

Aus der Abteilung Neurologie  
(Prof. Dr. med. M. Bähr)  
im Zentrum Neurologische Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

Einfluss der Überexpression des zellulären Prionproteins  
auf ischämisch induzierte neuronale Schädigung  
in vivo

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Tilo Müller

aus

Berlin

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. I. Zerr

II. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. med. Schulz-Schaeffer

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2010

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Einführung in Problemlage und Aufgabenstellung	5
1.2	Zerebrale Ischämie	
1.2.1	Einführung in die Pathophysiologie des Schlaganfalls	7
1.2.2	Experimentelle Modelle der zerebralen Ischämie	7
1.2.3	Molekulare Grundlagen der zerebralen Ischämie	8
1.3	Prion Protein	
1.3.1	Rolle des Prion Proteins bei spongiformen Enzephalopathien	13
1.3.2	Physiologische Funktionen des zellulären Prion Protein (PrP <sup>c</sup> )	
1.3.2.1	Expression im zentralen und peripheren Nervensystem	14
1.3.2.2	Expression nach zerebraler Ischämie	15
1.3.2.3	Neuroprotektive Effekte in in-vitro-Studien	16
1.3.2.4	Neuroprotektive Effekte in in-vivo-Studien	19
1.3.2.5	Molekulare Mechanismen PrP <sup>c</sup> -vermittelter Neuroprotektion	21
2	Ziel der Arbeit	26
3	Material und Methodik	
3.1	Versuchstiere	26
3.2	Induktion der fokalen zerebralen Ischämie	27
3.3	Messung des zerebralen Blutflusses (CBF)	29
3.4	Bestimmung der Infarkt volumina	29
3.5	Western-Blot-Analysen	30
3.6	Statistische Auswertungen	30
4	Ergebnisse	
4.1	Infarkt volumina nach transients zerebraler Ischämie	31
4.2	CBF-Analyse nach transients zerebraler Ischämie	33
4.3	Expression von PrP <sup>c</sup> in Wild-Typ und transgenen Tieren	33
4.4	Einfluss von PrP <sup>c</sup> -Überexpression auf postischämische Erk 1/2-Phosphorylierung	34
4.5	Einfluss von PrP <sup>c</sup> -Überexpression auf postischämische Akt-Phosphorylierung	36
5	Diskussion	36
6	Zusammenfassung	38
7	Literaturverzeichnis	40

### *Glossar:*

ACC - Arteria carotis communis

ACE - Arteria carotis externa

ACI - Arteria carotis interna

ACM - Arteria cerebri media

Akt - Enzym des PI-3-Signalwegs, mit Einfluss auf Apoptose, Proliferation und Zellstoffwechsel

AMPA - neben den NMDA- und Kainat-Rezeptoren eine Untergruppe der Glutamat-Rezeptoren, Neurotransmitter-Rezeptoren im Zentralnervensystem, über die Bildung von Kationenkanälen vermitteln sie die schnelle Komponente des postsynaptischen Stroms

Apoptose - programmierter Zelltod

Bax - Kofaktor von p53 bei der Apoptose

Bcl 2 - hemmt die Apoptose

BH2 - Membrandomäne

CBF - Zerebraler Blutfluss

Caspase - cysteinyl-aspartat-spezifische Protease, Enzyme der Apoptose

Erk 1/2 - extrazellulär regulierte Kinase 1/2

Fyn- Kinase der Src-Familie, Phosphorylierung von Tyrosinrezeptoren führt zur Aktivierung von Signalkaskaden

Grb2 - Adapterprotein von Tyrosinkinase-Rezeptoren

ICB - intrazerebrale Blutung

IL-1 $\beta$  - Interleukin, Zytokin mit mitogener und differenzierender Wirkung auf Lymphozyten, Makrophagen

in vitro - im Glas, organische Prozesse außerhalb eines organischen Organismus

in vivo - im lebendigen Organismus

Kainat - siehe AMPA

MAPK - mitochondrial aktivierte Proteinkinase

NMDA - siehe AMPA

Penumbra - Periinfarktregion mit noch vitalen Stoffwechselprozessen

PI-3-Kinase - Phosphatidylinositol-3-Kinase, Signalmolekül

PKA - cAMP abhängige Proteinkinase A

PrP<sup>c</sup> - zelluläres Prionprotein

SAB - subarachnoidale Blutung

SOD - Superoxiddismutase

SOS - son of sevenless, Adapterprotein

TNF $\alpha$  - Tumornekrosefaktor, Zytokin involviert bei Wachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose

tg - transgen veränderte Tiere

tg35-Mäuse - Prnp-transgen veränderte Mäuse, mit einer 4-5 fachen PrP<sup>c</sup>-Konzentration

WT-Mäuse - Wildtyp-Prnp-Mäuse (129/sv(ev)xC57BL/6J)

# **1 Einleitung**

## **1.1 Einführung in Problemlage und Aufgabenstellung**

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen einer experimentellen Studie in der Abteilung Neurologie der Universitätsklinik Göttingen durchgeführt.

Aus verschiedenen in-vitro- und in-vivo Studien ist bekannt, dass das Prionprotein neuroprotektive Eigenschaften aufweist. Auf der anderen Seite kann eine PrP<sup>c</sup>-Überexpression zu einer Neurodegeneration führen. Die molekularen Mechanismen PrP<sup>c</sup>-vermittelter Neuroprotektion sowie der Einfluss einer PrP<sup>c</sup>-Überexpression auf die Schwere des neuronalen Schadens in vivo sind noch nicht vollständig verstanden. Anhand eines zerebralen Ischämie Modells soll der Einfluss einer PrP<sup>c</sup>-Überexpression auf die ischämisch induzierte Hirnschädigung untersucht werden. Für die erforderlichen Experimente werden Wildtyp-Mäuse und PrP<sup>c</sup> überexprimierende Mäuse (tg 35) eingesetzt.

Ein ischämischer Schlaganfall ist ein akut fokales neurologisches Defizit aufgrund einer umschriebenen Durchblutungsstörung des Gehirns. Die Durchblutungsstörung hat eine Mangelversorgung mit Sauerstoff zur Folge, welche zu einem Funktionsverlust und anschließendem Absterben von Hirngewebe führt.

Pathophysiologisch unterscheidet man ischämische Schlaganfälle von hämorrhagischen Schlaganfällen (intrazerebrale Blutungen) und Subarachnoidalblutungen. Die ischämischen Schlaganfälle machen 80 Prozent der Schlaganfälle aus, 20 Prozent sind durch intrazerebrale Blutungen und Subarachnoidalblutungen verursacht (Bogousslavsky et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wird das Ausmaß der Hirnschädigung nach Induktion einer zerebralen Ischämie in transgenen Mäusen, welche das zelluläre Prionprotein überexprimieren, untersucht und mit der Läsionsgröße einer Kontrollgruppe mit physiologischer PrP-Expression verglichen. Weiterführend werden die postischämische Aktivierung der phospho-Erk1/2-Expression und die phospho-Akt-Expression als mögliche molekulare Mechanismen einer Neuroprotektion analysiert.

### **PrP<sup>c</sup> und Funktion**

Das zelluläre Prionprotein ist ein Sialoglykoprotein mit einer hohen Konzentration im zentralen Nervensystem, im Herzen, in der Lunge und im lymphatischen System. In anderen Organsystemen findet man das Prionprotein mit einer geringeren Konzentration (Oesch et al., 1985; Kretschmar et al., 1986).

Eine Reihe von Befunden zeigt diverse physiologische Funktionen des PrP<sup>c</sup> auf. So wurde eine regulative Funktion in der präsynaptischen Kupferkonzentration und der intrazellulären Kalziumhomöostase festgestellt, sowie eine Einflussnahme auf die Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten und Astrozyten. Weitere noch nicht vollständig verstandene Prozesse werden über eine direkte und indirekte Signalvermittlung beeinflusst. Andere Befunde sprechen für eine neuroprotektive Funktion des PrP<sup>c</sup> in der zellulären Reaktion auf oxidativen Stress (Cashman et al., 1990; Forloni et al., 1994; Whatley et al., 1995; Brown et al., 1997b; Brown et al., 1999; Mouillet-Richard et al., 2000). Wichtig ist dabei eine Korrelation der Aktivität von antioxidativen Schlüsselenzymen, wie der Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD) und der Glutathionreduktase mit der PrP<sup>c</sup>-Konzentration (Brown, Besinger, 1998; Rachidi et al., 2003).

Experimente zeigen, dass das PrP<sup>c</sup> neben der Interaktion mit Proteinen in Synapsen, wie Synapsin Ib und Grb2, auch mit verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen interagiert. (Schmidt-Ulms et al., 2001; Spielhauer, Schatzl 2001). Von im Zytosol befindlichem PrP<sup>c</sup> wurde die Interaktion mit Proteinen der Bcl-2-Familie nachgewiesen (Kurschner, Morgan 1996).

