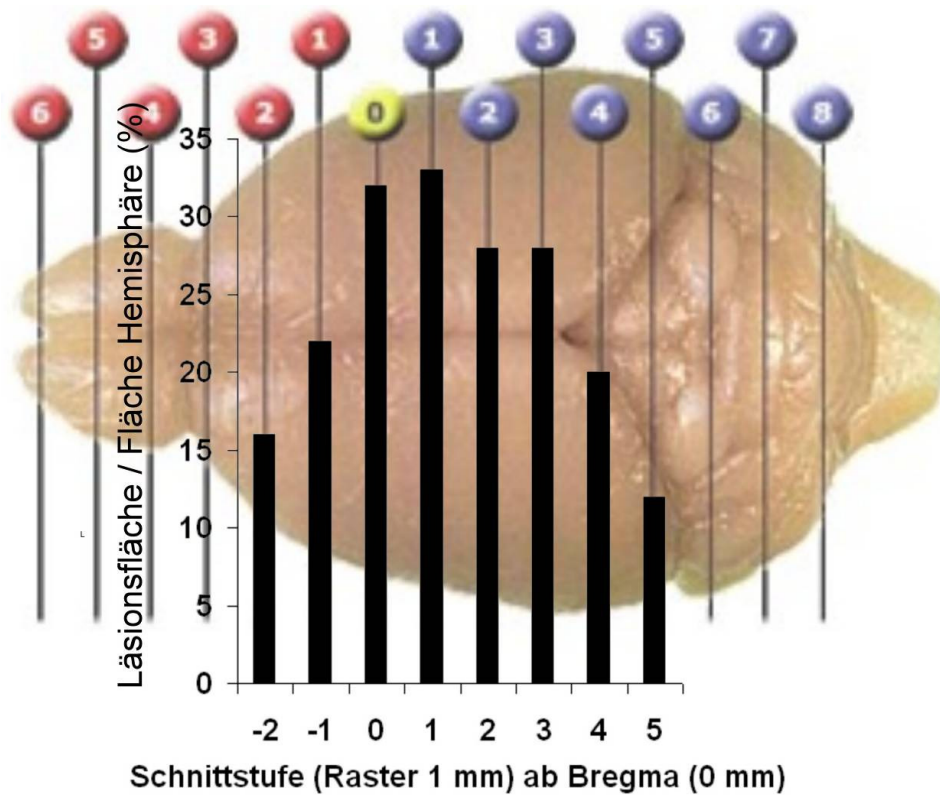


Abbildung 33: Läsionsvolumen *Prnp*^{+/+}-Maus nach MCAO Maushirn von dorsal: links olfaktorischer Bulbus (rostral), rechts Medulla oblongata (caudal). Die Koordinaten geben 1mm Abstände an, 0 (gelb) markiert die Projektion des Bregma (Abbildungsquelle: <http://www.mbl.org>). Die Flächen der Hemisphären wurden von 3,0 mm ab rostral bis 5,0 mm hinter Bregma in 500 µm Abständen gemessen und das hemisphärische Volumen berechnet. Die ischämische Läsion reichte vom Vorderhirn bis einige Millimeter hinter das Bregma mit maximaler Ausdehnung (in Relation zum hemisphärischen Volumen ipsilateral) in Höhe des Bregma. Die Hirnschnitte für die Immunoblot-Analysen wurden der Schnittstufe mit der größten Infarktausdehnung (0-1 mm hinter Bregma) entnommen.

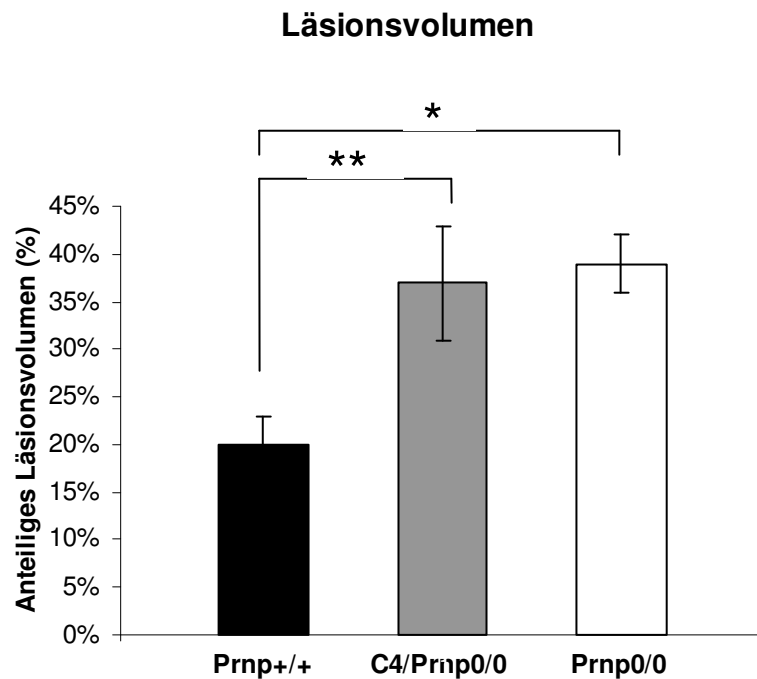


Abbildung 34: Läsionsvolumina nach 1h MCAO mit 24h Reperfusionphase Verglichen wurden Prnp+/+ (n = 7), PrP Δ 32-93- (C4/0, n = 8) und Prnp0/0-Littermates (n = 9). In den Prnp+/+-Hirnen fanden sich signifikant geringere Läsionsvolumina (relativer Anteil Läsion / ipsilaterale Hemisphäre) als bei den Prnp0/0- und C4/0-Hirnen (*p und **p < 0,001). C4/0-Mäuse zeigten vergleichbare Läsionsvolumina wie die Prnp0/0-Littermates.

3.3.3 Immunoblot-Analyse und Densitometrie

Die Immunoblot-Analyse wurde an kresylviolettgefärbten Kryo-Hirnschnitten der größten Infarkt-Ausdehnung (3 mm ab Bregma) durchgeführt. Verglichen wurden Prnp+/+-Mäuse nach 1 h MCAO mit 24 h Reperfusionphase (n = 7) und mit Sham-Tieren (n = 4) sowie C4(PrP Δ 32-93)-Mäuse nach 1h MCAO mit 24h Reperfusionphase (n = 5) mit unbehandelten C4/0-Kontrolltieren (n = 4). Es wurden Homogenisate des Infarkt- Areal (N), der ipsilateralen Hemisphäre (I) und der kontralateralen Hemisphäre (C) der Versuchstiere hergestellt. Zusätzlich wurde aus weiteren Schnitten der jeweiligen Vergleichsgruppe ein Homogenisat für eine Konzentrationsreihe hergestellt. Die Proben wurden für eine optimale Proteinauftrennung einer enzymatischen Deglykosylierung mit PNGase F unterzogen. Zur Detektion der Banden des PrP^C und PrP^C-Spaltprodukten wurde der gegen ein Epitop in der ersten α -Helix des PrP^C gerichtete Primär-Antikörper 4H11 eingesetzt. Das Molekulargewicht der deglykosylierten PrP^C-Volllänge wurde bei 28,5 kDa detektiert. Zwei zusätzliche Banden entsprechend den C2 und C1 Fragmenten des PrP^C wurden bei etwa 21,1 und 16,4 kDa beobachtet. Mit einer zweiten Immunodetektion mit dem Primär-Antikörper Actin I-19 wurde der Zytoskelettmarker β -Aktin bei 42,8 kDa detektiert. Die detektierten Proteine wurden anhand der auf jedem Gel

standardisiert aufgetragenen Verdünnungsreihe densitometrisch quantifiziert (relative dimensionslose Werte). Abbildung 35 zeigt einen Immunoblot mit den Proben einer Prnp^{+/+}-MCAO-Maus und eines Sham-behandelten Littermate-Tieres.

Vergleich der Prnp^{+/+}-Mäuse nach MCAO mit Sham-Tieren

Bei den Sham- Mäuse zeigte die PrP^C-Volllänge das stärkste Intensitäts-Signal (ipsilateral $64,6 \pm 36,8$ und kontralateral $69,9 \pm 32,8$), während die dem C1-Fragment entsprechenden Banden eine schwächere Intensität zeigten (ipsilateral $30,7 \pm 17,9$ und kontralateral $35,5 \pm 17,1$). Die Bande des C2-Fragments war zart gefärbt. Auch das Expressionsniveau des β -Aktins war in beiden Hemisphären vergleichbar (ipsilateral $34,1 \pm 26,5$ und kontralateral $40,6 \pm 35,0$). Bei den Ischämie-Mäusen fanden sich in der Infarktregion (N) eine sehr schwache Intensitätswerte aller detektierten Banden mit großen Abweichungen (PrP^C-Volllänge $57,2 \pm 47,1$, C1-Fragment $33,8 \pm 25,5$ und β -Aktin $64,9 \pm 60,7$). Im Vergleich mit den Sham-Mäusen wurden in der Penumbra (I) der MCAO-Tiere deutlich stärkere Werte der PrP^C-Volllänge ($85,7 \pm 46,3$), des C1-Fragments ($50,6 \pm 26,5$) sowie des β -Aktins ($92,1 \pm 60,2$) detektiert. Auch in der kontralateralen Hemisphäre (C) zeigte sich beim Vergleich mit der entsprechenden Hemisphäre (C) der Sham-Mäuse ein Intensitätsanstieg der drei gemessenen Proteine PrP^C-Volllänge ($82,6 \pm 44,6$), PrP^C-Fragment C1 ($51,6 \pm 26,6$) sowie β -Aktin ($103,3 \pm 58,4$), vergleiche hierzu Abbildung 36, Abbildung 37 und Abbildung 38. Wie in Abbildung 39 dargestellt, zeigte die Ratio PrP^C : β -Aktin einen signifikanten Abfall der Intensität der kontralateralen Hemisphäre nach MCAO (N: $138,0 \pm 125,8$, I: $121,1 \pm 59,3$ und C: $87,6 \pm 26,5$) im Vergleich zur Shamgruppe (I: $121,4 \pm 19,7$ und C: $128,8 \pm 13,5$), $p < 0,01$. Die Ratio des Spaltprodukts C1 : β -Aktin zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen MCAO (N: $83,9 \pm 68,3$, I: $74,3 \pm 40,8$ und C: $56,7 \pm 20,1$) und Sham (I: $57,3 \pm 9,4$ und C: $65,0 \pm 6,7$), siehe Abbildung 40. Die Ratio des C1-Fragments zu PrP^C-Volllänge, dargestellt in Abbildung 41, war bei den MCAO-Mäusen in allen Arealen (N: $64,2 \pm 13,2$, I: $61,0 \pm 6,5$ und C: $64,0 \pm 5,4$) im Vergleich zur entsprechenden Hemisphäre der Sham-Mäuse (I: $47,2 \pm 1,6$ und C: $50,6 \pm 3,6$) signifikant angestiegen ($p < 0,02$ (N) und $p < 0,001$ (I, C)) und zeigte die geringsten Standardabweichungen. Damit zeigt sich in den MCAO-Tieren eine vermehrte Spaltung der PrP^C-Volllänge zum Spaltprodukt C1.

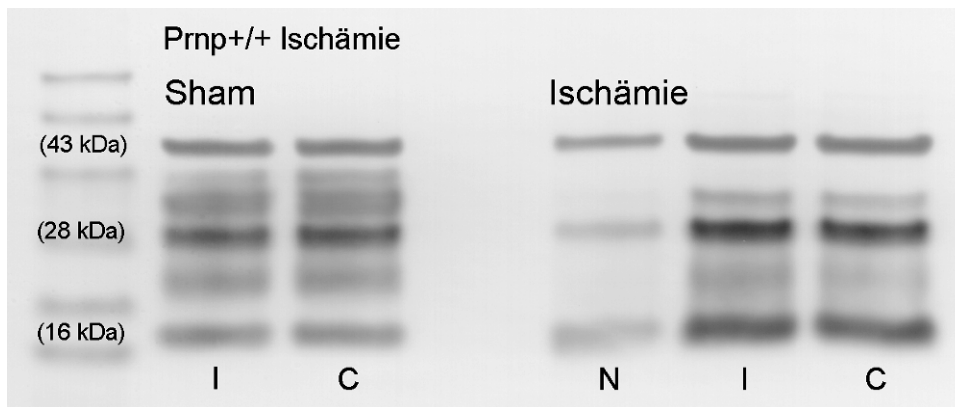


Abbildung 35: Wildtyp-MCAO und Sham-Kontrolle Immunodetektiert wurden β -Aktin (43 kDa) und deglykosyliertes PrPC mit Volllänge (28 kDa) und Fragmenten C1 (16 kDa) sowie C2 (zarte Bande bei ca. 21 kDa). Lane 1 enthält einen Proteinmarker, Lane 2 und 3 enthalten Proben der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre (I und C) einer Prnp+/+ Sham-Maus. In Lane 5-7 sind Proben von Nekroseareal (N) sowie ipsi- und kontralateraler Hemisphäre (I und C) einer Prnp+/+ Maus nach 1h MCAO mit 24h Reperfusionphase aufgetragen. Die Banden des Referenzproteins β -Aktin sind in allen Lanes etwa gleich intensiv entsprechend einer Beladung mit konstanter Proteinmenge. Das nekrotische Areal (N) stellt sich aufgrund der Gewebeläsion insgesamt schwächer dar. Die Intensitätsverschiebung der Banden von PrPC-Volllänge zugunsten des Fragments C1 bei MCAO verglichen mit der Sham-Probe ist deutlich zu sehen.

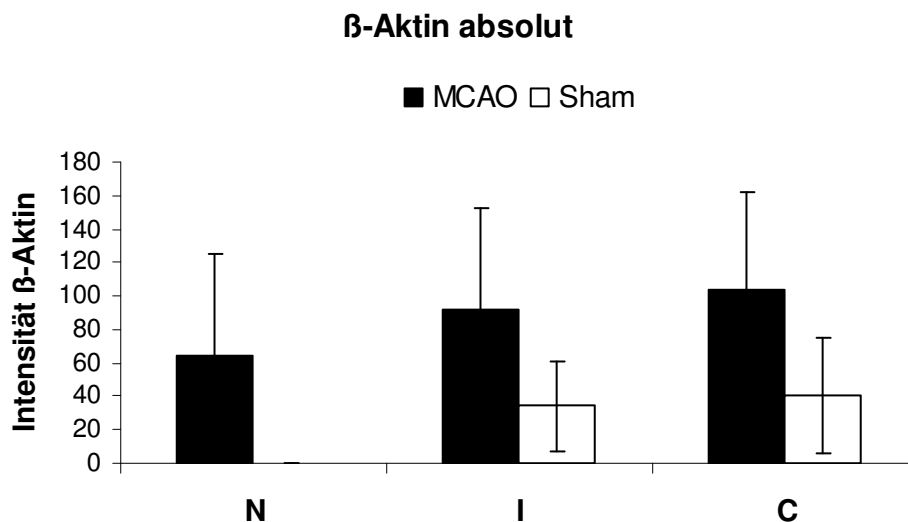


Abbildung 36: Quantifizierung des β -Aktins bei Prnp+/+ MCAO und Sham-Kontrolle Nach 1h MCAO mit 24h Reperfusionphase zeigten die absoluten Intensitätswerte des Zytoskelettmarkers β -Aktin einen Anstieg in ipsilateraler- (I) und kontralateraler Hemisphäre (C) im Vergleich mit den entsprechenden Hemisphären der Sham-behandelten Versuchsgruppe.