PrP<sup>c</sup> kann die Aktivierung von verschiedenen Signalkaskaden, wie PKA, Fyn, PI-3-Kinase/Akt und MAPK/Erk-Kinasen beeinflussen, von denen bekannt ist, dass sie neuronales Überleben modulieren (Mouillet-Richard et al., 2000; Chiarini et al., 2002; Chen S et al., 2003; Lopes et al., 2005; Vassallo et al., 2005). Die Induktion einer zerebralen Ischämie bei PrP<sup>c</sup>-Knockout-Tieren führt zu verminderter Akt-Phosphorylierung, erhöhter Caspase-3 Aktivierung und vergrößerten Schlaganfallvolumina (Weise et al., 2006).

PrP<sup>c</sup> schützt Neurone vor Bax-vermittelter Apoptose und verringert den neuronalen Schaden nach traumatischer Hirnschädigung bei Mäusen (Bounhar et al., 2001; Hoshino et al., 2003; Kuwahara et al., 1999; Roucou et al., 2004). Die bisher gefundenen Ergebnisse hinsichtlich der physiologischen Funktionen von PrP<sup>c</sup> deuten auf eine wichtige Rolle für neuronales Überleben nach neuronaler Schädigung hin (Roucou et al., 2003).

Basierend auf diesen Vorarbeiten stellten wir die Hypothese auf, dass eine Überexpression von PrP<sup>c</sup> in transgenen (TG35) Mäusen zu einer Reduktion der Infarktolumina über eine Beeinflussung der postischämischen Aktivierung des PI-3-Kinase/Akt- oder des MAPK/Erk-Signalweges führt.

## **1.2 Zerebrale Ischämie**

### **1.2.1 Einführung in die Pathophysiologie des Schlaganfalls**

Zwei unterschiedliche Ereignisse können zu einem Schlaganfall führen. In 80 Prozent der Fälle ist der Schlaganfall die Folge eines akuten Gefäßverschlusses, hervorgerufen durch kardiale oder arterio-arterielle Embolien oder durch eine bestehende zerebrale Gefäßerkrankung. Distal des Gefäßverschlusses kommt es zu einer verminderten zerebralen Perfusion, die zu einer ischämischen Schädigung neuronaler Strukturen in dem Strömungsgebiet der verschlossenen Arterie führt. Etwa 20 Prozent der Hirninfarkte sind durch intrazerebrale Blutungen (ICB) oder Subarachnoidalblutungen (SAB) verursacht. Bei der ICB kommt es dabei zur Ruptur eines zerebralen Gefäßes, die meist Folge einer jahrelangen hypertensiven Erkrankung ist. Die Einblutung führt dabei zur Schädigung neuronaler Strukturen.

Die Störung des zerebralen Blutflusses und der daraus resultierende neuronale Zellschaden sind das Resultat komplexer molekularer Mechanismen, die teilweise zeitlich parallel ablaufen, einander bedingen oder ineinander greifen. Zu den wichtigsten Schädigungsmechanismen nach zerebraler Ischämie gehören die Exzitotoxizität, die Produktion von freien Radikalen, die Periinfarkt-Depolarisation, die Inhibierung der Proteinsynthese, Entzündungsreaktionen und der programmierte Zelltod (Apoptose), welche im Weiteren noch ausführlicher besprochen werden sollen.

Den destruktiven Prozessen stehen schützende Mechanismen gegenüber (z.B. postschämische Aktivierung protektiver Signalkaskaden), welche darauf abzielen, das Ausmaß der Schädigung zu begrenzen (Weise, Bähr 2004).

### **1.2.2 Experimentelle Modelle der zerebralen Ischämie**

Eine experimentell induzierte fokale zerebrale Ischämie ist in Tiermodellen durch Verschluss der Arteria cerebri media mittels Fadenokklusion, Koagulation, thrombembolischer Okklusion und fothrombotischen Verschluss reproduzierbar gelungen. Den verschiedenen Modellen liegen unterschiedliche Methoden zu Grunde, die bevorzugt für eine bestimmte Fragestellung ausgewählt werden können.

Die Analyse molekularer Schädigungsmechanismen nach fokaler zerebraler Ischämie erfordert ein zuverlässig reproduzierbares experimentelles Tiermodell, das die Erfassung auch geringer Abweichungen von Infarkt volumina zwischen genetisch verschiedenen Tierstämmen oder verschiedenen Behandlungsgruppen erlaubt. Das Fadenokklusionsmodell erfüllt diese Anforderungen in besonderem Maße.

Die Okklusion der Arteria cerebri media (ACM), mittels eines Fadens für die Induktion einer Ischämie, wurde zunächst für die Ischämieforschung an Ratten etabliert. Kamii et al. (1994) und Hara et al. (1996) übertrugen die Methode auf ein Modell für Mäuse.

Der große Vorteil dieses Modells, verglichen mit anderen ACM verschließenden Modellen ist, dass die Schädelkalotte während des Verfahrens nicht eröffnet werden muss. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der Reperfusion nach Induktion der Ischämie. So sind zwei experimentelle Ansätze denkbar. Zum einen die permanente Ischämie bei Belassen des Fadens in situ und zum anderen eine transiente Ischämie mit Entfernung des Fadens nach einer gewählten Ischämiezeit.

Nach adäquater Analgosedierung erfolgt nach medioventraler Halsinzision die Darstellung der Arteria carotis communis (ACC). Diese wird, wie die Arteria carotis externa, isoliert und ligiert. Ein Mikrogefäßklip verschließt temporär die Arteria carotis interna (ACI). Nach einer Arteriotomie der ACC distal der Ligation wird ein 8-0 mit Silikon beschichteter Faden in das Gefäß eingebracht und dieser etwa 9 Millimeter, von der Karotisbifurkation gemessen, über die ACI nach kranial vorgeschoben, um dort die ACM zu verschließen.

Die erfolgreiche Induktion einer Ischämie und das Ausmaß der Reperfusion nach Zurückziehen des Fadens können mit Hilfe der Registrierung eines Laser-Doppler-Flusssignals (LDF) erfasst werden (Hata et al., 1998).

### **1.2.3 Molekulare Grundlagen der zerebralen Ischämie**

In den ischämisch geschädigten Hirnarealen ist eine zentrale Infarktzone von einem umgebenden Areal, der so genannten Penumbra, abzugrenzen. Grundlegend für diese Unterscheidung sind zwei fundamental unterschiedliche Arten des neuronalen Zelltodes, Nekrose und Apoptose. Die starke Reduktion des zerebralen Blutflusses in der zentralen Infarktzone führt zur Unterbrechung metabolischer Prozesse, zellulärer Energieversorgung, gestörter Elektrolytverschiebung und zu einem Verlust der Zellintegrität. Daraus resultiert ein nekrotischer Zelltod in wenigen Minuten.

Das Infarktzentrum umgebende Gebiet ist eine Zone mit erhaltener, wenn auch verminderter Perfusion - die Penumbra. Diese verminderte Perfusion resultiert in einem gestörten Zellmetabolismus, der zu einem programmierten Zelltod (Apoptose) mit langsam wachsendem Infarktareal führt. In dieser Region spielt neben der Apoptose auch die postischämische Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle. Die Erforschung der zellulären Prozesse in der Penumbra sind Gegenstand aktueller Forschung, da sie Ansatzpunkte für eine mögliche neuroprotektive Therapie bieten (Mergenthaler et al., 2004).



## **Exzitotoxizität, toxische Zellmetabolite, Zusammenbruch des zellulären Energiestoffwechsels**

Infolge einer verminderten oder aufgehobenen zerebralen Perfusion, kommt es zu einer Minderversorgung durch Sauerstoff und Glukose. Der wichtigste Energie liefernde Prozess für Nervenzellen ist die oxidative Phosphorylierung, wohingegen die anaerobe Glykolyse einen zu vernachlässigenden Stoffwechselprozess zur Energiegewinnung für Nervenzellen darstellt.

Ist die Perfusion um 80 Prozent reduziert, resultiert eine irreversible Schädigung des zellulären Energiestoffwechsels und bereits nach vier Minuten vollständiger zerebraler Ischämie sind alle ATP-Reserven des Gehirns aufgebraucht (Krause et al., 1988).

Aus dem Energiedefizit resultiert ein Funktionsverlust der Ionenpumpen mit Abnahme intra- und extrazellulärer Ionengradienten, worauf ein Zusammenbruch des Ruhemembranpotentials folgt. Dies führt zu einer anoxischen Depolarisation von Neuronen und Gliazellen (Martin et al. 1994, Katsura et al. 1994). Diese führt wiederum zu einer Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle mit Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  nach intrazellulär und einer Freisetzung exzitatorisch wirkender Aminosäuren, wie z.B. Glutamat. Dabei wird Glutamat sowohl synaptisch als auch durch Glutamattransporter depolarisierter Astrozyten freigesetzt. (Nicholls, Attwell 1990) Die Akkumulation exzitatorischer Aminosäuren im Extrazellulärraum mündet in einer massiven Aktivierung ionotroper NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren und metabotroper Glutamatrezeptoren. Dies hat wiederum einen Kreislauf verstärkenden  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^{+}$ - Einstrom nach intrazellulär über ionotrope Glutamatrezeptoren-gesteuerte Ionenkanäle zur Folge (Park et al. 1988, Lee et al. 1999). Diese als Exzitotoxizität bezeichnete Schadenskaskade führt vor allem über die Generierung zelltoxischer Metabolite ( $\text{NO}$ , freie  $\text{O}_2$ -Radikale, Peroxynitrit) und die Zerstörung des Zytoskeletts zum Zusammenbruch des neuronalen Energiestoffwechsels mit anschließendem Verlust der Membranintegrität und folglich zum nekrotischen Zelltod. Die Relevanz der Aktivierung ionotroper Glutamatrezeptoren für den Gewebeschaden nach einer zerebralen Ischämie wurde durch Studien unterstrichen, in denen durch den Einsatz spezifischer Rezeptorantagonisten in tierexperimentellen Schlaganfallmodellen die ischämische Gewebeschädigung reduziert werden konnte (Albers et al. 1992; Nellgård, Wieloch 1992).

Darüber hinaus kommt es durch einen verstärkten Einstrom von  $\text{Na}^{+}$  und  $\text{Cl}^{-}$  über monovalente Ionenkanäle, wie beispielsweise den Kanal des AMPA-Rezeptors, zu einem Ionengradienten folgenden passiven Wassereinstrom. Daraus resultiert wiederum die Ausbildung eines Ödems, welches neben direkter Zellyse über vaskuläre Kompression vor

allein in der Randzone des ischämischen Infarktes, der sogenannten Penumbra, eine weitere Verstärkung des relativen Perfusionsdefizits bewirkt. Dies ist besonders kritisch, da in der Penumbra eine weitere Verminderung des dort auf 20-50% des Normalwertes reduzierten CBF zu einem Zusammenbruch des noch erhaltenen Energiestoffwechsels und damit zu einer weiteren Ausdehnung des letal geschädigten Infarktgebietes führen kann. Bei ausgedehnten ischämischen Infarkten führt das begleitende Hirnödem zudem zu einer deutlichen Erhöhung des intrakraniellen Druckes mit der Gefahr der Herniation lebenswichtiger infratentorieller Strukturen (Weise, Bähr 2004).

### **Periinfarkt-Depolarisation**

In dem ischämischen Kerngebiet kommt es zu einer dauerhaften Depolarisation von Neuronen. Die geschädigten Zellen sind nicht in der Lage, den Energie verbrauchenden Prozess des intra- und extrazellulären Ionengleichgewichts aufrecht zu erhalten und somit zu repolarisieren. Im Gegensatz zum Kerngebiet können die Zellen im Randgebiet des Infarktes, in dem eine Restperfusion und fundamentale zelluläre Prozesse erhalten sind, repolarisieren. Da die Repolarisation ein Energie verbrauchender Prozess ist, werden ischämisch vorgeschädigte Zellen in der Penumbra noch stärker kompromittiert und daher führen wiederholte Periinfarkt-Depolarisationen zu einer weiteren Ausdehnung des Infarktareals (Mies et al., 1993). Beim Menschen konnten Periinfarkt-Depolarisationen nach einer zerebralen Ischämie bis jetzt jedoch nicht sicher nachgewiesen werden, so dass ihre Bedeutung für die Pathophysiologie der humanen zerebralen Ischämie noch nicht beurteilt werden kann (Back et al., 2000).

### **Postischämische Entzündungsreaktion**

In den ersten Minuten und Stunden nach einer zerebralen Ischämie sind neuronale und gliale Zellschädigung und Zelltod fast ausschließlich Folge exzitotoxischer Mechanismen. Darüber hinaus kommt es infolge dieser Mechanismen zur Induktion zusätzlicher Schadenskaskaden, die im weiteren Verlauf zur Ausdehnung des infarzierten Areals beitragen (Weise, Bähr 2004). Dazu gehören auch postischämische Entzündungsreaktionen, die hauptsächlich über die von geschädigten Neuronen und Gliazellen exprimierten Mediatoren TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  vermittelt werden (Iadecola et al., 1999). Deren Expression wird wiederum durch die als Folge exzitotoxischer Zellschädigung vermehrte Freisetzung freier Sauerstoffradikale und die Ca<sup>2+</sup>-vermittelte Aktivierung intrazellulärer second-messenger-Systeme getriggert. Neutrophile Granulozyten interagieren über entsprechende Oberflächenrezeptoren mit

Zelladhäsionsmolekülen der Endothelzellen und gelangen so nach Durchtritt der Gefäßwand in das Hirngewebe. Über ähnliche Mechanismen folgen Monozyten und Makrophagen zum geschädigten Hirngewebe. Auch Mikrogliazellen sind als hirneigene Zellen an den inflammatorischen Prozessen nach einer zerebralen Ischämie beteiligt. Verschiedene Mechanismen tragen zur Verstärkung des ischämischen Gewebeschadens durch postischämische Inflammation bei. Die Expression von Cyclooxygenase 2 (COX2) durch ischämische Neurone führt über die Produktion des Superoxid-Radikals und toxischer Prostanoiden zur Verstärkung des neuronalen Zelltods (Nogawa et al., 1997). Aktivierte Mikrogliazellen exazerbieren die postischämische Gewebeschädigung durch die Expression von Neurotoxinen (z.B. NO), reaktiven Sauerstoffmetaboliten und toxischen Prostanoiden. Des Weiteren spielt neben einer Reduktion der postischämischen Mikrozirkulation durch massenhaftes Einwandern neutrophiler Granulozyten (Del Zoppo et al., 2000) auch die gesteigerte Expression toxischer Entzündungsmediatoren, wie beispielsweise der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) durch infiltrierende neutrophile Granulozyten, welche wiederum zur zellschädigenden Überproduktion von NO führt, eine für die Ausdehnung des Gewebeschadens wichtige Rolle (Forster et al., 1999). Dies wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass sowohl die pharmakologische Blockierung von iNOS als auch die Deletion des für iNOS codierenden Genes zu einer Reduktion des Ischämie-induzierten Gewebeschadens führt (Iadecola et al., 1997). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass inflammatorische Adhäsionsmoleküle nach einer zerebralen Ischämie in Patienten vermehrt exprimiert werden, dies allerdings mit einer erheblichen interindividuellen Variabilität. Daher gibt es zur Zeit noch keine sinnvolle Indikation für die Messung dieser Moleküle in der klinischen Routine (Frijns und Kapelle 2002).

### **Inhibierung der Proteinsynthese nach zerebraler Ischämie**

Die Wiedereröffnung eines verschlossenen Hirngefäßes führt zu einer Reperfusion des ischämischen Hirnparenchyms. Diese Reperfusion kann mittels verschiedener Mechanismen zur Ausweitung des ischämisch geschädigten Hirngewebes beitragen. Einen möglichen Schädigungsmechanismus stellt dabei die Inhibierung der postischämischen Proteinbiosynthese nach Reperfusion dar (White BC et al., 2000; DeGracia et al., 2002). Die für eine längere Ischämiedauer möglicherweise entscheidende Rolle der Proteinsynthesestörung für die letztendliche Infarktgröße konnte in einer Studie von Hata et al. (2000) gezeigt werden. Eine Reperfusion nach einstündiger fokaler Ischämie führt primär zu einer Inhibierung der Proteinsynthese und erst sekundär zu einer zellulären ATP-

Depletion. Darüber hinaus stimmt das Penumbraareal mit gestörter Proteinsynthese mit der Größe des letztendlichen Infarktgebietes überein.