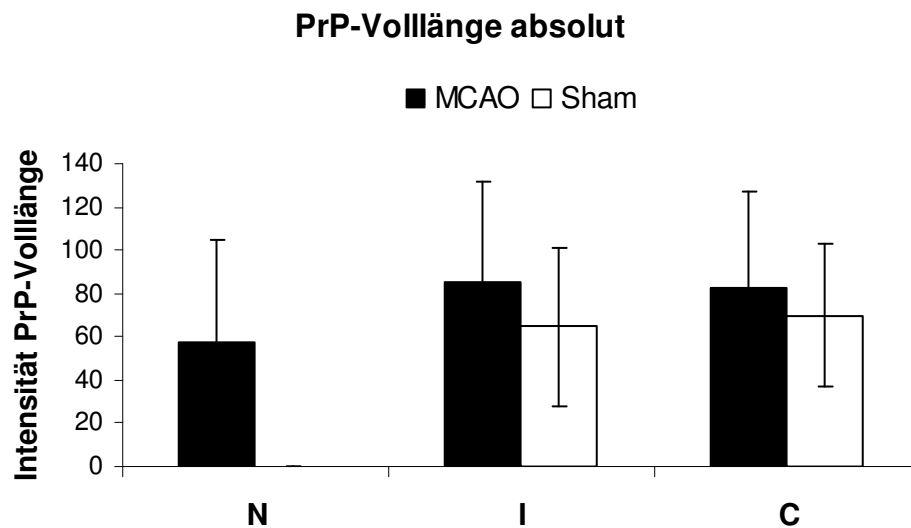


Abbildung 37: Quantifizierung der PrPC-Volllänge bei *Prnp*^{+/+}-MCAO und Sham-Kontrolle Nach 1 h MCAO mit 24 h Reperfusionphase zeigten die absoluten Intensitätswerte der PrPC-Volllänge einen Anstieg in ipsilateraler- (I) und kontralateraler Hemisphäre (C) im Vergleich mit den entsprechenden Hemisphären der Sham-behandelten Versuchsgruppe.

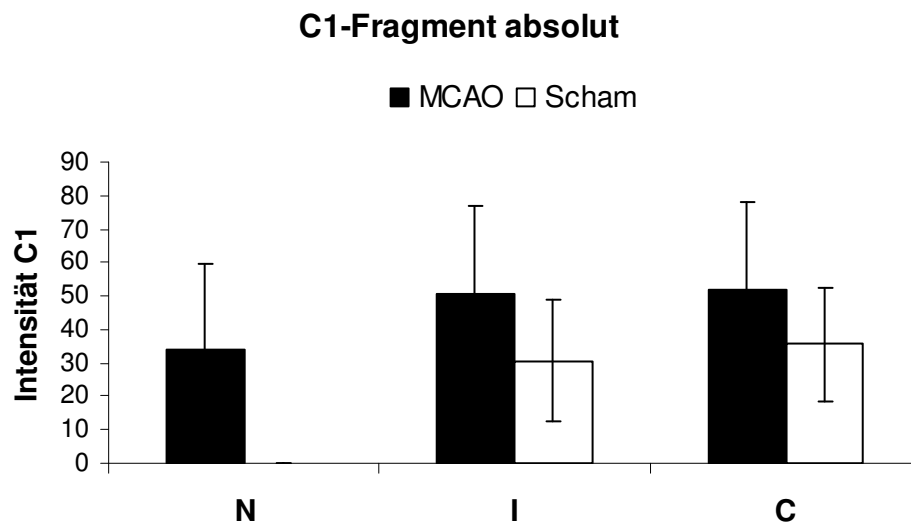


Abbildung 38: Quantifizierung des C1-Fragments bei *Prnp*^{+/+}-MCAO und Sham-Kontrolle Nach 1h MCAO mit 24h Reperfusionphase zeigten die absoluten Intensitätswerte des C1-Fragments der PrPC-Volllänge einen Anstieg in ipsilateraler- (I) und kontralateraler Hemisphäre (C) im Vergleich mit den entsprechenden Hemisphären der Sham-behandelten Versuchsgruppe.

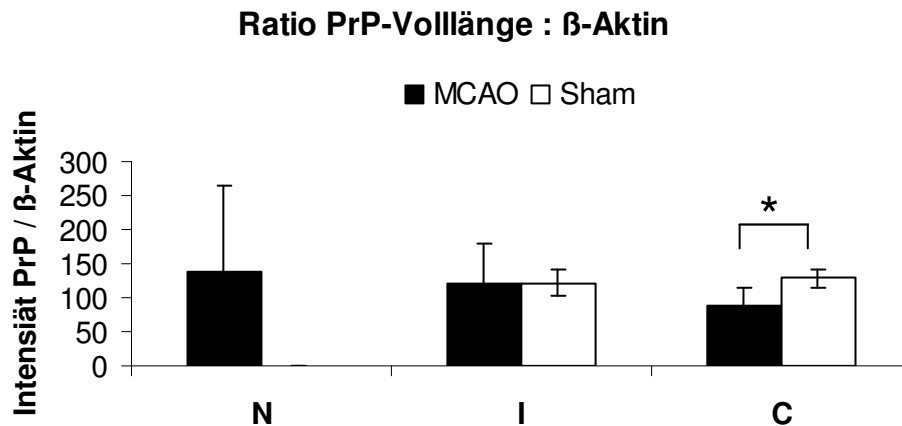


Abbildung 39: Ratio PrP-Volllänge und β -Aktin bei Prnp^{+/+}-MCAO und Sham-Kontrolle Um die PrP-Volllänge quantitativ unabhängig von Schwankungen des Gewebavolumens durch Ödem und Nekrose beurteilen zu können wurde die Ratio mit dem Referenz-Protein β -Aktin bestimmt. Hirne nach MCAO zeigen im Vergleich mit den Sham-Tieren in der kontralateralen Hemisphäre ein signifikantes Absinken des Prionproteins (* $p < 0,01$).

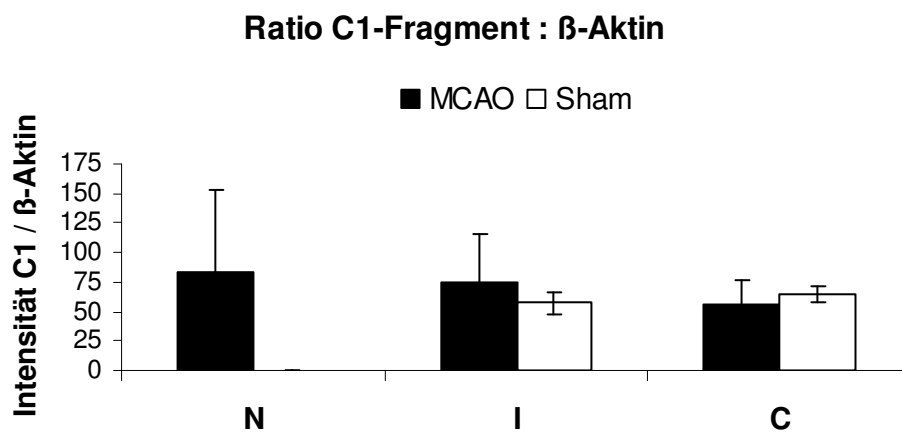


Abbildung 40: Anteil des PrPC-Spaltprodukts C1 bei Prnp^{+/+}-MCAO und Sham-Kontrolle Um das PrPC-Spaltprodukte C1 quantitativ unabhängig von Schwankungen des Gewebavolumens beurteilen zu können wurde die Ratio mit dem stabilen Zytoskelettprotein β -Aktin berechnet. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede verglichen mit der Sham-Kontrollgruppe. In den ischämisch geschädigten Regionen N und I bestehen relativ hohe Schwankungen des Verhältnisses C1 und β -Aktin.

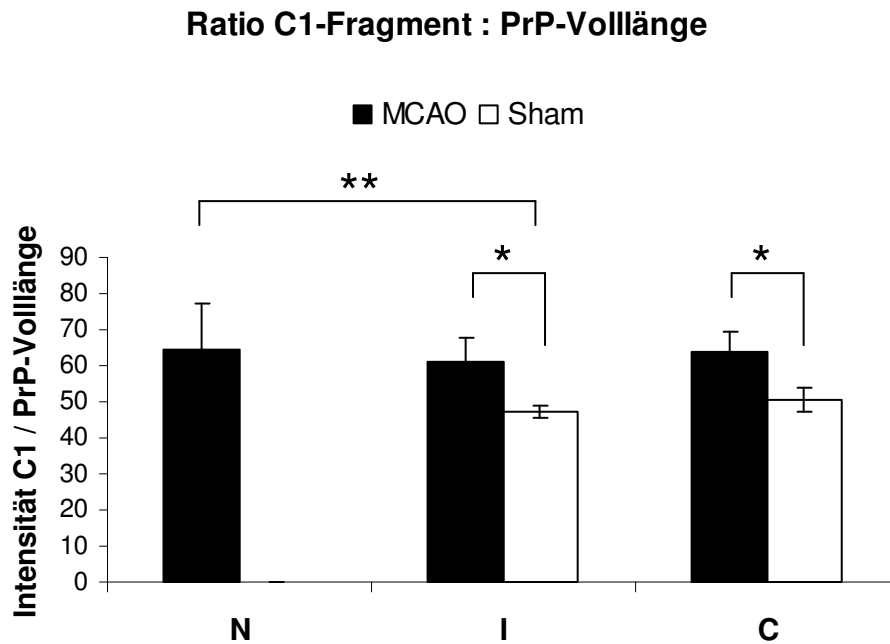


Abbildung 41: Relation C1 : PrP-Volllänge bei Prnp^{+/+}-MCAO und Sham-Kontrolle Das Verhältnis des PrPC- α -Cleavage-Produkts C1 zur PrPC-Volllänge wurde anhand der densitometrischen Daten errechnet. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Spaltungsprodukts in der Infarktregion (N), ipsilateraler Hemisphäre (I) sowie kontralateraler Hemisphäre (C) der MCAO-Mäuse (n = 7) verglichen mit der Sham-Gruppe (n = 4) (*p < 0,001, **p < 0,02).

Vergleich C4/0-Mäuse nach MCAO mit C4/0-Kontroll-Littermates

Um näher zu untersuchen, inwieweit die Oktapeptidregion Einfluss auf die Spaltung der PrP^C zu dem Fragment C1 hat, wurden die Deletionsmutanten C4(PrP Δ 32-93) gezüchtet. Die Regionen N, I und C der C4/0-Mäuse nach 1 h MCAO mit 24 h Reperfusionphase (n = 5) wurden mit Hirnhomogenisaten unbehandelter C4/0-Kontroll-Littermates (n = 4) verglichen. Abbildung 42 zeigt einen exemplarischen Immunoblot mit den Proben einer C4/0-MCAO-Maus und einer Homogenisat-Kontrolle. Bei etwa 20,1 kDa war PrP Δ 32-93-Volllänge und bei 16,4 kDa das C1-Fragment zu beobachten. Die zweite Immunodetektion mit dem Primär-Antikörper Actin I-19 stellte den Zytoskelettmarker β -Aktin bei 42,8 kDa dar. Wie in Abbildung 43 und Abbildung 44 ersichtlich, zeigte sich in allen untersuchten Arealen (Nekrose (N), ipsilaterale- (I) und kontralaterale Hemisphäre (C)) eine Reduktion absoluter Intensitätswerte des Zytoskelettmarkers β -Aktin (N: 62,9 \pm 25,4, I: 65,1 \pm 19,7 und C: 75,6 \pm 24,2) und der PrP Δ 32-93-Volllänge (N: 60,4 \pm 30,0, I: 50,5 \pm 10,3 und C: 90,3 \pm 21,0) im Vergleich mit unbehandeltem Kontrollhirn (β -Aktin 91,5 \pm 8,8, sowie PrP Δ 32-93-Volllänge 131,3 \pm 71,3). Ipsilateral zeigte sich jeweils ein signifikanter Unterschied (*p < 0,05). Auch das C1-Fragment der PrP Δ 32-93-Volllänge war nach MCAO in allen drei Arealen (N: 57,9 \pm 31,0, I: 49,9 \pm 23,4 und C: 83,8 \pm 41,3) im Vergleich zur Kontrolle (104,7 \pm 56,5) gesunken, vergleiche

Abbildung 45. In Relation zu dem Zytoskelettmarker β -Aktin war nach MCAO eine Reduktion der PrP Δ 32-93-Volllänge (N: $109,9 \pm 40,5$, I: $91,7 \pm 50,0$ und C: $135,5 \pm 48,2$) sowie des C1-Fragments (N: $118,1 \pm 62,7$, I: $84,7 \pm$ und C: $137,8 \pm 89,6$) im Vergleich mit der Kontrolle (Ratio PrP Δ 32-93-Volllänge / β -Aktin: $166,0 \pm 121,9$ sowie Ratio C1-Fragment / β -Aktin: $115,0 \pm 101,0$) festzustellen, siehe Abbildung 46 und Abbildung 47. Die Ratio des C1-Fragments zur PrP Δ 32-93-Volllänge zeigte in allen Arealen (N: $101,8 \pm 30,1$, I: $86,1 \pm 28,4$ und C: $91,2 \pm 40,9$) der MCAO-Mäuse einen Anstieg der Ratio zugunsten des Spaltungsprodukts C1 verglichen mit der Kontrolle ($65,9 \pm 26,9$). In der nekrotischen Region fand sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (* $p < 0,03$), siehe Abbildung 48.

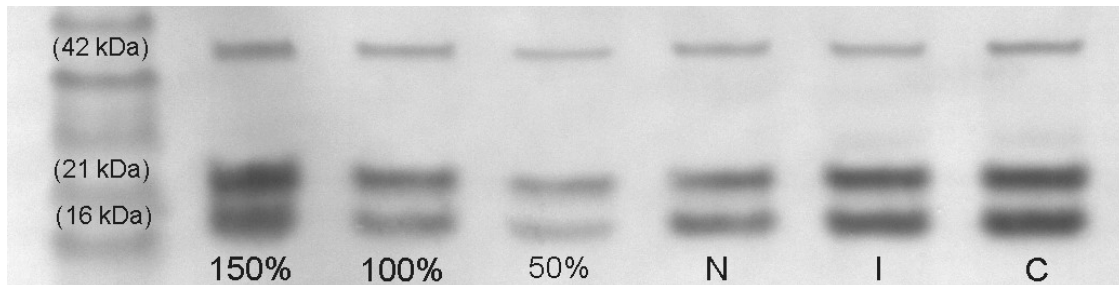


Abbildung 42: *C4/0-MCAO-Maus und C4/0-Kontroll-Maus* Immunodetektiert wurden β -Aktin (42 kDa) und deglykosyliertes PrP Δ 32-93 mit Volllänge (21 kDa) und Fragment C1 (16 kDa). Ein C2-Fragment ist nicht differenzierbar. Lane 1 enthält einen Proteinmarker, Lane 2-4 enthalten Hirnhomogenisat einer PrP Δ 32-93-Littermate-Kontrollmaus. 100% entsprechen dem Auftragsvolumen der Proben. In Lane 5-7 sind die Proben von (N), ipsi- und kontralateraler Hemisphäre (I und C) einer PrP Δ 32-93-Maus nach 1 h MCAO mit 24 h Reperfusionphase aufgetragen. Nach MCAO ist eine Intensitätsverstärkung des C1-Fragments in Relation zur PrP Δ 32-93-Volllänge erkennbar.

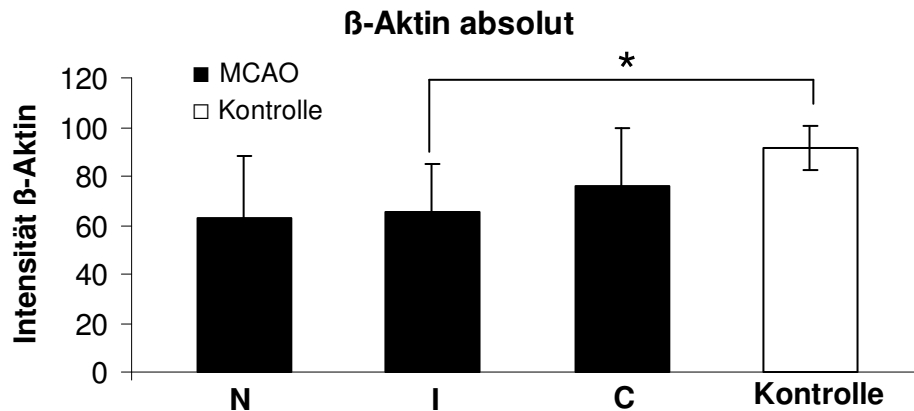


Abbildung 43: Quantifizierung des β-Aktins bei C4/0-MCAO und Kontrolle Nach 1h MCAO mit 24h Reperfusionphase zeigten die absoluten Intensitätswerte des Zytoskelettmarkers β-Aktin eine Reduktion in allen untersuchten Arealen (Nekrose (N), ipsilaterale- (I) und kontralaterale Hemisphäre (C)) im Vergleich mit Kontrollhirn. Ipsilateral zeigte sich ein signifikanter Unterschied (* $p < 0,05$).