### **Programmierter Zelltod (Apoptose)**

Der programmierte Zelltod beginnt einige Stunden nach Beginn der Ischämie und dauert für etwa 72-96 Stunden an. Während nach einem permanenten oder lang andauerndem Gefäßverschluss mit ausgeprägter Minderperfusion des betroffenen Hirngewebes überwiegend nekrotischer Zelltod zur Gewebeschädigung führt, resultiert zumindest in tierexperimentellen Schlaganfallmodellen aus milderer Noxen mit kürzeren Ischämiezeiten und guter Reperfusion, vor allem in der Penumbra, überwiegend apoptotischer Zelltod (Li et al., 1995; Endres et al., 1998; Dirnagl et al., 1999; MacManus und Buchan 2000). Die Apoptose ist über spezifische, sie von der Nekrose abgrenzende Veränderungen der Zellmorphologie definiert. Zu diesen Veränderungen gehören die Kondensation des Chromatins und des Zytosols bei intakter Zellmembran, die DNA-Fragmentierung und schließlich der Zellzerfall in charakteristische membranumschlossene Körperchen, so genannte apoptotic bodies, die einer raschen Phagozytose unterliegen (Kerr, Searle 1972).

Als Vermittler des apoptotischen Zelltods fungiert eine Gruppe von Cystein-Proteasen, die so genannten Caspasen (Thornberry, Lazebnik 1998; MacManus, Buchan 2000). Die Caspasen können intrinsisch- oder extrinsisch aktiviert werden. Bei der so genannten Rezeptor vermittelten oder extrinsischen Aktivierung führt die Bindung von Liganden (z.B. FAS-Ligand, TNF $\alpha$ ) an bestimmte membranständige Rezeptoren, wie den FAS-, TNF- oder TRAIL- (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) Rezeptor zur Aktivierung intrazellulärer, Apoptose auslösender Signalkaskaden (Nagata und Golstein 1995; Hu et al., 1999). Am Anfang der Rezeptor unabhängigen oder intrinsischen Aktivierung steht eine durch multiple Noxen (ATP-Defizienz, erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, dauerhafte Depolarisation, Azidose, Toxine) auslösbare Schädigung der inneren Mitochondrienmembran mit konsekutiv erhöhter Permeabilität (MacManus, Buchan 2000; White et al., 2000; Padosch et al., 2001).

Die Caspasen vermittelte Exekution der Apoptose kann auf verschiedenen Ebenen durch zelleigene Mechanismen moduliert und inhibiert werden. Proteine der Bcl-2-Familie können im Rahmen der intrinsischen Aktivierung hemmend oder verstärkend auf apoptotische Mechanismen einwirken. So verhindern die Proteine Bcl-2 und Bcl-xl den Austritt von Ca<sup>2+</sup> aus dem endoplasmatischen Retikulum und stabilisieren damit die Mitochondrienmembran,

was wiederum den Austritt von Cytochrom C verhindert (Lam et al., 1994; Padosch et al., 2001).

In einer Vielzahl von Studien wurde mittlerweile nachgewiesen, dass die oben beschriebenen Mechanismen des apoptotischen Zelltodes auch nach einer zerebralen Ischämie einen relevanten Schädigungsmodus darstellen (Fink et al., 1998; Fujimura et al., 1998; Blomgren 1999; Krajewski et al., 1999; Nakatsuka et al., 1999; Krupinski et al., 2000)

Entsprechend ihrer physiologischen Funktion führen Überexpression, Gendeletion oder Antagonisierung dieser Moleküle durch transgene- oder Knock-out-Mäuse, oder ein Fremdprotein exprimierender Viruspartikel zu einer Verminderung oder Verstärkung der ischämischen Gewebeschädigung.

So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Bcl-2 in transgenen Mäusen (Martinou et al., 1994) und von Bcl-2 und Bcl-xl mittels viraler Vektoren (Linnik et al., 1995; Lawrence et al., 1997; Wiessner et al., 1999) zu einer Reduktion der Infarktgröße nach fokaler zerebraler Ischämie führt. Im Gegensatz dazu resultierte aus einer Blockierung endogenen Bcl-2 durch Antisense-Oligonukleotide ein deutlich vergrößertes Infarktvolumen im Vergleich zu Kontrolltieren (Chen J et al., 2000). Darüber hinaus ließ sich auch durch pharmakologische Neutralisation von FAS-Ligand und TNF $\alpha$ , also von Liganden der für die extrinsische Caspasenaktivierung verantwortlichen „Todesrezeptoren“, eine Reduktion des Infarktareals nach fokaler zerebraler Ischämie erreichen (Villalba et al., 2001).

## **1.3 Prion Protein**

### **1.3.1 Rolle des Prion Proteins bei spongiformen Enzephalopathien**

Spongiforme Enzephalopathien des Menschen wurden in den frühen 20er Jahren des letzten Jahrhunderts als seltene neurodegenerative Krankheiten von Hans Gerhard Creutzfeld und Alfons Jakob beschrieben (Creutzfeldt 1920; Jakob 1921). Bei einem der ersten Fälle der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD), die damals noch spastische Pseudosklerose genannt wurde, handelte es sich um einen familiären Fall, bei dem später eine Mutation des Prionproteingens nachgewiesen werden konnte, die D178 N-Mutation (Jakob 1923; Kretzschmar 1995; Meggendorfer 1930). Die spongiformen Enzephalopathien des Menschen galten deshalb von Anfang an und für eine lange Zeit als rein neurodegenerative und erbliche Leiden. In den 30er Jahren konnten Cuillé und Chelle zeigen, dass Scrapie auf experimentellem Wege übertragbar ist (Cuillé, Chelle 1936). Erst in den 60er Jahren, nachdem William Hadlow Ähnlichkeiten zwischen Scrapie bei Schafen und Kuru, einer Krankheit, die durch rituellen Kannibalismus in einem Volksstamm in Neuguinea verbreitet

wurde, festgestellt hatte (Hadlow 1959), und nachdem Kuru experimentell auf Primaten übertragen worden war, gelang es Gajdusek, Gibbs und Alpers zu zeigen, dass auch die Creutzfeld-Jakob-Erkrankung (CJK), die in wesentlichen pathologischen Charakteristika der Kuru-Krankheit sehr ähnlich ist, eine experimentell übertragbare Krankheit ist (Gajdusek et al., 1966). Erbliche spongiforme Enzephalopathien (das Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom, GSS) des Menschen wurde zum ersten Mal 1981 experimentell auf Primaten übertragen (Masters et al., 1981). Die neuropathologischen Merkmale umfassen spongiforme Veränderungen, Gliose und Ablagerungen eines physiologisch vorkommenden Proteins, das bei Erkrankten durch eine veränderte Konformation und erhöhte Aggregationsneigung charakterisiert ist.

Heute ist bekannt, dass Mutationen des Prionproteingens (Prnp) erbliche Prionkrankheiten verursachen können (hereditäre Prionerkrankungen), ein Polymorphismus des Prnp ganz wesentlich den klinischen und pathologischen Phänotyp der Erkrankung definiert und sogar die Prädisposition eines Individuums für Prionkrankheiten bestimmt. Die überwiegende Anzahl der Prionerkrankungen sind in ihrer Entstehung nicht verstanden (idiopathisch), sie treten sporadisch auf. Bei einer Minderzahl von Fällen ist ein Übertragungsmodus bekannt, (so genannte erworbene Prionkrankheiten) (Kretzschmar 2002; Zerr, Poser 2002).

### **1.3.2 Physiologische Funktionen des zellulären Prion Protein (PrP<sup>c</sup>)**

#### **1.3.2.1 Expression im zentralen und peripheren Nervensystem**

Das zelluläre PrP ist ein ubiquitär vorkommendes Protein mit einer hohen Expression im ZNS. Das vollständig synthetisierte PrP besteht aus 207 Aminosäuren und ist zum größten Teil auf der Außenseite der Zellmembran über einen Glykosylphosphatidylinositol- (GPI)-Anker befestigt (Caughey et al., 1988).

Wie andere Plasmamembranproteine wird auch PrP, nach Transkription und Translation, am rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und nach Modifikationen im Golgiapparat über Vesikel an die Zelloberfläche geschleust (Harris 1999).

Überraschenderweise ist PrP, wie auch andere GPI-verankerte Proteine, in einem speziellen Sphingolipid-Cholesterolkompartiment, in so genannten „Rafts“ organisiert. In „Raftdomänen“ angeordnete Proteine gehören im Allgemeinen zu den Signalproteinen in einer Zelle (Gorodonsky, Harris 1995; Naslavsky et al., 1997).

Mit entsprechenden in situ Hybridisierungen konnte gezeigt werden, dass nahezu alle neuronalen Zellen und Gliazellen PrP<sup>c</sup> messenger-RNA (mRNA) enthalten, wobei Neurone eine deutlich höhere Expression als Gliazellen aufweisen (Caughey et al., 1989; Moser et al.,

1995). GABA-Neurone exprimieren die höchsten PrP<sup>c</sup>-Konzentrationen im ZNS, sie könnten eine supportive Aufgabe im Zusammenhang mit der PrP<sup>c</sup>-Funktion haben (Collinge et al., 1994). Dopaminerge Neurone mit nicht nachweisbaren PrP<sup>c</sup>-Konzentrationen sind bei oxidativem Stress stark vulnerabel, wohingegen GABA-Neurone eine Resistenz gegenüber oxidativem Stress zeigen (Hirsch 1999; Zeevalk et al., 1998).