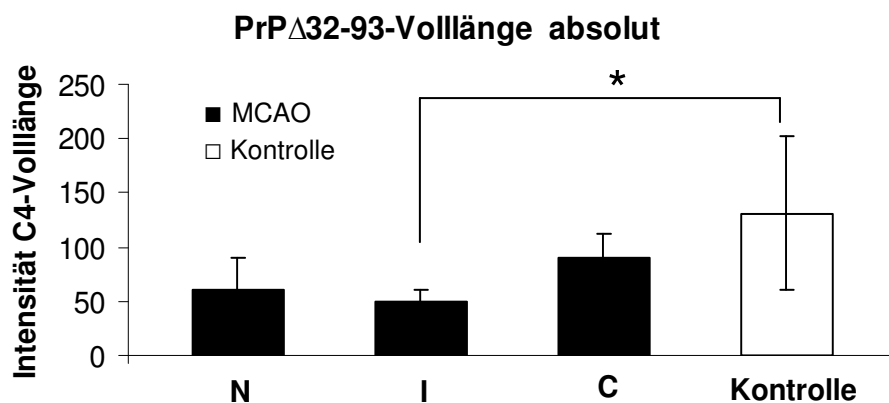


Abbildung 44: Quantifizierung der PrP Δ 32-93-Volllänge bei C4/0-MCAO und Kontrolle Nach 1h MCAO mit 24h Reperfusionphase zeigten die absoluten Intensitätswerte der PrP Δ 32-93-Volllänge eine Reduktion in allen untersuchten Arealen (Nekrose (N), ipsilaterale- (I) und kontralaterale Hemisphäre (C)) im Vergleich mit Kontrollhirn. Ipsilateral zeigte sich ein signifikanter Unterschied (* $p < 0,04$).

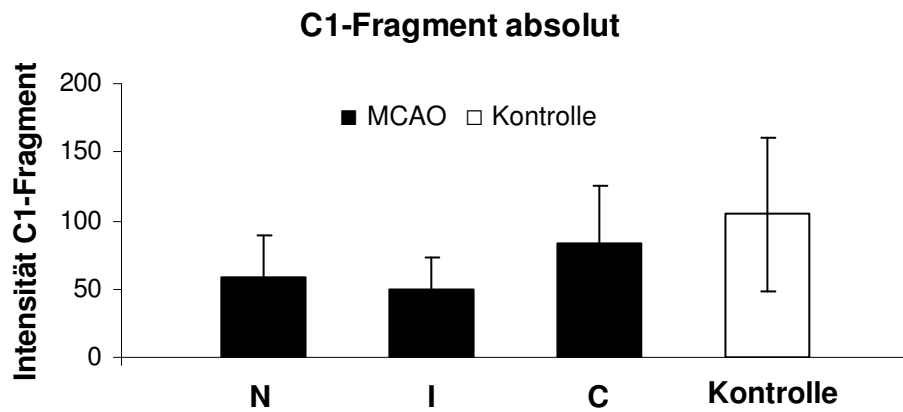


Abbildung 45: Quantifizierung des C1-Fragments der PrP Δ 32-93-Volllänge bei C4/0-MCAO und Kontrolle Nach 1h MCAO mit 24h Reperfusionphase zeigten die absoluten Intensitätswerte des C1-Fragments der PrP Δ 32-93-Volllänge eine Reduktion in allen untersuchten Arealen (Nekrose (N), ipsilaterale- (I) und kontralaterale Hemisphäre (C)) im Vergleich mit Kontrollhirn.

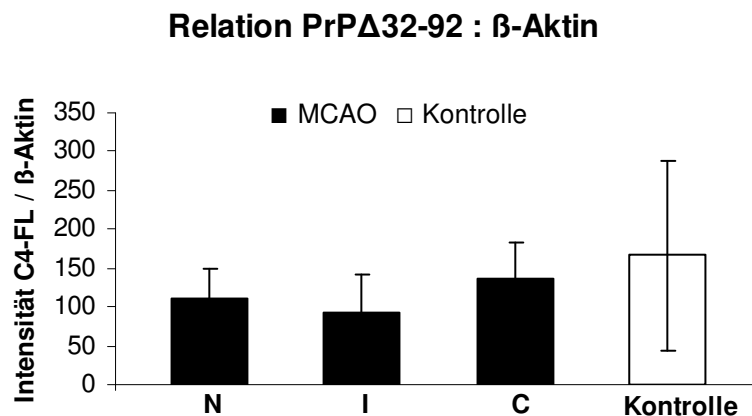


Abbildung 46: C4/0-MCAO - Ratio PrP Δ 32-93 : β -Aktin Um die PrP-Volllänge quantitativ unabhängig von Schwankungen des Gewebevolumens beurteilen zu können wurde die Ratio mit dem stabilen Referenz-Protein β -Aktin bestimmt. Hirne nach MCAO zeigen im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Unterschied.

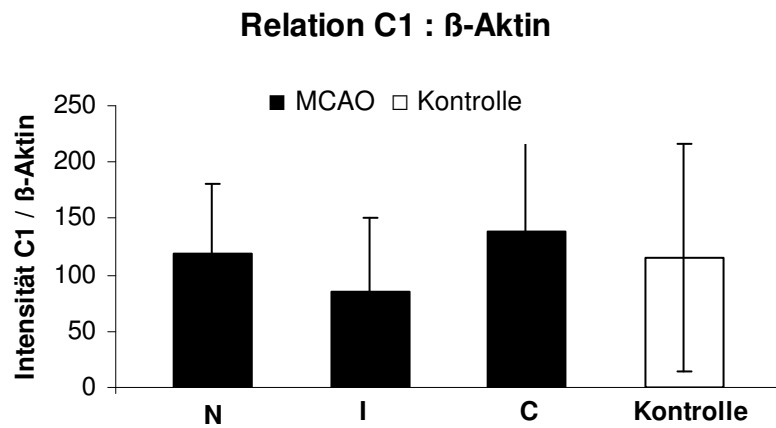


Abbildung 47: C4/0-MCAO Ratio C1 : β -Aktin Um das Spaltprodukt C1 quantitativ unabhängig von Schwankungen des Gewebevolumentens beurteilen zu können wurde die Ratio mit dem Referenz-Protein β -Aktin berechnet. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede verglichen mit der Kontrolle.

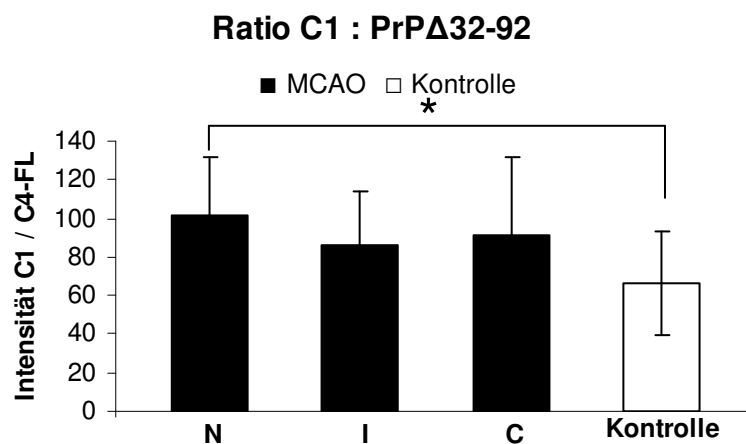


Abbildung 48: C4/0-MCAO Ratio C1 : PrP Δ 32-93 Das Verhältnis des Spaltungsprodukts C1 zur PrP Δ 32-93-Volllänge wurde anhand der densitometrischen Daten errechnet. Es zeigte sich in allen untersuchten Arealen (Nekrose (N), ipsilaterale- (I) und kontralaterale Hemisphäre (C)) der MCAO-Mäuse ein Anstieg der Ratio zugunsten des Spaltungsprodukts C1 verglichen mit der Kontrolle. In der nekrotischen Region fand sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (* $p < 0,03$).

3.4 Untersuchung der Spaltung des Δ PrP32-93

Um genauer zu untersuchen, welche Größe das C2 Fragment hat und ob dies bei PrP Δ 32-93 entstehen kann, bzw. Voraussetzung oder Vorläufer des C1 Fragments ist, wurde die Spaltung des PrP^C mit einer hochauflösenden Gelelektrophorese untersucht. Jeweils 3 Homogenisate nativer C4/0(PrP Δ 32-93)- und Wildtyp(Prnp+/+)-Maushirne wurden mit PNGase F deglykosyliert und in einem hoch auflösenden Gel-Lauf über 23 cm aufgetrennt. Das Prionprotein wurde mit dem PrP-Antikörper 4H11, gerichtet gegen Helix 1 (AS 145-153) immunodetektiert. Die Immunoblots wurden zur densitometrischen Auswertung eingescannt. Es zeigte sich ein etwa 1,5-fach höheres Expressionsniveau des Δ PrP^C in C4/0-Mäusen (Flechsigt et al., 2000) als in Wildtyp-Mäusen, vergleiche Abbildung 4. Mit Hilfe der vom Hersteller angegebenen Molekulargewichte der Markerproteine wurden in einem Interpolationsverfahren die molekularen Gewichte der Banden bei ihrem Intensitätspeak bestimmt (siehe Kapitel 2.5.15 mit Abbildung 10). Die C4/0-Mäuse zeigten mit zwei Hauptbanden entsprechend der PrP Δ 32-93-Volllänge und dem C1-Fragment. Der Wildtyp zeigte zwei Hauptbanden entsprechend der PrP^C-Volllänge und dem Fragment C1 sowie eine zarte Bande, die das Fragment C2 repräsentiert. Das Molekulargewicht der PrP^C-Volllänge des Wildtyps wurde bei $31,36 \pm 0,04$ kDa gemessen. Die PrP Δ 32-93-Volllänge lag bei $24,52 \pm 0,17$ kDa und unterschied sich damit signifikant von dem C2-Fragment des PrP^C mit $23,70 \pm 0,16$ kDa ($p < 0,01$). Das Molekulargewicht des C1-Fragments lag in den Wildtyp-Mäusen bei $16,34 \pm 0,23$ und in den C4/0-Mäusen bei $16,54 \pm 0,30$. Die ermittelten Molekulargewichte sind in Tabelle 3 mit Mittelwerten und Standardabweichung aufgeführt.

	Prnp+/+			Prnp Δ 32-93	
	PrPC	C2	C1	PrP Δ 32-93	C1
kDa	31,398	23,870	16,272	24,675	16,871
	31,321	23,566	16,162	24,326	16,489
	31,349	23,655	16,596	24,564	16,272
Mw. (kDa)	31,36	23,70	16,34	24,52	16,54
Stabw. (kDa)	0,04	0,16	0,23	0,18	0,30

Tabelle 3: Molekulargewicht-Bestimmung der Prnp+/+ und Prnp Δ 32-93-Volllänge mit den Fragmenten C1 und C2 am hoch auflösenden Immunoblot An jeweils 3 Proben eines Prnp+/+-Hirn-Homogenisats sowie eines Prnp Δ 32-93-Hirn-Homogenisats wurde das exakte Molekulargewicht (kDa) der PrPC-Volllänge bzw. der Prnp Δ 32-93-Volllänge und der Spaltprodukte C1 und C2 ermittelt. Es wurden Mittelwerte (Mw.) sowie Standardabweichung (Stabw.) der Molekulargewichte berechnet.

Vergleich mit dem nominalen Molekulargewicht

Viele Proteine zeigen eine Abhängigkeit ihrer elektrophoretischen Mobilität von hydrophoben Eigenschaften und wandern über der Position ihres theoretisch berechneten Molekulargewichts (Shirai et al., 2008). Für das Prionprotein ist ein solcher Effekt ebenfalls bekannt (Chen et al., 2000). Auch in dieser Untersuchung zeigten sich Abweichungen des detektierten Gewichts der PrP-Banden von dem theoretisch berechneten Nominalgewicht. Um die molekulare Masse des gesuchten C2-Fragments noch präziser zu bestimmen wurden daher für die gemessenen Werte der jeweilige Korrekturfaktor mittels des bekannten theoretischen Molekulargewichts der PrP^C-Volllänge, der PrP Δ 32-93-Volllänge und des C1-Fragments (Tabelle 3) berechnet. Die theoretischen Molekulargewichte wurden durch schrittweise Summierung der Aminosäuren inklusive GPI-Anker von der C-terminalen Domäne beginnend errechnet. Dabei wurde der deglykosylierte GPI-Anker mit einer molekularen Masse von gemittelt 835 Dalton angenommen (Baldwin, 2005). Es errechneten sich folgende Nominalgewichte (Flehsig et al., 2000; Mange et al., 2004):

PrP ^C -Volllänge (AS 23...231+GPI)	27,56889 kDa
PrP Δ 32-93-Volllänge (AS 23...31-94...231+GPI)	20,39786 kDa
C1-Fragment (AS 111...231+GPI)	16,85402 kDa

Für die PrP Δ 32-93-Volllänge, welche knapp oberhalb des C2-Fragment des PrP^C läuft, ergibt sich ein Korrekturfaktor von gemessener Laufhöhe (Tabelle 3) / theoretisches Molekulargewicht = 0,83180725. Bei einer eng benachbarten Laufhöhe beider Proteine kann für das C2-Fragment der Korrekturfaktor der PrP Δ 32-93-Volllänge angenommen werden. So lässt sich anhand des gemessenen Molekulargewichts (Tabelle 3) das Nominalgewicht des C2 mit 19,7113364 kDa errechnen. Bei der Aufsummierung der Aminosäuren von C-terminal ergäbe sich das Nominalgewicht ziemlich genau mit 19,6469 kDa bei AS 89 (Glycin, 75,07 Da). Bei AS 88 (Tryptophan, 204,22 Da) wäre das Zielgewicht des C2-Fragments bereits deutlich überschritten. Zwischen AS 88 und 89 könnte demnach die Schnittstelle der β -Cleavage liegen. Die relevanten N-terminalen Abschnitte sind in Abbildung 49 gegenübergestellt. Es ist unwahrscheinlich, dass das C2-Fragment aus PrP Δ 32-93 (C4) hervorgeht. Für diese Berechnung müssen zwei Einschränkungen beachtet werden. Zum einen liegt die Standardabweichung der Molekulargewichtsmessung von PrP Δ 32-93-Volllänge und C2-Fragment bei ungefähr 0,18 kDa (Tabelle 3), so dass unter Beachtung der Nominalgewichte die errechnete Schnittstelle der β -Cleavage hier als AS 88/89 \pm 1 anzugeben wäre. Zum anderen zeigt sich eine komplexe,

nicht-lineare Abhängigkeit zwischen wirklicher Laufhöhe und Nominalgewicht, so dass die Bestimmung der Laufhöhe mit einem kleinen Fehler behaftet ist. Dieser Fehler ist daran erkennbar, dass z.B. PrP^C-Volllänge einen Korrekturfaktor (Nominalgewicht / gemessene Laufhöhe) von 0,879225667 besitzt, der Korrekturfaktor von PrP Δ 32-93-Volllänge aber 6 % niedriger ist. Ein solcher Unterschied erklärt sich nicht allein den in Tabelle 3 aufgeführten Standardabweichungen mit ca. $\pm 0,2$ %, sondern eher aus der eingangs erwähnten Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität vieler Proteine von hydrophoben Eigenschaften. Wie in Tabelle 3 ersichtlich, verläuft die Beziehung zwischen gemessener Laufhöhe und nominalem Molekulargewicht relativ flach aus, so dass eine Unterschätzung des gemessenen Molekulargewichts möglich wäre, konsequenter Weise also die β -Cleavage-Stelle N-terminal von AS 88/89 liegen könnte. Trotz dieser Fehler ist es sehr wahrscheinlich, dass das C1-Fragment als „de novo Spaltung“ aus dem PrP Δ 32-93-Volllänge entsteht und nicht sekundär aus dem C2-Fragment generiert wird. Die Schnittstelle zwischen Glycin und Tryptophan ist eine bekannte Schnittstelle von Endoproteasen wie z.B. Proteinase K.

PrPC			C1-PrP			C2-PrP			C4-PrP		
Pos	AS	MW	Pos	AS	MW	Pos	AS	MW	Pos	AS	MW
...
...
83	P	115,13	111	V	117,15	89	G	75,07	23	K	146,19
84	H	155,1	112	A	89,09	90	Q	146,15	24	K	146,19
85	G	75,07	113	G	75,07	91	G	75,07	25	R	174,2
86	G	75,07	92	G	75,07	26	P	115,13
87	G	75,07	93	G	75,07	27	K	146,19
88	W	204,22	94	T	119,12	28	P	115,13
89	G	75,07	95	H	155,1	29	G	75,07
90	Q	146,15	96	N	132,12	30	G	75,07
91	G	75,07	97	Q	146,15	31	W	204,22
92	G	75,07	98	W	204,22	94	T	119,12
93	G	75,07	99	N	132,12	95	H	155,1
94	T	119,12	100	K	146,19	96	N	132,12
95	H	155,1	101	P	115,13	97	Q	146,15
96	N	132,12	102	S	105,09	98	W	204,22
97	Q	146,15	103	K	146,19	99	N	132,12
98	W	204,22	104	P	115,13	100	K	146,19
99	N	132,12	105	K	146,19	101	P	115,13
100	K	146,19	106	T	119,12	102	S	105,09
101	P	115,13	107	N	132,12	103	K	146,19
102	S	105,09	108	L	131,17	104	P	115,13
103	K	146,19	109	K	146,19	105	K	146,19
104	P	115,13	110	H	155,1	106	T	119,12
105	K	146,19	111	V	117,15	107	N	132,12
106	T	119,12	112	A	89,09	108	L	131,17
107	N	132,12	113	G	75,07	109	K	146,19
108	L	131,17	110	H	155,1
109	K	146,19	111	V	117,15
110	H	155,1	112	A	89,09
111	V	117,15	113	G	75,07
112	A	89,09
113	G	75,07
...
...
Σ	27569		Σ	16854		Σ	19647		Σ	20397	

Abbildung 49: Abschnittsweise Darstellung der Sequenzen von PrP, C1- und C2-Fragment sowie PrP Δ 32-93 In der Grafik sind jeweils die Position, Bezeichnung und das Molekulargewicht der Aminosäuren von PrP-Volllänge, den Fragmenten C1 und C2, sowie PrP Δ 32-93 (C4) im N-terminalen Abschnitt gegenübergestellt. Während sich die Sequenz der PrP-Volllänge nach oben und unten weiter fortsetzt, endet das Fragment C1 N-terminal bei AS 111. PrP Δ 32-93 (C4) reicht N-terminal bis AS 23 ohne die Oktapeptidregion (gekennzeichnet mit schwarzem Strich). Die Länge von C2 wurde aus der Laufhöhe berechnet. Es endet bei AS 89 und kann daher nicht aus PrP Δ 32-93 (C4) hervorgehen

4 Diskussion

Die Ergebnisse aus Tierversuchen mit dem CCI- (Hoshino et al., 2003) und MCAO-Modell (McLennan et al., 2004) waren Ausgangspunkt für eine nähere Untersuchung der neuroprotektiven Funktion des PrP^C in Form des Projekts „Zerebrales Trauma und ischämischer Insult im Mausmodell“. Für die Versuche wurden PrP^C-Wildtyp-Mäuse, PrP^C-knock-out-Mäuse sowie ein Genotyp mit N-terminaler Deletion des PrP^C verglichen. Der tierexperimentelle Teil bestätigte die Ergebnisse der Vorarbeiten. Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle der Spaltung des PrP^C in vivo. Dazu wurde die Expression des PrP^C und des PrP^C-Spaltungsprodukts C1 in ipsi- und kontralateraler Hemisphäre sowie bei MCAO zusätzlich im nekrotischen Infarktareal verglichen. Zusätzlich wurde die Länge des Spaltungsprodukts C2 bestimmt. Zu diesem Zweck wurde in Vorversuchen eine Methode zur Aufbereitung ausgewählter Hirnschnittregionen für eine hochauflösende Immunoblot-Analyse entwickelt.

4.1 *Präzision der histologischen Schnittdicke*

Die Untersuchung mikroskopischer Gewebemengen aus histologischen Maushirnschnitten setzte ein volumenbezogenes Homogenisierungsverfahren voraus. Wie dargelegt in Tabelle 1, kommt es zu Abweichungen der Schnittdicke. Insgesamt ist die Abweichung um 7 % bis zu maximal 17 % als gering einzuschätzen, muss aber bei der volumenbezogenen Auswertung berücksichtigt werden.

4.2 *Der Lysierungsprozesses*

Wie dargelegt in Tabelle 2, ist der Verlust an Lysierungspuffer durch Verdunstung bei Raumtemperatur auch bei bewusst lang gehaltener Wartezeit bis zur Auflösung des Gewebes gering. Bei Abnahme des Lysats mit der Pipette wurde eine Gewebeablösung von 98 % bei langer Verdunstungszeit und Raumtemperatur erreicht. Bei der praktischen Durchführung betrug die Zeit bis zur kompletten Auflösung des Gewebes jedoch maximal 1 min. Zusätzlich wurde die Verdunstung weiter minimiert durch Ausnutzen des Effekts kalter auf den Objektträger hinabströmender Luft eines Coolpacks. Damit ist von einer nahezu vollständigen Gewebeablösung vom Objektträger auszugehen. Die Technik ist als ausreichend verlässlich ein-

zustufen. Die kleinen Lysatmengen waren nicht für weitere Zentrifugation oder mechanische Homogenisierung geeignet. Die Konzentration des im Lysierungspuffer enthaltenen Natriumdodecylsulfat (SDS) erwies sich als ausreichend, um das Gewebe ohne sichtbare Rückstände aufzulösen. Das stark reduzierende Reagenz Dithiothreitol im Lysierungspuffer inhibierte zudem oxidative Prozesse, so dass ein frühzeitiger Abbau der zu untersuchenden Proteine verhindert wurde (Wang et al., 1996). Mit dem anschließendem Denaturieren der Proben bei 95° C konnte von einer kompletten Solubilisierung und Stabilisierung der Proteine ausgegangen werden.

4.3 *Detektionsgrenzen der Immunoblot-Analyse*

Bisher war es kaum möglich eine Immunoblot-Analyse mikroskopischer Gewebemengen aus histologischen Schnitten durchzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Analyse sehr geringer Materialmengen ein hoch sensitives Immunoblot-Verfahren mit volumenbezogener Technik der Gewebe-Lysierung entwickelt (Krebs et al., 2006). Um die Grenzen zu testen wurde das minimale im Immunoblot-Verfahren nachweisbare Gewebevolumen eines Kortexausschnitts eines Maushirnschnitts ermittelt. Bei einem Gewebevolumen von 42 nl war es noch gut möglich die Bande des Zytoskelettmarkers β -Aktin (Herman, 1993) zu detektieren (vergleiche Abbildung 12). Dieser Menge entsprechen nur noch ca. 15 kortikale Neurone (exemplarisch dargestellt in Abbildung 13). Bei derartigen Detektionsgrenzen ist die grobe Aufteilung in Infarkt und Hemisphären als unkritisch hinsichtlich der Sensitivität des Verfahrens zu beurteilen.

4.4 *Deglykosylierung mit PNGase F*

Physiologischerweise liegt das PrP^C in un-, mono- sowie diglykosylierter Form vor (Haraguchi et al., 1989), was Schwankungen des Molekulargewichts um bis zu 10 kDa bedingen kann. Die Bindungsstickstoffe (Asparagin 181 und 197) für die zwei Core-Glykane befinden sich an der C-terminalen Domäne (Otvos, Jr. and Cudic, 2002). Daher war es gerade für eine hochauflösende Differenzierung und quantitative Analyse der PrP^C- bzw. PrP^{A32-93}-Volllänge mit den C-terminalen Spaltprodukten C1 und C2 in der Immunoblot-Analyse unbedingt notwendig eine möglichst vollständige Deglykosylierung der Proben mit PNGase F (Peptide-N-Glycosidase F) (Chu, 1986) zu erreichen. Herkömmliche Verfahren arbeiten mit

weniger aggressiven Lysierungspuffern, welche die PNGase F kaum beeinträchtigen. Für diese Arbeit mussten jedoch die Bedingungen in Richtung einer höheren Konzentration und längeren Inkubation der PNGase modifiziert werden. Es konnte so ein zufrieden stellendes Resultat erreicht werden (vergleiche Abbildung 14).

4.5 *Littermates*

Für möglichst vergleichbare Voraussetzungen der Versuchstiergruppen wurden unter Standardbedingungen sowohl für das CCI-, als auch für das MCAO-Modell Littermate-Mäuse der Genotypen Prnp+/+, Prnp+/-, Prnp0/0 sowie C4/0 (PrP Δ 32-93) gezüchtet. Littermates bedürfen einer aufwendigen Zucht, bieten aber den höchsten Verwandtschaftsgrad und damit die bestmöglichen Voraussetzungen für die geplanten Versuche. Für die Vergleichbarkeit der MCAO-Tiere stellt dies einen besonders wichtigen Punkt dar, da die eine Variabilität der Hirngefäßversorgung entscheidende Auswirkungen haben kann. Für Experimente wurden außerdem nur männliche Tiere verwendet, da die Neuroprotektion des PrP^C vom Geschlecht abhängig zu sein scheint (Sakurai-Yamashita et al., 2005).

4.6 *Modell der traumatischen und ischämischen Gewebeschädigung*

Es wurden zwei tierexperimentelle Modelle zur neuronalen Schädigung eingesetzt: das Modell des parasagittalen Controlled Cortical Impact (CCI) für eine traumatische Hirnverletzung (Zweckberger et al., 2003) sowie das Faden-Okklusionsmodell zur Erzeugung einer fokalen zerebralen Ischämie (middle cerebral artery occlusion, MCAO) mit 1 h Ischämie und 24 h Reperusionsphase (Vosko et al., 2006).

Das Modell des parasagittalen Controlled Cortical Impact (CCI-Modell) für eine traumatische Hirnschädigung erlaubt es sehr stabile abgegrenzte Läsionsvolumina mit hoher Reliabilität herzustellen (Smith et al., 1995). Zusätzlich ist das CCI-Modell anders als das Modell der MCAO weitgehend unabhängig von zerebralen Vaskularisationsvarianten und Gabe zerebral wirksamer Medikamente (Narkotika). Auf dem Boden der Nekrose kommt es im Zeitraum von 24 Stunden nach CCI zum verzögerten Untergang des umliegenden Gewebes, so dass hier ebenfalls eine ischämische Komponente vorliegt (Engel et al., 2008).

Bei dem Modell der MCAO werden anatomische Strukturen nicht direkt und sofort verletzt, sondern es entsteht ein sich über 2-10 Stunden langsam entwickelnder Infarkt des Stromgebiete-

tes der A. cerebri media. Zunächst kommt es zur völligen Ischämie und Nekrose des Striatums, die Ischämie des Cortex entwickelt sich aufgrund der vasalen Kollateralisierung verzögert. Dadurch ist der ischämische Schaden bei dem Modell der MCAO nicht so scharf abgrenzbar wie bei einer traumatischen Schädigung. Diesbezüglich muss bei einem Faden-Okklusionsmodell auch immer eine Variabilität der Läsionsgröße abhängig von der Erfahrung des Operateurs in Kauf genommen werden (Yanamoto et al., 2003).

Der neuroprotektive Effekt des PrP^C wurde in verschiedenen Modellen reproduziert und scheint unabhängig von der Schädigungsart mit eher allgemeinen zellulären Mechanismen des Schutzes gegen oxidativen Stress in Zusammenhang zu stehen.

4.7 Das histologische Expressionsmuster des PrP^C nach CCI und MCAO zeigt Parallelen

24 h nach CCI umfasste die Verletzung zumeist ipsilateral den Mortorkortex mit höher gelegenen Anteilen der Hippocampus-Formation sowie Teile des sensorischen Kortex. Die immunhistochemischen PrP^C-Färbungen der Hirne nach CCI präsentierten in der Penumbra der Kontusion zahlreiche stark farbreaktive Somata von Neuronen und geschwollene Axone, während sich das Neuropil im Hintergrund relativ blass darstellte (vergleiche Abbildung 15). Nach 1 h MCAO mit 24 h Reperfusionphase war in Färbungen nach Nissl die blasse nekrotische Region (bei Prnp+/+ im Bereich der Basalganglien, bei Prnp0/0 und C4/0 darüber hinaus über weite Teile des parietalen Kortex) im Stromgebiet der A. media deutlich zu sehen. Die neuronale Histologie der ischämischen Läsion durch MCAO zeigte ein zum CCI analoges Bild der oxidativen Schädigung und Zelltod im Areal des Infarkts. Wie nach CCI wurde nach MCAO die stärkste PrP^C Immunreaktivität bei Prnp+/+- sowie C4/0-Tieren in Neuronen der Penumbra der Läsion gesehen (vergleiche Abbildung 31). Diese immunhistochemischen Ergebnisse stimmen mit vorangehenden Beobachtungen überein (McLennan et al., 2004). Das neuronale Expressionsmuster des PrP^C nach einer oxidativen Schädigung scheint daher unabhängig von deren Ätiologie zu sein. Die Beobachtung der einzelnen stark PrP-immunoreaktiven Zellen könnte Ausdruck eines direkten protektiven Effekts des PrP^C in Form einer gesteigerten Resistenz gegen oxidativen Stress sein.

4.8 *Unterschiedliche Läsionsgrößen nach CCI und MCAO in Prnp^{+/+}- und Prnp^{0/0}-Littermates*

Während die primären Kontusionen 15 min nach CCI bis auf minimale Abweichungen bei allen Mäusen identische Volumina hatten, vergrößerte sich über 24 h nach CCI das sekundäre Läsionsvolumen (relativ zum ipsilateralen hemisphärischen Volumen) in den verschiedenen Genotypen unterschiedlich: Prnp^{0/0}-Mäuse wiesen mit 11,3 % ± 1,0 % signifikant größere Läsionsvolumina als Wildtypmäuse mit 9,8 % ± 0,8 % auf, die Läsionsvolumina der heterologen Prnp^{+/-}-Mäuse lagen mit 10,5 % ± 1,0 % dazwischen. Dieses Ergebnis stützt die vorhergehende Studie mit prolongierten posttraumatischen Zeiten (Hoshino et al., 2003). Die PrP^C-abhängige Empfindlichkeit gegen neuronale Schädigung wurde ebenfalls mit Modellen sowohl transienter als auch permanenter Ischämie demonstriert (McLennan et al., 2004; Spudich et al., 2005; Weise et al., 2004). Auch die Ergebnisse des MCAO-Teils dieses Projekts bestätigten die hohe Empfindlichkeit der Prnp-knock-out-Mäuse gegenüber oxidativen Stress. Nach 1 h transienter Ischämie mit 24 h Reperfusionphase fand sich mit einem hemisphärischen Anteil des Infarkts von 39 % ± 10 % in Prnp^{0/0}-Mäusen ein signifikant größeres Ausmaß der Läsion als in den Prnp^{+/+}-Littermates mit 20 % ± 3 % Infarktanteil. Sowohl das Modell des CCI, als auch das der MCAO bestätigen die Abhängigkeit der Resistenz und des Überlebens einzelner Neurone unter hypoxischen Bedingungen von der Expression des PrP^C. Die vergleichsweise großen Läsionsvolumina nach einer transienten Ischämie sind auf einen massiven Reperfusionsschaden zurückzuführen (Vosko et al., 2006). Auch diese Daten weisen darauf hin, dass das PrP^C maßgeblich am Schutz des Nervengewebes gegen oxidativen Stress beteiligt zu sein scheint.