In jedem Abschnitt der neuronalen Achse, von zervikal bis lumbal weisen mehr als 98 Prozent der neuronalen Zellkörper eine PrP<sup>c</sup>-Expression auf (Ford et al., 2002).

### **1.3.2.2 Expression nach zerebraler Ischämie**

Um festzustellen, ob PrP<sup>c</sup> einen Teil der zellulären Antwort bei neuronaler Schädigung durch hypoxischen Stress *in vivo* bilden, haben Weise et al. (2004) die PrP<sup>c</sup> Regulation nach fokaler zerebraler Ischämie mittels Fadenokklusionsmodell bei der Maus untersucht. Westernblot und ELISA Analysen zeigten signifikant erhöhte Konzentrationen von PrP<sup>c</sup> in der ischämischen Hemisphäre vier und acht Stunden nach Induktion einer permanenten fokalen Ischämie. Dahingegen war keine erhöhte Konzentration an PrP<sup>c</sup> 24 Stunden nach Induktion der Ischämie im Vergleich zu den Kontrolltieren feststellbar. Die erhöhten PrP<sup>c</sup>-Konzentrationen sind als eine direkte Reaktion auf die induzierte Ischämie zu werten. Das Ausmaß der Konzentrationserhöhung scheint von der Schwere der ischämischen Noxe abhängig zu sein. Hinsichtlich der bekannten neuroprotektiven Eigenschaften aus *in-vitro* Studien, ist die gezeigte Konzentrationserhöhung des PrP<sup>c</sup> in der frühen Phase nach Induktion einer Ischämie, als aktiver Teil der adaptiven und regulativen Prozesse nach hypoxischer Noxe, auch *in-vivo*, zu werten (Weise et al., 2004).

Auch McLennan et al. (2004) untersuchten die Konzentration der PrP<sup>c</sup> Expression nach hypoxischer Schädigung. Adultes und perinatal ischämisch geschädigtes menschliches neuronales Gewebe wurden mit Kontrollgewebe verglichen. Es konnte immunologisch eine Akkumulation von PrP<sup>c</sup> in der Penumbra von adultem hypoxischen Gewebe und eine Akkumulation in neuronalen Zellkörpern von perinatalem hypoxischen Gewebe festgestellt werden. Weiterhin durchgeführte *in-situ*-Hybridisierung konnte eine erhöhte PrP-mRNA Konzentration in den hypoxischen Gewebeanteilen feststellen. Auch in Tierexperimenten mit Mäusen war eine Akkumulation von PrP<sup>c</sup> in der Penumbra der ischämischen Läsion festzustellen. McLennan et al. (2004) diskutieren eine mögliche Akkumulation von PrP<sup>c</sup> als passives Resultat einer hypoxischen Schädigung bei gestörtem axonalem Proteintransport. Dahingegen konnte aber auch eine erhöhte Konzentration von PrP<sup>c</sup> in den neuronalen Zellkörpern festgestellt werden, was Ausdruck einer Synthesesteigerung nach hypoxischer Noxe ist. McLennan et al. (2004) gehen daher von einer gezielten Steigerung der

Transkription, resultierend in einer erhöhten PrP<sup>c</sup>-Expression, aus. Ein spezifischer Stimulus für die Steigerung der Transkription ist noch nicht bekannt. Es konnte jedoch in in-vitro Studien eine erhöhte PrP<sup>c</sup>-Expression durch inflammatorische Cytokine und Sauerstoffradikale, welche auch in der Penumbra des Infarktgeschehens zu finden sind, festgestellt werden (McLennan et al., 2004).

In einer weiteren Analyse der PrP<sup>c</sup>-Expression nach zerebraler Ischämie im Tierexperiment durch Shyu et al. (2005) konnte immunologisch eine signifikante PrP<sup>c</sup>-Konzentrationssteigerung in der Penumbra festgestellt werden. Westernblot-Analysen zeigten eine von der Zeitdauer der Ischämie abhängige Konzentrationssteigerung von PrP<sup>c</sup>. Eine herbeigeführte Überexpression von PrP<sup>c</sup> durch Injektion von rAd-PGK-PrP<sup>c</sup>-Flag in die ischämische Region führte zu gesteigerten adaptiven Prozessen, welche in einer Verkleinerung des Infarktvolumens resultierten. Shyu et al. (2005) gehen von einer gesteigerten PrP<sup>c</sup>-Expression nach zerebraler Ischämie und Hypoxie aus, welche neuroprotektive Effekte zur Folge hat.

Auch in den neuesten Untersuchungen zur Expression von PrP<sup>c</sup> in ischämischem neuronalem Gewebe, durchgeführt von Mitsios et al. (2007), konnte eine erhöhte Expression von PrP<sup>c</sup> bestätigt werden. Bei den Untersuchungen wurde eine erhöhte Plasmakonzentration von PrP<sup>c</sup> bei Patienten nach akutem Schlaganfall festgestellt. Die Immunhistochemie zeigte eine erhöhte Expression von PrP<sup>c</sup> in den Zellkörpern von Neuronen im Periinfarktgebiet und in Endothelzellen von kleinsten Gefäßen sowie in inflammatorischen Zellen im Periinfarktgebiet von Patienten, die einen akuten Schlaganfall im Zeitraum von 2-34 Tagen überlebten. In-vitro-Studien an menschlichen foetalen neuronalen Zellen zeigten in der PCR (polymerase chain reaction) und im Westernblot, nach 12 Stunden Serum und Sauerstoffentzug, erhöhte Konzentrationen von PrP<sup>c</sup>. Fluoreszierende PrP<sup>c</sup>-Markierungen zeigten eine deutlich erhöhte Intensität in einem Bereich um den Zellkern und im Bereich der Axone. Mitsios et al. (2007) interpretierten die erhöhte Plasmakonzentration an PrP<sup>c</sup> als Ausdruck endogener Expressionssteigerung im akuten Infarktgeschehen. Die erhöhte Expression von PrP<sup>c</sup> im Periinfarktgebiet könnte den hypoxischen Zellschaden beeinflussen (Mitsios et al., 2007).

### **1.3.2.3 Neuroprotektive Effekte in in-vitro-Studien**

Den ersten Hinweis auf eine neuroprotektive Funktion des PrP<sup>c</sup> erbrachten Kuwahara et al. (1999). In Zellkulturen aus Hippokampus-Neuronen von Prnp-Null Mäusen, in denen PrP<sup>c</sup> nicht synthetisiert wird, führte ein Serumentzug zur Apoptose. Dagegen erfolgte nach dem Serumentzug bei Prnp-Wildtypen mit normaler PrP<sup>c</sup>-Konzentration keine Apoptose. Nach Übertragung von PrP<sup>c</sup> oder Bcl-2 in Prnp-Null Mäuse, konnte ebenfalls eine Apoptose nach



Serumentzug unterdrückt werden. Chen S et al. (2003) zeigten zum ersten Mal in primären neuronalen Zellkulturen, dass unterschiedliche Signalwege an PrP<sup>c</sup> vermittelten Funktionen, wie neuronales Wachstum und Neuroprotektion, beteiligt sind. Die hier involvierten Signalwege beinhalten p59-Fyn, PI3-Kinase/Akt, cAMP-abhängige Proteinkinase A und MAP-Kinase.

Bei den von Vassallo et al. (2005) präsentierten Daten wird ein starker funktioneller Zusammenhang zwischen der PrP<sup>c</sup>-Expression und der Aktivierung der PI3-Kinase, einer Proteinkinase, die eine entscheidende Rolle in zellulärem Überleben spielt, gezeigt. Um herauszufinden, ob PrP<sup>c</sup> eine Rolle bei neuronalem Zelltod spielt, nutzten Chiarini et al. (2002) ein PrP<sup>c</sup>-bindendes Peptid. In einem in-vitro-Versuch wurde zur Induktion einer Apoptose von Retinaneuronen aus neonatalen Ratten, Anisomycin zur Zellkultur hinzugesetzt. Es konnte festgestellt werden, dass das PrP<sup>c</sup>-bindende Peptid verschiedene Signalwege wie die cAMP/Proteinkinase-A und Erk-Signalwege aktivierte und partiell den induzierten Zelltod durch Anisomycin bei Neuronen von Prnp-Wildtyp Mäusen, nicht aber bei Prnp-Null Mäusen, abwenden konnte. Folglich ist PrP<sup>c</sup> über eine Aktivierung des cAMP/PKA-Signalweg an der Neuroprotektion beteiligt.