4.9 *Prnp^{Δ32-93}- und Prnp^{0/0}-Littermates zeigen nach MCAO vergleichbare Läsionsvolumen*

Die Rolle der PrP^C-Volllänge in der Verhinderung von Schäden durch oxidativen Stress ist gut beschrieben (Klamt et al., 2001; Milhavet and Lehmann, 2002; Rachidi et al., 2003; White et al., 1999) und konnte auch in dieser Arbeit eindeutig nachvollzogen werden. Um den für den neuroprotektiven Effekt verantwortlichen Teil des Prionproteins zu finden, wurden transgene Tiere mit Deletionen des PrP^C in der kritischen Oktapeptidregion (siehe Einleitung) untersucht. In verschiedenen Zellkultur-Experimenten zeichnete sich bereits ab, dass Zellen mit einem PrP^C ohne Oktapeptidregion - vergleichbar zu den PrP^C-knock-out-Mäusen - empfind-

licher auf oxidativen Schädigung reagieren (Kuwahara et al., 1999; Vassallo et al., 2005). C4/0-Mäuse haben ein N-terminal verkürztes PrP^C mit einer die gesamte Oktapeptidregion (AS 51-91) umfassenden Deletion (PrP Δ 32-93), die aber wie Prnp-knock-out-Mäuse als phänotypisch normal beschrieben werden (Flechsich et al., 2000). Nach der MCAO über 1 h mit 24 h Reperfusion fanden sich in den Modell-Mäusen ohne Oktapeptidregion mit 37 % \pm 6 % anteiligem Läsionsvolumen annähernd identische Läsionsvolumina wie in den Prnp0/0-Littermates und damit ein signifikanter Unterschied zu den Wildtyp-Tieren. Auch andere Studien zu oxidativem Stress mit weiteren transgenen Tieren mit Deletionen bzw. Insertionen der N-terminalen Oktapeptidregion des PrP^C (Sakudo et al., 2003; Yin et al., 2006) zeigten einen funktionellen Knock-out-Typus. Zusammenfassend muss davon ausgegangen werden, dass die Existenz des N-terminalen Oktarepeats bzw. eine intakte N-terminale Domäne die Voraussetzung für die neuroprotektive Funktionalität des Phänotyps unter oxidativen Stressbedingungen ist.

4.10 Histologisches Expressionsmuster von PrP^C und β -Aktin in Hinblick auf die Immunoblot-Analyse

Wie die Immunfluoreszenzfärbungen in Abbildung 32 zeigen, wiesen die Proteine PrP^C und β -Aktin im Gehirn unterschiedliche Expressionsmuster auf. In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen fand sich eine hohe Immunoreaktivität des PrP^C vermehrt in tieferen Kortexschichten, Septum-Kernen, Hypothalamus und Hippocampus-Formation (Moya et al., 2000). Dagegen schien das Zytoskelettprotein β -Aktin tendenziell vermehrt in äußeren Kortexschichten und Basalganglien exprimiert zu werden. Zielsetzung dieser Experimente war es, die hemisphärische PrP^C-Expression und PrP^C- α -Cleavage mittels Immunoblot-Analyse quantitativ zu untersuchen. Als Referenzprotein wurde β -Aktin als stabiles Zytoskelettprotein und zugleich zuverlässiger Immunoblot-Marker detektiert. Aufgrund der zu MCAO vergleichsweise geringen Läsionsgröße wurden bei CCI Proben der ganzen ipsi- bzw. kontralateralen Hemisphäre der Versuchsgruppen verglichen. Dafür musste das Expressionsmuster der Proteine nicht berücksichtigt werden. Bei MCAO jedoch wurde das Nekrose-Areal (N) sowie die Region der Infarkt-Penumbra (verbleibende ipsilaterale Hemisphäre (I)) mit einer Probe der ipsilateralen Hemisphäre der Sham-Tiere verglichen. Somit ist von einer Verschiebung des PrP^C : β -Aktin-Verhältnisses je nach Lokalisation und Ausdehnung der Schädigung auszugehen. Bei Ausdehnung über tiefere Kortexschichten wird die Menge von PrP^C im Verhältnis zum β -Aktin überschätzt, bzw. die Unterschiede zum restlichen Hirngewebe unterschätzt.

4.11 Westernblot-Analyse des PrP^C nach CCI

Die Intensitätswerte der im Westernblot detektierten Proteine wurden beim Controlled Cortical Impact in ipsi- und kontralateraler Hemisphäre verglichen. In einem ersten Versuch mit einer geringen Anzahl von $n = 5$ Tieren in den Gruppen 15 min und 24 h nach CCI fand sich ipsilateral eine signifikante Reduktion sowohl des PrP^C als auch des Referenzproteins β -Aktin nach 24h, in der kontralateralen Hemisphäre zeigte sich ein Trend (vergleiche Abbildung 17 und Abbildung 18). Das PrP^C zeigte auch in Relation zu β -Aktin große Schwankungen. Es erfolgte ein zweiter Versuch mit einer Gruppengröße von $n = 10$ unter Einbeziehung von Sham-Tieren (Narkose, Scheinoperation mit Schädelöffnung, kein CCI). Die zusätzliche unbehandelte Kontrollgruppe sollte jedoch wegen der fehlenden Vergleichbarkeit (Vorbehandlung, operativer Stress, etc.) in ihrer Bedeutung nicht zu hoch bewertet werden. Bei diesem Versuch zeigten alle CCI-Tiere in beiden Hemisphären deutliche, größtenteils signifikante Reduktionen des β -Aktins im Vergleich mit den Sham- und Kontrollgruppen (siehe Abbildung 25). Desgleichen zeigten die CCI-Tiere ipsilateral ein signifikantes Absinken des PrP^C im Vergleich zu den Shamtieren. Kontralateral zeigte sich ein entsprechender Trend (Abbildung 26). Auch relativ zu dem Referenzprotein β -Aktin bestätigte sich das Absinken des PrP^C nach CCI ipsilateral als signifikant und mit entsprechendem Trend der Werte kontralateral (vergleiche Abbildung 28). Konsequenterweise überwiegt also eine insgesamt schwächere Expression des PrP^C trotz der immunhistologisch nachweisbaren fokalen starken PrP-Immunoreaktivität.

4.12 Westernblot-Analyse des PrP^C nach MCAO

Bei der Bewertung der Expressionsstärken nach MCAO sind die zerebralen Expressionsmuster des PrP^C und β -Aktins zu berücksichtigen, da das Infarktareal im Bereich der Basalganglien mit der ipsilateralen Penumbra gesondert untersucht wurde. Nach 1 h MCAO mit 24 h Reperfusionphase fand sich in allen untersuchten Regionen (Infarktareal, Penumbra und kontralaterale Hemisphäre) ein nicht signifikanter Anstieg des β -Aktins im Vergleich mit der entsprechenden Hemisphäre der Sham-Littermates. Auch das PrP^C zeigte nach MCAO einen nicht signifikanten Anstieg der absoluten Intensitätswerte. Obwohl das Signifikanzniveau beide Male nicht erreicht wurde, könnten diese Ergebnisse dennoch von Bedeutung sein, da die Volumen-bezogene Proteinmessung wegen des Ödems grundsätzlich zu einer Unterschätzung führt. Die Infarktzone zeigte jeweils die niedrigste Proteinexpression. Diese Daten stimmen

mit dem immunhistochemischen Bild überein und sind auf den Nekrosekern zurückführbar. Da die Infarktzone (N) der Wildtypmäuse im Bereich der Basalganglien lokalisiert war, muss davon ausgegangen werden, dass hier entsprechend der zerebralen Expressionsmuster die Werte des β -Aktins überrepräsentiert und die des PrP^C umgekehrt unterrepräsentiert waren.

Der Anstieg beider Proteine nach MCAO im Gegensatz zu CCI könnte durch das Phänomen des „ischemic preconditioning“ hervorgerufen sein, einer relativ unspezifischen Proteinexpressionssteigerung von antioxidativem und neuroprotektiven Charakter, induziert durch transiente Hypoxie (Cadet and Krasnova, 2009; Chen and Simon, 1997). Gerade bei PrP^C als Protein mit zugeordneter neuroprotektiver und anti-apoptotischer Funktion (Kuwahara et al., 1999) ist im Rahmen eines „ischemic preconditioning“ mit einer Expressionssteigerung zu rechnen. Erwartungsgemäß und in Übereinstimmung mit bisherigen Untersuchungen zur PrP^C-Expression nach transientscher Ischämie (McLennan et al., 2004) wurde in dieser Arbeit ein Anstieg der PrP^C-Expression nach MCAO gemessen. Besonders interessant ist der Bezug von PrP^C auf das β -Aktin als allgemeiner Zytoskelettmarker. Relativ zu β -Aktin zeigte das PrP^C in Infarktzone (N) und Penumbra (I) der MCAO-Mäuse vergleichbare Werte wie in der ipsilateralen Hemisphäre der Sham-Mäuse, jedoch in der kontralateralen Hemisphäre einen signifikant niedrigeren Wert. Diese Konstellation deutet auf eine vergleichsweise stärkere Expressionssteigerung des PrP^C in der ipsilateralen Hemisphäre hin. Es muss allerdings einschränkend betont werden, dass im MCAO-Modell große Variabilitäten auftreten können. Anders als unter den Bedingungen einer transienten Hypoxie (MCAO) kann es bei einer unmittelbaren traumatischen Hirnschädigung (CCI) kaum zu einer Proteinregulierung und Expressionssteigerung wie im Rahmen eines „ischemic preconditioning“ kommen (Shpargel et al., 2008). In den Versuchen wurde in der ipsilateralen Hemisphäre 24 h nach CCI eine signifikante Reduzierung des PrP^C detektiert. Zusammengefasst sprechen die Daten aus MCAO- und CCI-Versuchen für eine Expressionssteigerung sowie einen Verbrauch des PrP^C unter nervenzellschädigenden Bedingungen und damit für eine neuroprotektive Funktion des Proteins.

4.13 Westernblot-Analyse des PrP Δ 32-93 nach MCAO

Anders als die Wildtyp-Mäuse zeigten C4/0-Mäuse nach 1 h MCAO mit 24 h Reperfusionphase im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Littermates in allen untersuchten Arealen eine Reduktion sowohl des PrP Δ 32-93 als auch des β -Aktins, die in der Penumbra das Signifikanzniveau erreicht. Auch relativ zum Referenzprotein zeigte das PrP Δ 32-93 in allen Area-

len eine Reduktion nach MCAO. Allerdings muss einschränkend in Betracht gezogen werden, dass es sich um Kontroll- und nicht Sham-operierte Tiere handelt – der Vergleich ist also mit Zurückhaltung zu interpretieren. Wie die volumetrischen Auswertungen zeigten, fanden sich in C4/0-Mäusen mit N-terminal verkürztem PrP Δ 32-93, ähnlich wie in Prnp0/0-Mäusen nach MCAO, signifikant größere Infarktvolumina als in Wildtyp-Mäusen, so dass also ein in diesem Zusammenhang „funktionsloses“ PrP Δ 32-93 zu diskutieren wäre. Die Abhängigkeit einer protektiven Funktion des PrP^C von der Oktarepeat-Region wurde in verschiedenen Studien an Zellkulturen vermutet (Watt and Hooper, 2005). Inwieweit von der Oktapeptidregion eine katalytische Wirkung ausgeht und ob eine Kupferbindung dafür erforderlich ist, kann aber zum aktuellen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt werden. Aus dem vorhergehenden Experiment wäre zu vermuten gewesen, dass im Rahmen eines „ischemic preconditioning“ auch das PrP Δ 32-93 nach der MCAO vermehrt nachzuweisen ist, was aber bei den C4-Mäusen nicht zutraf. Als mögliche Erklärungen neben obigen Einschränkungen für die nicht Sham-operierten Tiere kann diskutiert werden, dass „funktionsuntaugliches PrP Δ 32-93“ sich nicht wie PrP^C verhält. Zudem muss beachtet werden, dass PrP Δ 32-93 auf dem Knock-out-Hintergrund eingeführt wurde, höchstwahrscheinlich sich also nicht in dem Genlocus des „normalen“ Prnp befindet und deshalb anderen Regulationsprozessen unterliegen kann. Limitierend für alle diese Aussagen und Überlegungen ist aber die hohe, experimentell bedingte Streuung der Werte bei der MCAO, demzufolge bei nicht erreichtem Signifikanzniveau keine Überinterpretation stattfinden darf.

4.14 α -Cleavage des PrP^C bei CCI und MCAO ist erhöht

Die Untersuchung der Spaltung des Prionproteins stellt einen wichtigen Aspekt bei der putativen neuroprotektiven Funktion des Prionproteins dar, da möglicherweise eine funktionelle Aktivierung mit der Abspaltung des N-terminalen Peptids vonstatten gehen könnte. Der genaue Vorgang und dessen Auswirkungen auf die Neuroprotektion, der synaptischen Übertragung oder Modulation zellulärer Signalpathways wird derzeit aber noch diskutiert (Brown et al., 2001; Chen et al., 2003; Mange et al., 2004). Die hauptsächlich vorkommenden C-terminalen Spaltprodukte des PrP^C wurden bereits beschrieben. Durch Sequenzanalyse gelang es ein Fragment C1 zu finden, welches durch Spaltung an Position 111 / 112 (α -Cleavage) entsteht und wie PrP^C-Volllänge variabel glycolysiert und in der Zellmembran verankert ist (Chen et al., 1995). Daneben wurde ein zweites nur schwach detektierbares Fragment C2 durch Spaltung C-terminal der Oktarepeat-Region gefunden. Die vermutete Spaltstelle war

bislang nicht genau zu identifizieren und wurde in Position 91 / 92 (β -Cleavage) (Chen et al., 1995) vermutet. Auch in den in dieser Arbeit untersuchten Proben ließen sich beide Fragmente detektieren, wobei aber nur das C1-Fragment deutlich abzugrenzen war. In verschiedenen Zellkultur-Experimenten beobachtete man unter oxidativen Stressbedingungen ein Abfallen der PrP^C-Volllänge zugunsten eines Anstiegs ihrer aminoterminal verkürzten Fragmente (McMahon et al., 2001; Watt et al., 2005). Mit dem CCI-Modell wurden in dieser Arbeit zwei Versuche mit 24 h Wartezeit zur Ausbildung des Sekundärschadens durchgeführt. In dem ersten Versuch zeigte sich im Vergleich zu der Versuchsgruppe 15 min nach CCI beidhemisphärisch eine Reduktion der Intensitätswerte des C1-Fragments absolut und in Relation zu dem Referenzprotein β -Aktin (vergleiche Abbildung 19 und Abbildung 21). In Relation zur PrP^C-Volllänge fand sich jedoch ein Anstieg des C1-Fragments in beiden Hemisphären. Das Signifikanzniveau wurde allerdings nicht erreicht. Bei der Erweiterung des Versuchs auf 10 Mäuse je Versuchsgruppe mit zusätzlicher Shamgruppe zeigte sich nun sowohl 15 min als auch 24 h nach CCI eine ipsilateral signifikante Reduktion der absoluten Intensitätswerte des C1-Fragments im Vergleich mit den Sham-Littermates (siehe Abbildung 27). Der Bezug auf β -Aktin und die PrP^C-Volllänge zeigte weiterhin nur einen Trend. Die Werte der unbehandelten Kontrollgruppe sollten wegen der anderen Bedingungen nicht überinterpretiert werden. Insgesamt ist bei dem Modell des CCI von einem Anstieg des C1-Fragments nach 24 h auszugehen. Im Übereinstimmung dazu zeigte sich auch bei Tieren nach 1 h MCAO mit 24 h Reperfusionphase ipsi- und kontralateral ein Anstieg der absoluten Intensitätswerte des C1-Fragments im Vergleich zur Shamgruppe (siehe 39). Die Werte zeigen aber größere Schwankungen als bei dem CCI-Modell. So bleibt die Ratio C1-Fragment : β -Aktin ohne Aussagekraft. Zudem muss das unterschiedliche zerebrale Expressionsmusters der Proteine PrP^C und β -Aktin (s.o.) bei der Interpretation mit berücksichtigt werden. Die Ratio C1-Fragment : PrP^C-Volllänge ist davon unabhängig. Hier war ein signifikanter Anstieg des Spaltungsprodukts sowohl ipsilateral in Infarktregion und Penumbra, als auch in der kontralateralen Hemisphäre (siehe Abbildung 41) nachzuweisen. Beide Tierversuchmodelle lassen eine Übereinstimmung hinsichtlich einer verstärkten α -Cleavage unter den oxidativen Stressbedingungen erkennen. Das steht ebenfalls in Übereinstimmung mit eingangs erwähnten Publikationen unter Verwendung von Zellkulturen. McMahon et al. demonstrierten 2001, dass lösliches PrP^C abhängig von einer Exposition zu ROS (H₂O₂ und Kupfer) verstärkt der β -Cleavage unterliefe. 2005 konnten Watt et. al. weiterführend anhand densitometrischer Immunoblot-Auswertung von SH-SY5Y-Zell-Lysat (n = 3) einen signifikanten Anstieg der β -Cleavage der PrP^C-Volllänge nach 10-minütiger ROS-Exposition (H₂O₂ und Kupfer) zeigen. Untersuchungen dieser Art

müssen jedoch in Hinblick auf eine in-vitro-Degradation des PrP^C kritisch betrachtet werden. Bei den in dieser Studie eingesetzten in-vivo-Modellen lassen die rasche Kryokonservierung des Gewebes und der Einsatz denaturierender Reagenzien jedoch eine spätere Spaltung des PrP^C – auch durch unspezifische Proteolyse – weitestgehend ausschließen.

4.15 α -Cleavage des PrP Δ 32-93 existiert und ist bei MCAO ist erhöht

Überraschenderweise zeigte die Immunoblot-Analyse, dass das N-terminal verkürzte PrP Δ 32-93 der C4/0-Mäuse ebenfalls einer α -Cleavage unterliegt. Nach 1 h MCAO mit 24 h Reperfusionphase fand sich in allen untersuchten Arealen eine deutliche Reduktion der absoluten Intensitätswerte der PrP Δ 32-93-Volllänge sowie des C1-Spaltprodukts im Vergleich mit den mit unbehandelten Kontrollhirnen (vergleiche Abbildung 45), wobei für den Vergleich mit den Kontrolltieren obige Einschränkungen zu machen sind (siehe 4.13.). Die C4/0-Tiere zeigten nach MCAO im Infarktareal einen signifikanten sowie in ipsi- und kontralateraler Hemisphäre einen deutlichen Anstieg des Verhältnisses C1-Fragment : PrP Δ 32-93-Volllänge (Abbildung 48). Diese Veränderung verhält sich ähnlich wie bei den Untersuchungen an den Wildtyptieren. Interessanterweise scheint also die α -Cleavage des PrP^C und PrP Δ 32-93 unabhängig vom Vorhandensein der Oktarepeat-Region durch oxidativen Stress gesteigert zu werden. Wie jedoch die volumetrischen Ergebnisse zeigten konnte das N-terminal verkürzte PrP Δ 32-93 trotz 1,5-fach höherer Expressionsrate den neuroprotektiven Effekt des PrP^C nicht erhalten. Diese Ergebnisse deuten an, dass weder die Präsenz des C1-Fragments, noch der Prozess der Cleavage an der neuroprotektiven Funktion des PrP^C beteiligt sein können. Möglicherweise stellt aber das korrespondierende N1-Fragment mit seiner Oktapeptidregion das biologisch aktive α -Cleavage-Produkt dar. Das zelluläre Trafficking der niedermolekularen, nach extrazellulär abgegebenen N-terminalen Spaltprodukte ist variabel, von schneller weiterer Degradation begleitet und sein Nachweis schwierig (Perera and Hooper, 2001). Ein bakteriell hergestelltes N-terminales Peptid erwies sich als zu instabil und unterlag einem schnellen Abbau (Hornemann and Glockshuber, 1996). In Zellkultur gelang es immerhin, ein PrP^C-Fragment von 11-12 kDa als den N-terminalen Gegenpart des C1-Fragments zu identifizieren (Vincent et al., 2000). Der Metabolismus des N1-Fragments in vivo und seine Rolle für eine neuroprotektive Funktion des PrP^C bleibt leider noch offen. In jedem Fall kann aber in dieser Arbeit ein Anstieg der α -Cleavage unter oxidativem Stress festgestellt werden, der auf eine Bedeutung der Spaltung über eine physiologische Degradation (und Inaktivierung) des Proteins hinaus hinweisen könnte. Die Spaltstelle der α -Cleavage zwischen Histidin 111 und

Methionin 112 befindet sich in der potentiell neurotoxischen amyloidogenen Domäne AS 106-126 des PrP^C (Jobling et al., 1999). Somit könnte die Aufklärung der funktionellen Bedeutung der PrP^C-Spaltung helfen, bei Prionkrankheiten die dysfunktionale Komponente der Neurodegeneration zu verstehen. Der Mechanismus der α -Cleavage selbst ist noch unbekannt. Verschiedene Untersuchungen deuten auf eine über den Proteinkinase-C-Pathway und durch diverse Disintegrin-Metalloproteasen (ADAM 9, 10, 17) regulierte Proteolyse hin (Vincent et al., 2000). Inwiefern einer der Pathways als Ziel einer therapeutischen Intervention zum Aufhalten oder Verlangsamens Prion-assoziiierter Erkrankungen dienen kann, bleibt zu untersuchen.

4.16 β -Cleavage bei AS 88/89 : PrP Δ 32-93 unterläuft keiner β -Cleavage

Wie die detaillierte Analyse unter Kapitel 3.4 zeigt, befindet sich die Schnittstelle der PrP^C- β -Cleavage sehr wahrscheinlich in der Oktarepeatregion (AS 51-90) zwischen Tryptophan 88 und Glycin 89. Auch unter Berücksichtigung eventueller Fehler und großzügiger Auslegung kann das Δ PrP der C4/0-Mäuse mit Deletion der N-terminalen Aminosäuresequenz 32-93 die β -Cleavage-Stelle nicht enthalten, sondern unterläuft allein einer α -Cleavage, die zu einem C1-Fragment wie beim Wildtyp führt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit bisherigen Untersuchungen, die die β -Cleavage ebenfalls in oder nahe der Oktarepeatregion vermuten ließen (Jimenez-Huete et al., 1998; Mange et al., 2004; McMahon et al., 2001). Übereinstimmend mit dieser Studie fanden McMahon et al. bereits 2001 unter oxidativen Bedingungen einen Anstieg der aminoterminal verkürzten Spaltprodukte der PrP^C-Volllänge. Des Weiteren berichteten sie, dass die Oktapeptidregion einer spezifischen kupfer- und pH-abhängigen Spaltung unterstehe. Wie in bisherigen Untersuchungen erschienen auch in dieser Studie die dem C2-Fragment entsprechenden Banden der ischämischen Prnp^{+/+}-Mäusehirne schwächer zu sein, während die Intensität der Banden des C1-Fragments verglichen mit Prnp^{+/+}-Sham-Kontrollen verstärkt detektiert wurde. Mangé und Mitarbeiter argumentierten, dass das PrP^C zuerst an der β -Cleavage-Stelle nahe der Oktapeptidregion gespalten und das C2-Fragment als biologisch aktive Form des PrP^C freigesetzt werde. Dieses biologisch aktive erste Spaltprodukt werde durch eine schnell nachfolgende α -Cleavage inaktiviert, was die verstärkte Detektion des C1-Fragments erklären könnte. Sie zeigten zudem anhand eines PrP Δ 110-119 (Deletion der α -Cleavage-Stelle 111 / 112) ein von der α -Cleavage unabhängiges Auftreten der β -Cleavage bei signifikant verbesserter Überlebensfähigkeit der transgenen Zellen unter oxidativem Stress (Mange et al., 2004). In dieser Studie zeigten PrP Δ 32-93-Mäuse mit Deletion der

berechneten β -Cleavage-Stelle 88/89 unter hypoxischen Bedingungen ein signifikant verschlechtertes zelluläres Überleben trotz (gesteigerter) α -Cleavage. Diese Daten deuten einerseits darauf hin, dass α - und β -Cleavage des PrP^C als zwei jeweils unabhängige proteolytische Ereignisse eintreten könnten. Andererseits könnte das verkürzte Δ PrP der C4/0-Mäuse anstelle des C2 als funktionsloses Substrat der α -Cleavage abgebaut werden. Ob das C2-Fragment tatsächlich als Precursor-Protein einer relevanten α -Cleavage unterläuft, müsste weiterführend untersucht werden, erscheint aber höchst unwahrscheinlich. Zusammen genommen unterstützen die Daten die Hypothese, dass ein Fehlen der β -Cleavage assoziiert ist mit dem Verlust der neuroprotektiven Funktion des PrP^C (Watt et al., 2005). Die hier identifizierte β -Cleavage-Stelle zwischen Tryptophan in Position 88 und Glycin in Position 89 ist eine bekannte Spaltstelle von Serinproteasen wie der Proteinase K (Zou et al., 2003). Die Familie der ubiquitären Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen umfasst auch die Verdauungsenzyme Trypsin, Elastase, Plasmin oder Thrombin. Serinproteasen verdauen Proteine bevorzugt hinter hydrophoben Aminosäuren, wofür das aromatische Tryptophan an Position 88 in Frage kommen würde (Mekonnen et al., 2006). Es wäre denkbar, dass die gesteigerte β -Cleavage des PrP^C bei oxidativem Stress und Zelltod die Folge einer unspezifischen Proteolyse durch eine ubiquitäre Serinprotease sein könnte (Solary et al., 1998). Im Sinne einer oxidativen nicht-enzymatischen Proteinspaltung könnten jedoch auch durch Redox-Reaktionen am proteingebundenen Kupfer generierte ROS die β -Cleavage auslösen (Kim et al., 1985). In diesem Fall ist eine Partizipation der Kupfer bindenden Oktapeptide an Redox-Reaktionen anzunehmen und daher eine Rolle der N-terminalen Spaltung bei der zellulären Antwort auf oxidativen Stress. Es könnte deswegen die Hypothese aufgestellt werden, dass Freisetzung durch die Spaltung die Oktapeptide direkt zu entgiftenden Reaktionen oder Interaktion mit Signalkomplexen befähigt (Vassallo and Herms, 2003). Weitere Studien müssen zeigen, inwiefern die Spaltung des PrP^C mit der Freisetzung N-terminaler Fragmente für die neuroprotektive Funktion des Proteins wirklich relevant ist.

5 Zusammenfassung

Die physiologische Funktion des mit den Prionerkrankungen assoziierten zellulären Prionproteins (PrP^C) ist noch ungeklärt. Jedoch gibt es Evidenz für eine komplexe Beteiligung des vorwiegend im zentralen Nervensystem exprimierten PrP^C bei pathophysiologischen Mechanismen unter oxidativem Stress. Mäuse mit Knock-out des PrP^C-Gens Prnp zeigten eine erhöhte neuronale Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress (Brown et al., 1998). Weitere Untersuchungen mit Deletion des Prnp weisen auf eine essentielle Bedeutung der N-terminalen Oktarepeats (repetitive Sequenz von acht AS) des PrP^C für die neuroprotektive Funktion hin (Bounhar et al., 2001). Viele der in vitro gewonnenen Erkenntnisse wurden im Tiermodell noch nicht weiterführend untersucht. Bei ersten in-vivo-Studien von Hoshino et al. (2003) und McLennan et al. (2004) zeigten Prnp-knock-out-Mäuse nach experimenteller Hirnschädigung signifikant größere Läsionen als Wildtypiere. Im Rahmen des Projekts „Zerebrales Trauma und ischämischer Insult im Mausmodell“ in Kooperation mit dem Institut für chirurgische Forschung (LMU, Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Plesnila) und der Neurologischen Klinik (LMU, Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Hamann) wurde ein Traumamodell (Controlled Cortical Impact, CCI) sowie das Modell einer transienten zerebralen Ischämie mit Reperusionsphase (Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO) etabliert. Es wurden Geschwister von Wildtyp-, Prnp-knock-out-Mäusen und transgenen Mäusen (Deletion der Oktarepeat-Region: PrP Δ 32-93) mit schein- und unbehandelten Kontrollmäusen verglichen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorausgehenden Studien zeigten volumetrische Auswertungen nach CCI sowie nach MCAO signifikant größere Läsionsvolumina der Prnp-knock-out-Mäuse im Vergleich mit den Wildtyp-Littermates. In Mäusen mit N-terminaler Deletion (PrP Δ 32-93) fanden sich nach MCAO vergleichbare Läsionsvolumina wie in den Prnp-knock-out-Mäusen, ein Hinweis auf die Abhängigkeit der neuroprotektiven Funktion des PrP^C vom Vorhandensein einer intakten N-terminalen Domäne. Aus Zellkultur-Untersuchungen wurde vermutet, dass unter oxidativem Stress vermehrt die N-terminal verkürzten PrP^C-Spaltprodukte C1 (α -Cleavage, Position 111/112) und C2 (β -Cleavage, Schnittstelle hinter der Oktarepeat-Region AS 51-91 vermutet) auftreten. Ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der Funktion des PrP^C ist daher eine detaillierte Kenntnis dieser Prozesse in vivo. Mittels einer neuen Methode gelang in der vorliegenden Arbeit isolierte Hirnschnittareale bezüglich des Auftretens der Spaltprodukte zu untersuchen. Das Molekulargewicht der PrP^C-Volllänge lag bei ca. 28 kDa, das C1-Fragment bei ca. 16 kDa, das C2-Fragment als zarte

Bande bei ca. 21 kDa sowie das PrP Δ 32-93 bei ca. 20 kDa. Das stabile Zytoskelettprotein β -Aktin stellte sich bei etwa 43 kDa dar. In einer densitometrischen Auswertung wurde die Expression der PrP^C- und PrP Δ 32-93-Volllänge sowie des Spaltprodukts C1 quantitativ und in Referenz zu β -Aktin analysiert. 24h nach CCI zeigte sich ein Abfall der detektierten PrP-Menge. Bei MCAO zeigte sich im Infarktareal die niedrigste Proteinexpression, diese Daten stimmten mit dem immunhistochemischen Bild überein. Wie bei den bisherigen in-vitro-Versuchen (McMahon et al., 2001) zeigte sich nach CCI und MCAO ein Anstieg der Ratio C1-Fragment : PrP^C-Volllänge zugunsten des Spaltprodukts. Der Anstieg der α -Cleavage (s.o.) des PrP^C scheint daher von Intensität und Ausmaß der oxidativen Schädigung abhängig zu sein. Überraschenderweise fand sich unter den ischämischen Bedingungen eine ebenfalls gesteigerte α -Cleavage des PrP Δ 32-93. Wie jedoch die volumetrischen Ergebnisse zeigten, konnte das N-terminal verkürzte PrP Δ 32-93 den neuroprotektiven Effekt des PrP^C nicht erhalten. Diese Ergebnisse deuten an, dass das C1-Fragment nicht an der neuroprotektiven Funktion des PrP^C beteiligt sein kann. Des Weiteren zeigte sich in einer hoch auflösenden Immunoblot-Analyse, dass das PrP Δ 32-93 keiner β -Cleavage unterliegt. Die Spaltstelle der β -Cleavage wurde innerhalb der Oktarepeat-Region bei AS 88/89 identifiziert. Damit wäre die Möglichkeit einer unspezifischen Proteolyse des PrP^C durch ubiquitäre Serinproteasen wie Proteinase K nicht auszuschließen. Der genaue Mechanismus beider Spaltungen bleibt jedoch noch ungeklärt. Die diskutierte Funktion des C2-Fragments als biologisch aktives erstes Spaltprodukt mit Inaktivierung durch eine schnell nachfolgende α -Cleavage erscheint unwahrscheinlich. Die korrespondierenden N-terminalen Fragmente sind schwierig zu detektieren und ein Einfluss auf die neuroprotektive Funktion des PrP^C ist unbekannt. Sie könnten aber eine entscheidende Rolle bei der Neuroprotektion einnehmen.

Der Großteil der erhobenen Daten ist im Rahmen folgender Artikel veröffentlicht:

Mitteregger G, Vosko M, Krebs B, Xiang W, Kohlmannsperger V, Nolting S, Hamann GF, Kretschmar HA. The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein. *Brain Pathol.* 2007 Apr;17(2):174-83.

Krebs B, Kohlmannsperger V, Nolting S, Schmalzbauer R, Kretschmar HA. A method to perform Western blots of microscopic areas of histological sections. *J Histochem Cytochem.* 2006 May;54(5):559-65.

6 Literaturverzeichnis

Aguzzi,A. (2003). Prions and the immune system: a journey through gut, spleen, and nerves. *Adv. Immunol.* *81*, 123-171.

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.

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.

Baldwin,M.A. (2005). Analysis of glycosylphosphatidylinositol protein anchors: the prion protein. *Methods Enzymol.* *405*, 172-187.