Martins et al. (2002) berichten von verschiedenen Aspekten der PrP<sup>c</sup> Genexpression, seiner Regulierung und Interaktion mit zellulären Signalwegen. Die Interaktion von PrP<sup>c</sup> und Laminin spielt eine wichtige Rolle bei neuronaler Differenzierung und Neuroprotektion. Graner et al. (2000) demonstrierten, dass PrP<sup>c</sup> ein hochspezifischer Rezeptor für Laminin ist. Die PrP<sup>c</sup>-Laminin Interaktion ist Bestandteil der Neuritogenese, induziert durch neuronale Wachstumsfaktoren (NGF). Diese durch Laminin oder der Gamma-1 Laminindomäne induzierte Neuritogenese in primären neuronalen Zellkulturen von Ratten und auch in Prnp-Wildtyp und Prnp-Null Mäusen weisen auf eine Funktion des PrP<sup>c</sup> als Hauptrezeptor der spezifischen Laminindomäne hin. Diese Resultate implizieren die Wichtigkeit der PrP<sup>c</sup>-Laminin Interaktion für die neuronale Plastizität.

Eine Expression von PrP<sup>c</sup> auf der äußeren Zellmembran schützt Neurone vor Bax vermitteltem Zelltod (Bounhar et al., 2001; Roucou et al., 2003). Wegen der Ähnlichkeit der Bcl-2 homologen Domäne (BH2) der Bcl-2 Proteinfamilie mit der N-terminalen Oktarepeatregion des PrP<sup>c</sup>, wird angenommen, dass PrP<sup>c</sup> eine Rolle bei zellulärem Überleben oder Zelltod spielt. Die BH2-Domäne vermittelt die Interaktion von Bcl-2 mit Bax und ist für die Neuroprotektion vor Bax induziertem Zelltod verantwortlich. Weiterhin interagiert das C-terminale Ende von Bcl-2 Proteinen mit PrP<sup>c</sup> (Kurschner, Morgan 1995). Bei einer Überexpression von PrP<sup>c</sup> und Bax in humanen Neuronen konnte eine Neurotoxizität durch

Bax festgestellt werden, nicht jedoch durch PrP<sup>c</sup>. Wurden PrP<sup>c</sup> und Bax simultan überexprimiert, verschwand die Neurotoxizität, vermittelt durch Bax (Bounhar et al., 2001). Für die neuroprotektive Funktion vor Bax induziertem Zelltod ist die N-terminale Oktarepeatregion des PrP<sup>c</sup> verantwortlich. Bei den PrP<sup>c</sup>-Mutationen D178N und T183A, welche mit Prionerkrankungen einhergehen, konnte die schützende Funktion von PrP<sup>c</sup> gegenüber Bax nicht aufrecht erhalten werden, daraus folgt, dass die physiologische Struktur der PrP<sup>c</sup>-Proteins für die schützende Funktion notwendig ist (Bounhar et al., 2001).

Mouillet-Richard et al. (2000) diskutieren eine PrP vermittelte Stimulation der Caveolin-1 abhängigen Fyn-Tyrosinkinase in 1C11-Neuronen. Von der Fyn-Tyrosinkinase ist bekannt, dass eine Assoziation mit zellulärer Proliferation und zellulärem Überleben existiert. Durch diesen Mechanismus könnte demzufolge das Zelloberflächen-PrP<sup>c</sup> neuronales Überleben initiieren.

Brown et al. (1997b) haben gezeigt, dass Prnp-Null Mäuse eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress, als Resultat einer verminderten Superoxiddismutase (SOD)-Aktivität, aufweisen. In der Prnp-Null Zellkultur hat die verminderte SOD-1 Aktivität bei erhöhtem oxidativen Stress fatale Folgen für das Überleben der Zellen (Brown et al., 1997a, 1999, 2001).

Brown et al. (2002) fanden eine erhöhte Sensitivität von Prnp-Null Zellkulturen aus der Körnerzellschicht der Großhirn- und Kleinhirnrinde gegenüber oxidativem Stress im Vergleich zu Neuronen von Prnp-Wildtyp Mäusen. Es war eine erhöhte Oxidation von Lipiden und Proteinen bei den Prnp-Null Zellkulturen im Vergleich zu den Wildtypzellen festzustellen, wobei dem Prion Protein eine beeinflussende Funktion in der Neuroprotektion von oxidativem Stress zugeschrieben werden kann.

Diverse Studien unterstreichen die neuroprotektive Funktion des PrP<sup>c</sup> gegen pro-apoptische Faktoren wie Bax. Zhang et al. (2006) untersuchten die neuroprotektive Funktion von PrP<sup>c</sup> bei Staurosporin-vermittelter Apoptose. Staurosporin (STS) induziert einen Zellzyklusstillstand durch Überführung in die G2-Phase, Zytotoxizität und DNA-Fragmentation. Wie aus den Studien hervorgeht, führt eine verminderte Konzentration von PrP<sup>c</sup> in N2a-Zellen zu erhöhter Sensitivität gegenüber STS-induzierter Apoptose. STS induziert DNA-Fragmentation, Immunreaktivität von Bax und Caspase-3, welche in einer Apoptose der Zellen resultieren. Eine erhöhte PrP<sup>c</sup>-Konzentration hat nahezu keinen Effekt auf die induzierte DNA-Fragmentation in N2a-Zellen, verhindert aber die Apoptose in HEK293-Zellen, welches wiederum einen zelllinienspezifischen Effekt vermuten lässt. Eine physiologische

Konzentration von PrP<sup>c</sup> hat protektives Potential gegenüber zellulärer Schädigung durch STS und inhibiert die STS-vermittelte Apoptose.

#### **1.3.2.4 Neuroprotektive Effekte in-in-vivo Studien**

Aus in-vitro-Versuchen gewonnene Erkenntnisse über die neuroprotektiven Eigenschaften von PrP<sup>c</sup> veranlassten diverse Arbeitsgruppen zu weitergehenden Experimenten, in denen die schützende Eigenschaft des PrP bei oxidativem Stress genauer untersucht werden sollte.

Um herauszufinden, ob PrP<sup>c</sup> Bestandteil der neuronalen Antwort gegen oxidativen Stress ist, untersuchten Weise et al. (2004) die PrP<sup>c</sup> Regulation nach transienter und permanenter fokaler Ischämie anhand des Fadenokklusionsmodells bei Mäusen. Dabei konnte in Westernblot und ELISA Analysen eine signifikant erhöhte Expression von PrP<sup>c</sup> in der ischämischen Hemisphäre, vier und acht Stunden nach Induktion der fokalen Ischämie, festgestellt werden. Dahingegen war 24 Stunden nach Ischämieinduktion keine signifikante Erhöhung der PrP<sup>c</sup>-Expression nachweisbar.

Um die Eigenschaften des PrP<sup>c</sup> in vivo zu verifizieren, wählten McLennan et al. (2004) Mäuse, in denen durch genetische Veränderungen zum einen PrP<sup>c</sup> überexprimiert wurde, so genannte PrP<sup>c</sup> +/+ -Mäuse, zum anderen Stämme, bei denen das PrP<sup>c</sup> inaktiviert wurde und die als PrP<sup>c</sup> -Null Mäuse oder auch als PrP<sup>c</sup> 0/0 bezeichnet werden. Als Kontrollgruppe wurde ein Mausstamm mit einer heterozygoten Ausprägung des PrP<sup>c</sup> gewählt (PrP<sup>c</sup> +/-). In diesem Tiermodell wurde durch Elektrokoagulation der Arteria cerebri media eine fokale zerebrale Ischämie induziert.

Die Resultate der durchgeführten Experimente zeigen in der Immunhistochemie eine erhöhte Konzentration von PrP, die sich besonders in den Infarkt angrenzenden Arealen und in der restlichen, dem Infarkt zugehörigen Hemisphäre nachweisen lässt, nicht jedoch in der unmittelbaren Infarktzone. Weiterhin fallen geringere Infarktvolumina bei PrP<sup>c</sup> +/- Mäusen und in aufsteigender Reihenfolge zunehmende Infarktvolumina bei PrP<sup>c</sup> +/- und PrP<sup>c</sup> 0/0-Mäusen auf.