Beghi,E., Gandolfo,C., Ferrarese,C., Rizzuto,N., Poli,G., Tonini,M.C., Vita,G., Leone,M., Logroscino,G., Granieri,E., Salemi,G., Savettieri,G., Frattola,L., Ru,G., Mancardi,G.L., and Messina,C. (2004). Bovine spongiform encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob disease: facts and uncertainties underlying the causal link between animal and human diseases. *Neurol. Sci.* *25*, 122-129.

Behrens,A., Genoud,N., Naumann,H., Rulicke,T., Janett,F., Heppner,F.L., Ledermann,B., and Aguzzi,A. (2002). Absence of the prion protein homologue Doppel causes male sterility. *EMBO J* *21*, 3652-3658.

Bolton,D.C., McKinley,M.P., and Prusiner,S.B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* *218*, 1309-1311.

Borchelt,D.R., 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.

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., 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., Schmidt,B., and Kretzschmar,H.A. (1998). Effects of copper on survival of prion protein knockout neurons and glia. *J Neurochem.* *70*, 1686-1693.

- Brown,D.R., Schulz-Schaeffer,W.J., Schmidt,B., and Kretzschmar,H.A. (1997b). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp. Neurol.* *146*, 104-112.
- Brown,D.R., Wong,B.S., Hafiz,F., Clive,C., Haswell,S.J., and Jones,I.M. (1999). Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem. J* *344 Pt 1*, 1-5.
- Brown,P., Preece M.A., and Will,R.G. (1992). "Friendly fire" in medicine: hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* *340*, 24-27.
- Bueler,H., Aguzzi,A., Sailer,A., Greiner,R.A., Autenried,P., Aguet,M., and Weissmann,C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* *73*, 1339-1347.
- 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.
- Bulgin,M.S. and Melson,S.S. (2007). What veterinary practitioners should know about scrapie. *J Am. Vet Med. Assoc.* *230*, 1158-64, 1120.
- Bush,A.I. (2000). Metals and neuroscience. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *4*, 184-191.
- Cadet,J.L. and Krasnova,I.N. (2009). Cellular and molecular neurobiology of brain preconditioning. *Mol. Neurobiol.* *39*, 50-61.
- Cali,I., Castellani,R., Yuan,J., Al Sheklee,A., Cohen,M.L., Xiao,X., Moleres,F.J., Parchi,P., Zou,W.Q., and Gambetti,P. (2006). Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease revisited. *Brain* *129*, 2266-2277.
- Caramelli,M., Ru,G., Acutis,P., and Forloni,G. (2006). Prion diseases: current understanding of epidemiology and pathogenesis, and therapeutic advances. *CNS. Drugs* *20*, 15-28.
- 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.
- Caughey,B. (1991). In vitro expression and biosynthesis of prion protein. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *172*, 93-107.
- 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.
- Chandler,R.L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* *1*, 1378-1379.
- Chen,J. and Simon,R. (1997). Ischemic tolerance in the brain. *Neurology* *48*, 306-311.

- Chen,S., Mange,A., Dong,L., Lehmann,S., and Schachner,M. (2003). 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.
- Chen,S.G., Zou,W., Parchi,P., and Gambetti,P. (2000). PrP(Sc) typing by N-terminal sequencing and mass spectrometry. *Arch. Virol. Suppl* 209-216.
- 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.
- Chu,F.K. (1986). Requirements of cleavage of high mannose oligosaccharides in glycoproteins by peptide N-glycosidase F. *J Biol Chem* 261, 172-177.
- Cohen,F.E. and Prusiner,S.B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 793-819.
- Colchester,A.C. and Colchester,N.T. (2005). The origin of bovine spongiform encephalopathy: the human prion disease hypothesis. *Lancet* 366, 856-861.
- 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.
- 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.
- Collins,S., McLean,C.A., and Masters,C.L. (2001). Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome,fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies. *J Clin. Neurosci.* 8, 387-397.
- Collins,S.J., Sanchez-Juan,P., Masters,C.L., Klug,G.M., van Duijn,C., Poggi,A., Pocchiarini,M., Almonti,S., Cuadrado-Corrales,N., Pedro-Cuesta,J., Budka,H., Gelpi,E., Glatzel,M., Tolnay,M., Hewer,E., Zerr,I., Heinemann,U., Kretschmar,H.A., Jansen,G.H., Olsen,E., Mitrova,E., Alperovitch,A., Brandel,J.P., Mackenzie,J., Murray,K., and Will,R.G. (2006). Determinants of diagnostic investigation sensitivities across the clinical spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 129, 2278-2287.
- Creutzfeldt,H.G. (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Gesamte Neurol Psychiatrie* 57, 1-18.
- Crick,F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature* 227, 561-563.

Cuille,J. and Chelle,P.L. (1936). La maladie dite de la tremblante du mouton est-elle inoculable? C R Seances Acad Sci 26, 1552-1554.

Dixon,C.E., Clifton,G.L., Lighthall,J.W., Yaghamai,A.A., and Hayes,R.L. (1991). A Controlled Cortical Impact Model of Traumatic Brain Injury in the Rat. Journal of Neuroscience Methods 39, 253-262.

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

Engel,D.C., Mies, G., Terpolilli,N.A., Trabold,R., Loch,A., De Zeeuw,C.L., Weber,J.T., Maas,A.L., Plesnila,N. (2008). Changes of cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical contusion assessed by ¹⁴C-iodoantipyrine autoradiography in mice using a non-invasive protocol. J Neurotrauma 25, 739-53

Esiri,M.M., Carter,J., and Ironside,J.W. (2000). Prion protein immunoreactivity in brain samples from an unselected autopsy population: findings in 200 consecutive cases. Neuropathol Appl Neurobiol 26, 273-284.

Flechsigg,E., Shmerling,D., Hegyi,I., Raeber,A.J., Fischer,M., Cozzio,A., von Mering,C., Aguzzi,A., and Weissmann,C. (2000). Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice. Neuron 27, 399-408.

Flechsigg,E. and Weissmann,C. (2004). The role of PrP in health and disease. Curr. Mol. Med. 4, 337-353.

Fotheringham,A.P., Davies,C.A., and Davies,I. (2000). Oedema and glial cell involvement in the aged mouse brain after permanent focal ischaemia. Neuropathol Appl Neurobiol 26, 412-423.

Fournier,J.G., Escaig-Haye,F., and Grigoriev,V. (2000). Ultrastructural localization of prion proteins: physiological and pathological implications. Microsc. Res. Tech. 50, 76-88.

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.

Gambetti,P., Kong,Q., Zou,W., Parchi,P., and Chen,S.G. (2003). Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. Br. Med. Bull. 66, 213-239.

Gerstmann,J., Strüssler,E., and Scheinker,I. (1936). Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. Z Neurol 154, 736-762.

Gibbs,C.J., Jr., Gajdusek,D.C., and Latarjet,R. (1978). Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 75, 6268-6270.

- Gill,A.C., Ritchie,M.A., Hunt,L.G., Steane,S.E., Davies,K.G., Bocking,S.P., Rhie,A.G., Bennett,A.D., and Hope,J. (2000). Post-translational hydroxylation at the N-terminus of the prion protein reveals presence of PPII structure in vivo. *EMBO J* 19, 5324-5331.
- Griffoni,C., Toni,M., Spisni,E., Bianco,M., Santi,S., Riccio,M., and Tomasi,V. (2003). The cellular prion protein: biochemistry, topology, and physiologic functions. *Cell Biochem. Biophys.* 38, 287-304.
- Hadlow,W.J. (1959). Scrapie and Kuru. *Lancet* 2, 289-290.
- Haraguchi,T., Fisher,S., Olofsson,S., Endo,T., Groth,D., Tarentino,A., Borchelt,D.R., Teplow,D., Hood,L., Burlingame,A., and . (1989). Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 1-13.
- Harris,D.A., Huber,M.T., van Dijken,P., Shyng,S.L., Chait,B.T., and Wang,R. (1993). Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry* 32, 1009-1016.
- 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.
- Herman,I.M. (1993). Actin isoforms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 48-55.
- Herms,J.W., Tings,T., Dunker,S., and Kretschmar,H.A. (2001). Prion protein affects Ca²⁺-activated K⁺ currents in cerebellar purkinje cells. *Neurobiol Dis.* 8, 324-330.
- Hooper,N.M. (2005). Glycosylation and GPI anchorage of the prion protein. *Adv. Exp. Med. Biol.* 564, 95-96.
- 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.
- Hornemann,S. and Glockshuber,R. (1996). Autonomous and reversible folding of a soluble amino-terminally truncated segment of the mouse prion protein. *J Mol. Biol.* 261, 614-619.
- 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.
- Jakob,A. (1921). Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Z Gesamte Neurol Psychatrie* 64, 147-228.

- 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.
- Jobling,M.F., Stewart,L.R., White,A.R., McLean,C., Friedhuber,A., Maher,F., Beyreuther,K., Masters,C.L., Barrow,C.J., Collins,S.J., and Cappai,R. (1999). The hydrophobic core sequence modulates the neurotoxic and secondary structure properties of the prion peptide 106-126. *J Neurochem.* *73*, 1557-1565.
- 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.
- Kim,K., Rhee,S.G., and Stadtman,E.R. (1985). Nonenzymatic cleavage of proteins by reactive oxygen species generated by dithiothreitol and iron. *J Biol. Chem.* *260*, 15394-15397.
- Kim,S.J., Rahbar,R., and Hegde,R.S. (2001). Combinatorial control of prion protein biogenesis by the signal sequence and transmembrane domain. *J Biol. Chem.* *276*, 26132-26140.
- Kirkwood,J.K., Wells,G.A., Wilesmith,J.W., Cunningham,A.A., and Jackson,S.I. (1990). Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Oryx leucoryx*) and a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). *Vet Rec.* *127*, 418-420.
- 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.
- Korte,S., Vassallo,N., Kramer,M.L., Kretzschmar,H.A., and Herms,J. (2003). Modulation of L-type voltage-gated calcium channels by recombinant prion protein. *J Neurochem.* *87*, 1037-1042.
- Krebs,B., Kohlmannsperger,V., Nolting,S., Schmalzbauer,R., and Kretzschmar,H.A. (2006). A method to perform Western blots of microscopic areas of histological sections. *J. Histochem. Cytochem.* *54*, 559-565.
- 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. (1986a). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am. J Pathol.* *122*, 1-5.
- Kretzschmar,H.A., Stowring,L.E., Westaway,D., Stubblebine,W.H., Prusiner,S.B., and DeArmond,S.J. (1986b). Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* *5*, 315-324.
- Kretzschmar,H.A., Tings,T., Madlung,A., Giese,A., and Herms,J. (2000). Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse. *Arch. Virol. Suppl* 239-249.

- 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.
- Laffont-Proust,I., Faucheux,B.A., Hassig,R., Sazdovitch,V., Simon,S., Grassi,J., Hauw,J.J., Moya,K.L., and Haik,S. (2005). The N-terminal cleavage of cellular prion protein in the human brain. *FEBS Lett.* 579, 6333-6337.
- Laffont-Proust,I., Hassig,R., Haik,S., Simon,S., Grassi,J., Fonta,C., Faucheux,B.A., and Moya,K.L. (2006). Truncated PrP(c) in mammalian brain: interspecies variation and location in membrane rafts. *Biol. Chem.* 387, 297-300.
- Lansbury,P.T., Jr. and Kosik,K.S. (2000). Neurodegeneration: new clues on inclusions. *Chem. Biol.* 7, R9-R12.
- Leary,J.J., Brigati,D.J., and Ward,D.C. (1983). Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 4045-4049.
- LeBlanc,A. (1998). Unravelling the controversy of prion diseases. In *Handbook of aging brain*, E.Wang and S.Snyder, eds. (New York: Academic press), pp. 202-214.
- Lehtinen,M.K. and Bonni,A. (2006). Modeling oxidative stress in the central nervous system. *Curr. Mol. Med.* 6, 871-881.
- Leliveld,S.R., Dame,R.T., Wuite,G.J., Stitz,L., and Korth,C. (2006). The expanded octarepeat domain selectively binds prions and disrupts homomeric prion protein interactions. *J Biol. Chem.* 281, 3268-3275.
- Leopoldt,J.G. (1759). Von denen mancherley Krankheiten des Schaafviehes, und was vor Euren damit vorgenommen werden. In *Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zu der Landwirthschaft. Fünf Theile.*, (Berlin und Glogau: Christian Friedrich Günther), pp. 344-360.
- Lewen,A. and Hillered,L. (1998). Involvement of reactive oxygen species in membrane phospholipid breakdown and energy perturbation after traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 15, 521-530.
- Liberski,P.P. and Budka,H. (2004). Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. I. Human diseases. *Folia Neuropathol* 42 *Suppl B*, 120-140.

- Liu,T., Li,R., Pan,T., Liu,D., Petersen,R.B., Wong,B.S., Gambetti,P., and Sy,M.S. (2002). Intercellular transfer of the cellular prion protein. *J Biol. Chem.* 277, 47671-47678.
- 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.
- Lugaresi,E., Medori,R., Montagna,P., Baruzzi,A., Cortelli,P., Lugaresi,A., Tinuper,P., Zucconi,M., and Gambetti,P. (1986). Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N. Engl. J Med.* 315, 997-1003.
- Lysek,D.A., Schorn,C., Nivon,L.G., Esteve-Moya,V., Christen,B., Calzolari,L., von Schroetter,C., Fiorito,F., Herrmann,T., Guntert,P., and Wuthrich,K. (2005). Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 640-645.
- 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.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.
- Martins,V.R., Mercadante,A.F., Cabral,A.L., Freitas,A.R., and Castro,R.M. (2001). Insights into the physiological function of cellular prion protein. *Braz. J Med. Biol. Res.* 34, 585-595.
- McKinley,M.P., Meyer,R.K., Kenaga,L., Rahbar,F., Cotter,R., Serban,A., and Prusiner,S.B. (1991). Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J Virol.* 65, 1340-1351.
- 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.
- Mead,S. (2006). Prion disease genetics. *Eur. J Hum. Genet.* 14, 273-281.
- Mekonnen,S.M., Olufsen,M., Smalas,A.O., and Bransdal,B.O. (2006). Predicting proteinase specificities from free energy calculations. *J Mol. Graph. Model.* 25, 176-185.
- Milhavet,O. and Lehmann,S. (2002). Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 38, 328-339.

- Montagna,P. (2005). Fatal familial insomnia: a model disease in sleep physiopathology. *Sleep Med. Rev.* 9, 339-353.
- Moore,R.A., Vorberg,I., and Priola,S.A. (2005). Species barriers in prion diseases--brief review. *Arch. Virol. Suppl* 187-202.
- 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.
- Moudjou,M., Frobert,Y., Grassi,J., and La Bonnardiere,C. (2001). Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. *J Gen. Virol.* 82, 2017-2024.
- 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.
- Moya,K.L., Sales,N., Hassig,R., Creminon,C., Grassi,J., and Di Giamberardino,L. (2000). Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain. *Microsc. Res. Tech.* 50, 58-65.
- 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.
- Negro,A., Meggio,F., Bertoli,A., Battistutta,R., Sorgato,M.C., and Pinna,L.A. (2000). Susceptibility of the prion protein to enzymic phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 337-341.
- Ning,Z.Y., Zhao,D.M., Yang,J.M., Cui,Y.L., Meng,L.P., Wu,C.D., and Liu,H.X. (2005). Quantification of prion gene expression in brain and peripheral organs of golden hamster by real-time RT-PCR. *Anim Biotechnol.* 16, 55-65.
- Nishida,N., Katamine,S., Shigematsu,K., Nakatani,A., Sakamoto,N., Hasegawa,S., Naka-oke,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.
- Nissl,F. (1894). Über eine neue Untersuchungsmethode des Centralorgans speziell zur Feststellung der Lokalisation der Nervenzellen. *Zentralblatt für Nervenheilkunde und Psychiatrie* 17, 337-344.
- 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.