Auch Weise et al. (2006) fanden signifikant erhöhte Infarktvolumina nach Induktion einer transienten- oder permanenten Ischämie bei Prnp<sup>0/0</sup>-Mäusen im Vergleich zu Prnp WT-Mäusen. In den durchgeführten Untersuchungen konnte eine signifikant reduzierte Expression von phospho-Akt bei Prnp<sup>0/0</sup>-Mäusen sowie eine erhöhte postischämisch erhöhte Caspase-3 Aktivierung in den Basalganglien und dem parietalen Kortex von Prnp<sup>0/0</sup>-Mäusen festgestellt werden (Weise et al., 2006). Im Gegensatz zu Resultaten einer anderen Gruppe (Brown et al.,

1997a), war keine erhöhte Expression von Bax und Bcl-2, nach Induktion einer transienten oder permanenten Ischämie, in den verschiedenen Gruppen festzustellen (Weise et al., 2006). Die Experimente zeigten allerdings bei PrP<sup>+/+</sup>- Mäusen geringere Infarktgrößen als bei PrP<sup>+/-</sup>- und PrP<sup>0/0</sup>- Mäusen, was wiederum für eine Einflussnahme durch PrP spricht und dem Prionprotein einen zentralen neuroprotektiven Mechanismus bei hypoxisch bedingter neuronaler Schädigung zuzuschreiben ist (McLennan et al., 2004; Weise et al., 2006).

In einem Tiermodell von Shyu et al. (2005) konnte durch PrP<sup>c</sup>-Überexpression eine Reduktion der Infarktgröße bei Ratten erzielt werden. Die Überexpression von PrP<sup>c</sup> erfolgte durch Einschleusung eines modifizierten Adenovirus (rAd) (replication-defective recombinant adenoviral) im Sinne eines Vektors. Zur Identifikation des PrP<sup>c</sup> wurden PrP<sup>c</sup>-spezifische Antikörper verwendet. Als Vergleich der PrP<sup>c</sup>-Konzentrationen wurden Ratten von gleichem Geno- sowie Phänotyp herangezogen, wobei bei der einen Versuchsgruppe keine zerebrale Ischämie induziert wurde.

Die Auswertung der immunologischen Analysen ergab signifikant erhöhte Werte für PrP<sup>c</sup> in den ischämischen Gehirnen im Vergleich zu den Hirnen ohne zerebrale Ischämie. Dabei fiel eine besonders hohe Konzentration von PrP<sup>c</sup> in der als Penumbra bezeichneten Hirnregion von hypoxisch geschädigten Gehirnen auf.

Weiterhin konnte eine erhöhte PrP-Expression mit einer ebenso angeregten Expression von Genen und Proteinen zur Synthese von Neuronen, Gliazellen und Endothelzellen registriert werden, welche allgemein auf eine Adaptation bei zerebraler Ischämie hinweisen. Die Adenovirus vermittelte PrP<sup>c</sup>-Überexpression führte zur Reduktion der Infarktgrößen in diesem Tiermodell. Auch dieses Experiment unterstreicht den neuroprotektiven Aspekt des Prionproteins. Shyu et al. (2005) gehen von einem adaptiven zellulären Mechanismus bei zerebraler Ischämie aus. Dabei ist PrP in eine Signalkaskade involviert, die über mehrere Schritte der Aktivierung mittels Phosphorylierung eines so genannten HSTF-1 (hypoxia activated transcription factor) führt, welches wiederum mit dem HSE (heat shock element) interagiert, auf die Promotorregion des Prnp wirkt und letztendlich in einer erhöhten Genexpression von Prnp und schließlich erhöhter PrP-Konzentration resultiert.

Um den Einfluss von PrP<sup>c</sup> beim Schlaganfallgeschehen beurteilen zu können, wurden in einer weiteren Studie Prnp-Null Mäuse, Prnp-Wildtyp Mäuse und Prnp-überexpressierende (Stamm: tga20) Mäuse einer Fadenokklusion der Arteria cerebri media unterzogen (Spudich et al.; 2005). Es konnte festgestellt werden, dass ein fehlendes PrP<sup>c</sup> zu einer massiven Zunahme des Schlaganfallvolumens führt und PrP<sup>c</sup> bei den Wildtyp- und transgenen Mäusen

einen neuroprotektiven Effekt aufweist. Dabei hatte jedoch eine Überexpression von PrP<sup>c</sup> keinen weiteren protektiven Benefit im Vergleich zu Wildtypen zur Folge.

Experimente mit neuronalen Zellkulturen haben für das PrP<sup>c</sup> und besonders dessen N-terminale Oktarepeatregion, zusammen mit dem phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt Signalweg, eine fundamentale Beeinflussung in der Neuroprotektion bei oxidativem Stress impliziert. Mitteregger et al. (2007) fanden in ischämischen Arealen von Wildtyp Mäusen eine erhöhte Syntheserate des PrP<sup>c</sup> im Vergleich mit Kontrolltieren, bei denen keine zerebrale Ischämie induziert wurde. Bei Wildtyp-Mäusen, PrP-Knockout (Pnp<sup>0/0</sup>) Tieren und transgenen Mäusen, bei denen die Oktarepeatregion (C4/-) des PrP<sup>c</sup> fehlt, wurde eine transiente zerebrale Ischämie von 60 Minuten induziert. Die Infarktgröße der Prnp<sup>0/0</sup>-Mäuse zeigte ein signifikant grösseres Infarktvolumen im Vergleich zu den PrP-Wildtyp-Mäusen. Die Infarktgröße der C4/- Mäuse war identisch mit der Infarktgröße der Prnp<sup>0/0</sup>-Mäuse. Die Überexpression von PrP<sup>c</sup> in transgenen Mäusen (tga20) zeigte jedoch keine kleineren Infarktvolumina nach transienter zerebraler Ischämie im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (Mitteregger et al., 2007).

### **1.3.2.5 Molekulare Mechanismen PrP<sup>c</sup>-vermittelter Neuroprotektion**

Die neuroprotektive Funktion von PrP<sup>c</sup> lässt sich im Wesentlichen durch drei verschiedene molekulare Hauptmechanismen beschreiben. Im Einzelnen sind das die Modulation intrazellulärer Signalwege, die Interaktion mit Proteinen der Bcl-2-Familie (Bax-Inhibierung) und seine antioxidative Aktivität. Wie im Folgenden noch detailliert aufgeführt werden wird, liegen den drei verschiedenen Wegen voneinander unabhängige Mechanismen der Neuroprotektion durch PrP<sup>c</sup> zugrunde.

#### **GPI-Oberflächenverankertes PrP<sup>c</sup> vermittelt Neuroprotektion durch intrazelluläre Signalvermittlung**

Aufgrund der Lokalisation von PrP<sup>c</sup> als GPI-verankertes Oberflächenprotein wird, wie auch von anderen GPI-Oberflächenproteinen, angenommen, dass es in der zellulären Signalübermittlung involviert ist (Jacobsen, Dietrich 1999). Caveolin-1 ist ein wichtiger Interaktionspartner von PrP<sup>c</sup> in der Signalübermittlung. Mouillet-Richard et al. (2000) erforschten in einem Modell mit neuronalen 1C11-Zellen die weiteren Interaktionen von PrP<sup>c</sup> in der Signalübermittlung. Sie konnten eine Caveolin-1-abhängige Kopplung von PrP<sup>c</sup> an die Tyrosinkinase Fyn feststellen. Die Kapazität von PrP<sup>c</sup> zur Interaktion mit Caveolin-1 hängt

von den unterschiedlichen Transmittern Serotonin und Noradrenalin der 1C11-Zellen ab. Um herauszufinden, ob Caveolin-1 in der PrP<sup>c</sup>-vermittelten Fyn-Aktivierung teilnimmt, wurden Antikörper gegen Caveolin-1 bei 1C11-serotonergen Zellen und bei 1C11-noradrenergen Zellen installiert, bevor eine Verlinkung zu PrP<sup>c</sup> stattfinden konnte. Immunosequestration von Caveolin-1 in den Zellen führte zu keiner PrP<sup>c</sup>-vermittelten Aktivierung von Fyn. Daraus schließt man, dass Caveolin-1 ein wichtiger Bestandteil in der PrP<sup>c</sup> vermittelten Aktivierung von Fyn ist. Chen S et al. (2003) fanden nach einer PrP<sup>c</sup> vermittelten Aktivierung von Fyn eher einen für das neuronale Wachstum beeinflussenden Kontext, als für eine neuroprotektive Funktion.

Graner et al. (2000) demonstrierten, dass PrP<sup>c</sup> ein hochspezifischer Rezeptor für Laminin ist. Die PrP<sup>c</sup>-Laminin Interaktion ist Bestandteil der Neuritogenese, induziert durch neuronale Wachstumsfaktoren (NGF) und Laminin in PC-12 Zelllinien oder auch induziert durch Reste der C-terminalen Dekapeptidkette des Laminin. Diese durch Laminin oder der Gamma-1 Laminindomäne induzierte Neuritogenese in primären neuronalen Zellkulturen von Ratten oder von Prnp-Wildtyp und Prnp-Null Mäusen, weisen auf eine Funktion des PrP<sup>c</sup> als Hauptrezeptor der spezifischen Laminindomäne hin. Diese Resultate implizieren die Wichtigkeit der PrP<sup>c</sup>-Laminin Interaktion für die neuronale Plastizität.