- Otvos,L., Jr. and Cudic,M. (2002). Post-translational modifications in prion proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3, 643-652.
- 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,K.M., Stahl,N., and Prusiner,S.B. (1992). Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain. *Protein Sci.* 1, 1343-1352.
- Parchi,P., Giese,A., Capellari,S., Brown,P., Schulz-Schaeffer,W., Windl,O., Zerr,I., Budka,H., Kopp,N., Piccardo,P., Poser,S., Rojiani,A., Streichenberger,N., Julien,J., Vital,C., Ghetti,B., Gambetti,P., and Kretschmar,H. (1999). Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann. Neurol.* 46, 224-233.
- Pauly,P.C. and Harris,D.A. (1998). Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol. Chem.* 273, 33107-33110.
- Perera,W.S. and Hooper,N.M. (2001). Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr. Biol.* 11, 519-523.
- Plummer,T.H., Jr. and Tarentino,A.L. (1991). Purification of the oligosaccharide-cleaving enzymes of *Flavobacterium meningosepticum*. *Glycobiology* 1, 257-263.
- Prusiner,S.B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science* 252, 1515-1522.
- Prusiner,S.B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 13363-13383.
- Prusiner,S.B. (2001). Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions. *N. Engl. J Med.* 344, 1516-1526.
- 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.
- Rachidi,W., Riondel,J., McMahon,H.M., and Favier,A. (2005). [Prion protein and copper: a mysterious relationship]. *Pathol. Biol. (Paris)* 53, 244-250.
- Rachidi,W., Vilette,D., Guiraud,P., Arlotto,M., Riondel,J., Laude,H., Lehmann,S., and Favier,A. (2003). Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery. *J Biol. Chem.* 278, 9064-9072.
- Ricketts,M.N. (2004). Public health and the BSE epidemic. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 284, 99-119.

- 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.
- Roucou,X., Gains,M., and LeBlanc,A.C. (2004). Neuroprotective functions of prion protein. *J Neurosci. Res.* 75, 153-161.
- Sakudo,A., Lee,D.C., Saeki,K., Nakamura,Y., Inoue,K., Matsumoto,Y., Itohara,S., and Onodera,T. (2003). 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.
- Sakudo,A., Onodera,T., Suganuma,Y., Kobayashi,T., Saeki,K., and Ikuta,K. (2006). Recent advances in clarifying prion protein functions using knockout mice and derived cell lines. *Mini. Rev. Med. Chem.* 6, 589-601.
- 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.
- Shirai,A., Matsuyma,A., Yashiroda,Y., Hashimoto,A., Kawamura,Y., Arai,R., Komatsu,Y., Horinouchi,S., and Yoshida,M. (2008). Global analysis of gel mobility of proteins and its use in target identification. *J Biol Chem* 283, 10745-10752.
- 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.
- Shpargel,K.B., Jalabi,W., Jin,Y., Dadabayev,A., Penn,M.S., and Trapp,B.D. (2008). Preconditioning paradigms and pathways in the brain. *Cleve. Clin. J. Med.* 75 *Suppl* 2, S77-S82.
- Sigurdsson,B. (1954). With several remarks on infections which develop slowly and several of their characteristics. *Br Vet J* 110, 354.
- Silverman,G.L., Qin,K., Moore,R.C., Yang,Y., Mastrangelo,P., Tremblay,P., Prusiner,S.B., Cohen,F.E., and Westaway,D. (2000). Doppel is an N-glycosylated, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. Expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp(0/0) mice predisposed to Purkinje cell loss. *J Biol. Chem.* 275, 26834-26841.
- Smith,D.H., Soares,H.D., Pierce,J.S., Perlman,K.G., Saatman,K.E., Meaney,D.F., Dixon,C.E., and McIntosh,T.K. (1995). A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J. Neurotrauma* 12, 169-178.
- Solary,E., Eymin,B., Droin,N., and Haugg,M. (1998). Proteases, proteolysis and apoptosis. *Cell Biol Toxicol* 14, 121-132.

- 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., 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.
- 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.
- 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.
- Taylor,D.R. and Hooper,N.M. (2007). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates the endocytosis of the cellular prion protein. *Biochem. J* 402, 17-23.
- 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.
- Touzani,O., Roussel,S., and MacKenzie,E.T. (2001). The ischaemic penumbra. *Curr. Opin. Neurol.* 14, 83-88.
- Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- 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.
- 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.
- 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.

- Vincent,B., Paitel,E., Saftig,P., Frobert,Y., Hartmann,D., De Strooper,B., Grassi,J., Lopez-Perez,E., and Checler,F. (2001). The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J Biol. Chem.* 276, 37743-37746.
- 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.
- Walmsley,A.R., Zeng,F., and Hooper,N.M. (2003). The N-terminal region of the prion protein ectodomain contains a lipid raft targeting determinant. *J Biol. Chem.* 278, 37241-37248.
- Wang,K.K., Posner,A., and Hajimohammadreza,I. (1996). Total protein extraction from cultured cells for use in electrophoresis and western blotting. *Biotechniques* 662-668.
- 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.S., and Hooper,N.M. (2005). Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 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.
- 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., Miranda,C.A., Foster,D., Zebarjadian,Y., Scott,M., Torchia,M., Yang,S.L., Serban,H., DeArmond,S.J., Ebeling,C., and . (1991). Paradoxical shortening of scrapie incubation times by expression of prion protein transgenes derived from long incubation period mice. *Neuron* 7, 59-68.
- Westaway,D. and Prusiner,S.B. (1986). Conservation of the cellular gene encoding the scrapie prion protein. *Nucleic Acids Res.* 14, 2035-2044.
- 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.

- 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.
- Yanamoto,H., Nagata,I., Niitsu,Y., Xue,J.H., Zhang,Z., and Kikuchi,H. (2003). Evaluation of MCAO stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique. *Exp. Neurol* 182, 261-274.
- Yin,S., Yu,S., Li,C., Wong,P., Chang,B., Xiao,F., Kang,S.C., Yan,H., Xiao,G., Grassi,J., Po,T., and Sy,M.S. (2006). Prion proteins with insertion mutations have altered N-terminal conformation, increased ligand-binding activity and are more susceptible to oxidative attack. *J Biol. Chem.*
- Yokoyama,T., Kimura,K.M., Ushiki,Y., Yamada,S., Morooka,A., Nakashiba,T., Sassa,T., and Itohara,S. (2001). In vivo conversion of cellular prion protein to pathogenic isoforms, as monitored by conformation-specific antibodies. *J Biol. Chem.* 276, 11265-11271.
- Yoon,S. and Seger,R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21-44.
- 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., Burlin-game,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.
- Zeng,F., Watt,N.T., Walmsley,A.R., and Hooper,N.M. (2003). Tethering the N-terminus of the prion protein compromises the cellular response to oxidative stress. *J Neurochem.* 84, 480-490.
- Zou,W.Q., Capellari,S., Parchi,P., Sy,M.S., Gambetti,P., and Chen,S.G. (2003). Identification of novel proteinase K-resistant C-terminal fragments of PrP in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Biol. Chem.* 278, 40429-40436.
- Zweckberger,K., Stoffel,M., Baethmann,A., Plesnila,N. (2003). Effects of decompression craniotomy on increase of contusion volume and functional outcome after controlled cortical impact in mice. *J Neurotrauma* 20, 1307-14

7 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Kretzschmar für die Überlassung des Themas sowie die zur Verfügung gestellten ausgezeichneten Forschungsbedingungen am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung.

Mein Dank gilt insbesondere auch den Kooperationspartnern, Herrn Prof. Dr. med. Hamann und Herrn Dr. med. Vosko (mit Arbeitsgruppe), Neurologische Klinik (LMU), sowie Herrn Prof. Dr. med. Plesnila und den Dres. med. Ardeshiri (mit Arbeitsgruppe), Institut für Chirurgische Forschung (LMU), für die erfolgreiche Zusammenarbeit und äußerst entgegenkommende Unterstützung.

Besonders danken möchte ich meinem Betreuer Dr. med. Bjarne Krebs für seine absolut vorbildliche Unterstützung in allen Belangen.

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.

Frau Gertrud Kwiatkowski, Frau Doris Schechinger und Herrn Michael Schmidt danke ich für ihre wertvolle Hilfe im Labor.

Meinen Freunden und meiner Cousine Eva Huff danke ich für ihre Motivation und Hilfe.

Ich danke meinen Eltern, die immer für mich da waren.

8 Anhang

8.1 Histologische Schnittprotokolle

Die Protokolle wurden durch die histologische Abteilung des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung erstellt. Die Maushirne wurden nach Entfernen des Bulbus olfactorius in frontaler Schnittebene von rostral nach kaudal durchgestuft. Aus jeder Schnittstufe (am rechten Tabellenrand – bei Trauma in mm, bei Ischämie in μm – angegeben) wurde die Schnittanzahl (linke Spalte) auf den Objektträger (OT) aufgezogen und durch eine OT-Nummer gekennzeichnet. Schnittdicken und verworfenes Material sind bei jeder Schnittebene aufgelistet.

Schneideprotokoll Trauma Vol / WB / RNA

Tiernummer :

Projekt: **ZNP**

Anzahl der Schnitte	Verworfen	OT-Nummer Schnitte	Verwendung	Bemerkung
	100x10ym			
1		Vol 1/1 A 1x10ym		
1		Vol 1/1 B 1x10ym		
	48x10ym			
1		Vol 1/2 A 1x10ym		
1		Vol 1/2 B 1x10ym		
	48x10ym			
1		Vol 1/3 A 1x10ym		
1		Vol 1/3 B 1x10ym		
1		E 1/3 A 1x10ym		
1		E 1/3 B 1x10ym		
	46x10ym			
1		Vol 1/4 A 1x10ym		
1		Vol 1/4 B 1x10ym		
1		E 1/4 A 1x10ym		
1		E 1/4 B 1x10ym		
	46x10ym			
1		Vol 2/5 A 1x10ym		
1		Vol 2/5 B 1x10ym		
1		E 1/5 A 1x10ym		
1		E 1/5 B 1x10ym		
4		WB 5/1 4x20ym		
4		WB 5/2 4x20ym		
	30x10ym			
1		Vol 2/6 A 1x10ym		
1		Vol 2/6 B 1x10ym		
1		E 1/6 A 1x10ym		
1		E 1/6 B 1x10ym		
4		WB 6/1 4x20ym		
4		WB 6/2 4x20ym		
	30x10ym			
1		Vol 2/7 A 1x10ym		
1		Vol 2/7 B 1x10ym		
1		E 2/7 A 1x10ym		
1		E 2/7 B 1x10ym		
	3x10ym			

Schneideprotokoll Trauma Vol / WB / RNA

Seite 2

Anzahl der Schnitte	Verworfen	OT-Nummer Schnitte	Verwendung	Bemerkung
1		RNA 1 1x20ym		
1		RNA 2 1x20ym		
1		RNA 3 1x20ym		
1		RNA 4 1x20ym		
1		RNA 5 1x20ym		
1		RNA 6 1x20ym		
1		RNA 7 1x20ym		
1		RNA 8 1x20ym		
1		RNA 9 1x20ym		
1		RNA 10 1x20ym		
1		RNA 11 1x20ym		
1		RNA 12 1x20ym		
1		RNA 13 1x20ym		
1		RNA 14 1x20ym		
1		RNA 15 1x20ym		
1		RNA 16 1x20ym		
1		RNA 17 1x20ym		
1		RNA 18 1x20ym		
1		RNA 19 1x20ym		
1		RNA 20 1x20ym		
	3x10ym			4,5
1		Vol 2/8 A 1x10ym		
1		Vol 2/8 B 1x10ym		
1		E 2/8 A 1x10ym		
1		E 2/8 B 1x10ym		
4		WB 8/1 4x20ym		
4		WB 8/2 4x20ym		
	30x10ym			5
1		Vol 3/9 A 1x10ym		
1		Vol 3/9 B 1x10ym		
1		E 2/9 A 1x10ym		
1		E 2/9 B 1x10ym		
4		WB 9/1 4x20ym		
4		WB 9/2 4x20ym		
	30x10ym			5,5
1		Vol 3/10 A 1x10ym		
1		Vol 3/10 B 1x10ym		
1		E 2/10 A 1x10ym		
1		E 2/10 B 1x10ym		
	46x10ym			6
1		Vol 3/11 A 1x10ym		
1		Vol 3/11 B 1x10ym		
1		E 3/11 A 1x10ym		
1		E 3/11 B 1x10ym		
	46x10ym			6,5
1		Vol 3/12 A 1x10ym		
1		Vol 3/12 B 1x10ym		
1		E 3/12 A 1x10ym		
1		E 3/12 B 1x10ym		
	46x10ym			7
1		Vol 4/13 A 1x10ym		
1		Vol 4/13 B 1x10ym		
	48x10ym			7,5
1		Vol 4/14 A 1x10ym		
1		Vol 4/14 B 1x10ym		
				8

Schneideprotokoll Ischämie

Tiernummer : _____

Seite 1

Anzahl der Schnitte	Verworfen	OT-Nummer Schnitte	Verwendung	Bemerkung
	50x10µm			
1		Vol 1/1 A 1x10µm		
1		Vol 1/1 B 1x10µm		
	480µm			
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			
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			
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			
1		Vol 2/5 A 1x10µm		
1		Vol 2/5 B 1x10µm		
1		E 1/5 A 1x10µm		
1		E 1/5 B 1x10µm		
1		E 1/5 C 1x10µm		
1		E 1/5 D 1x10µm		
4		N 2/5 A 4x10µm		
4		N 2/5 B 4x10µm		
4		WB 1/5 4x20µm		
4		WB 2/5 4x20µm		
	200µm			

Schneideprotokoll Ischämie

Tiernummer : _____

Seite 2

Anzahl der Schnitte	Verworfen	OT-Nummer Schnitte	Verwendung	Bemerkung
1		Vol 2/6 A 1x10µm		
1		Vol 2/6 B 1x10µm		
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			
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			
				3500
1		Vol 2/7 A 1x10µm		
1		Vol 2/7 B 1x10µm		
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			
				4000
1		Vol 2/8 A 1x10µm		
1		Vol 2/8 B 1x10µm		
1		E 2/8 A 1x10µm		
1		E 2/8 B 1x10µm		
1		E 2/8 C 1x10µm		
1		E 2/8 D 1x10µm		

Schneideprotokoll Ischämie

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			4500
1		Vol 3/9 A 1x10µm		
1		Vol 3/9 B 1x10µm		
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			5000
1		Vol 3/10 A 1x10µm		
1		Vol 3/10 B 1x10µm		
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			5500
1		Vol 3/11 A 1x10µm		
1		Vol 3/11 B 1x10µm		
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			6000
1		Vol 3/12 A 1x10µm		
1		Vol 3/12 B 1x10µm		
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			6500
1		Vol 4/13 A 1x10µm		
1		Vol 4/13 B 1x10µm		
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			7000
1		Vol 4/14 A 1x10µm		
1		Vol 4/14 B 1x10µm		

8.2 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxosulfat
AS	Aminosäure
BCIP	Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
C	Kontralaterale Hemisphäre
C1	PrPC-Spaltprodukt („ α -Cleavage)
C2	PrPC-Spaltprodukt („ β -Cleavage)
C4	vergleiche PrP Δ 32-93
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCI	Controlled Cortical Impact
CJD	Creutzfeldt Jakob Disease
DDT	Dithiothreitol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Doppel	Downstream Prion Protein Like Element
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom
I	Ipsilaterale Hemisphäre
MCAO	Middle Cerebral Artery Occlusion
MOPS	3-(N-Morpholino)-propanesulfonicacid
m-RNA	messenger Ribonukleinsäure
N	Nekrose
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
nvCJD	Neue Variante der Creutzfeldt Jakob Disease
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamide Gel Elektrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCBP	Cellular Prion Protein Bindungspartner
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
PNGase	Peptid-N4-(N-acetyl- β -D-glucosaminyl)-Asparagin-Amidase
Prion	Proteinaceous infectious agent

Prnp	Gen des Prion-Proteins
Prnp+/+	Prion-Protein Wildtyp
Prnp0/0	Prion-Protein knock-out
PrPC	Cellular Prion-Protein
PrPres	Proteinase K resistent
PrPSc	Scrapie causing Prion-Protein
PrP Δ 32-93	PrPC mit N-terminaler Deletion (AS 32 bis 93), synonym „C4“
PVDF	Polyvinyl-Difluorid
rCBF	Regionaler cerebraler Blutfluss
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecylsulfate
SOD	Superoxiddismutase
STI	Stress Inducible Protein
TEMED	Tetramethylethylendiamid
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien
ZNS	Zentrales Nervensystem
Δ PrP	Prion Protein mit Deletion