Übereinstimmend mit der Funktion als Signalüberträger ist die Erkenntnis der Interaktion von PrP<sup>c</sup> mit Synapsin Ib. Synapsin Ib ist ein Protein, das in der Anordnung der Synapsen und in der Regulierung der Ausschüttung von Neurotransmittern involviert ist und neuronales Überleben unterstützt (Spielhauer, Schatzl 2001).

Weiterhin interagiert PrP<sup>c</sup> mit Grb2, einem Adaptorprotein, welches Signale an Rezeptoren für Wachstumsfaktoren übermittelt und darüber hinaus eine wichtige Stellung bei neuronalem Überleben einnimmt (Spielhauer, Schatzl 2001).

In der Annahme, dass es eine Rolle für PrP<sup>c</sup> in der Signalübermittlung gibt, besteht die Möglichkeit, dass PrP<sup>c</sup> auch eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Funktion von Synapsen spielt. Eine detailliertere Vorstellung von den molekularen Prozessen in der Neuroprotektion durch Signalübermittlung mittels PrP<sup>c</sup> demonstriert eine Arbeit an Retinaneuronen. Dabei verhindert ein PrP<sup>c</sup> bindendes Protein den initiierten Zelltod der Retinazellen durch den Transkriptionshemmer Anisomyzin (Martins et al., 1997; Chiarini et al., 2002). Das PrP<sup>c</sup> bindende Protein wurde als „Stress inducible Protein 1“ (STI-1) identifiziert. STI-1 ist sowohl im Zytoplasma als auch auf der Zelloberfläche zu finden (Zanata et al., 2002). Die Protektion erfolgt durch die cAMP-abhängige Proteinkinase-A (PKA), wobei eine Inhibition von Erk die protektive Wirkung von STI-1 verstärkt. Die PI3-Kinase ist eine multifunktionelle

Proteinkinase, welche eine zentrale Stellung im Überleben der Zelle einnimmt. Sie ist gegenüber freien Radikalen durch Superoxide und Hydrogenperoxide sensitiv. Weiterhin ist bekannt, dass sie durch Kupfer (II)-Ionen aktiviert werden kann. (Bedogni et al., 2003) Der PI3-Kinase/Akt Signalweg verhindert die Apoptose u.a. durch eine Regulation im Aktivitätsniveau von Proteinen der Bcl-2 Familie. Die PI3-Kinase Interaktion mit PrP<sup>c</sup> lässt sich auch in anderen PrP<sup>c</sup>-Signalwegen nachvollziehen. So ist z.B. Grb-2 ein bekanntes interagierendes Protein von PrP<sup>c</sup>, welches die PI3-Kinase aktiviert (Holgado-Madruga et al., 1997).

Der antiapoptotische PI3-Kinase/Akt/phospho-Akt Signalweg vermittelt neuronales Überleben nach zerebraler Ischämie. Eine Blockierung dieses Signalweges erhöht das Aktivitätsniveau von Caspase-3, welche eine zentrale Rolle bei den Apoptosevorgängen spielt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in einem frühen Stadium nach transientscher Ischämie eine Hochregulation von phospho-Akt im Kortex aber nicht im ischämischen Kerngebiet erfolgt. Diese Hochregulation von phospho-Akt ist mit einer reduzierten TUNEL-Anfärbung nach transientscher Ischämie verbunden. Weise et al. (2006) haben daher die Hypothese aufgestellt, dass die reduzierte phospho-Akt Aktivität in Prnp<sup>0/0</sup>-Mäusen, in einem frühen Stadium nach dem Schlaganfall, zu verstärkter postischämischer Apoptose und folglich zu größeren Infarkt volumina führt. Diese Hypothese wird durch die Untersuchungsergebnisse gestützt, in denen eine signifikant erhöhte Anzahl von Caspase-3 exprimierenden Neuronen in Prnp<sup>0/0</sup>- Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen gezeigt werden konnte. Eine verringerte Konzentration von PrP<sup>c</sup> führt zu erhöhten Infarkt volumina bei transientscher und permanenter Ischämie, wobei die Unterschiede der Infarktgrößen besonders deutlich bei transientscher Ischämie festzustellen waren. Dies könnte ursächlich auf die dominante Rolle der Apoptose während des Infarktgeschehens und den Einfluss des PI3-K/Akt-Signalweges auf die Apoptose nach transientscher Ischämie zurückzuführen sein (Weise et al., 2006).

Auch Fyn ist ein in Wechselwirkung mit PrP<sup>c</sup> stehendes Signalprotein. Die Aktivierung von Fyn durch PrP<sup>c</sup> hat einen hemmenden Einfluss auf die NADPH-Oxidase, wobei die Oxidase einen entscheidenden Mechanismus der ROS-Produktion in Zellen darstellt. (Schneider et al., 2003)

In-vivo-Versuche von Spudich et al. (2005) mit Prnp-Null-Mäusen zeigten bei exazerbierten Schlaganfall volumina eine erhöhte Aktivität von ERK-1/-2, STAT-1 und Caspase-3.

Schließlich ist PrP in verschiedene zelluläre Mechanismen wie Wachstum und zelluläres Überleben durch unabhängige Signalwege eingebunden. Wie dargestellt, überlappen sich die verschiedenen Signalwege beim neuronalen Wachstum und Überleben (Chen S et al., 2003).

### **Schutz vor Bax-vermitteltem Zelltod**

Aufgrund einer Strukturähnlichkeit im PrP-Molekül mit der BH2-Domäne von Bcl-2 Molekülen wurde angenommen, dass PrP mit der Bcl-2 Familie interagiert (LeBlanc 1998). Der erste Beweis einer neuroprotektiven Wirkung durch PrP<sup>c</sup> wurde von Kuwahara et al. (1999) erbracht. Sie zeigten, dass isolierte Neurone aus dem Hippocampus von PrP-Null Mäusen gegenüber einem Apoptose induzierenden Serumentzug wesentlich anfälliger waren als vergleichbare Neurone von PrP-Wildtyp-Mäusen mit normaler Expression von PrP<sup>c</sup>. Nach Übertragung von PrP<sup>c</sup> oder Bcl-2 konnten die Neurone der PrP-Null-Mäuse vor einer Apoptose bewahrt werden (Kuwahara et al., 1999). Anschließend wurde gezeigt, dass PrP<sup>c</sup> menschliche Neurone vor Bax-vermitteltem Zelltod schützt (Bounhar et al., 2001). Bax ist eines der bedeutenden proapoptotischen Proteine von Neuronen. Nach seiner Aktivierung vollzieht es eine strukturelle Änderung, Oligomerisation und Translokation in die Mitochondrien, wo es zur Freisetzung von Faktoren aus den Mitochondrien führt, die eine Apoptose der Zelle einleiten (Martinou, Green 2001). Wird Bax in menschlichen Neuronen überexprimiert, führt dies zum Zelltod, welcher durch eine gleichzeitige Expression von Bcl-2 abgewendet werden kann. Auch durch eine gleichzeitige Expression von Wildtyp-PrP kann der drohende Zelltod abgewendet werden. Die Neuroprotektion durch PrP erfordert ein vollständig modifiziertes und ausgebildetes PrP, da eine Unterbrechung im Syntheseweg und demzufolge unvollständig modifiziertem PrP, zu keiner neuroprotektiven Funktion durch PrP führt. Überraschenderweise ist der GPI-Anker des PrP's für diese neuroprotektive Funktion vor Bax-iniziiertem Zelltod nicht notwendig, daraus ist zu folgern, dass die neuroprotektive Funktion über Signalvermittlung nicht der einzige neuroprotektive Mechanismus durch PrP ist. Weiterhin verhindert PrP vollständig die Bax-induzierte Apoptose von menschlichen NT2-Neuronen und partiell von MCF7-Zellen (Roucou et al., 2004).

In Arbeiten von Kurschner und Morgan (1995, 1996) sowie auch Bounhar et al. (2001) wird die Interaktion von PrP mit Bcl-2 Proteinen dargestellt, wobei der schützende Effekt von PrP vor Bax-induzierter Apoptose durch eine direkte Interaktion von PrP und Bax erklärt wird. Allerdings ist diese Erklärung aus heutiger Sicht unwahrscheinlich, da PrP auf dem sekretorischen Weg synthetisiert wird und Bax sowie Proteine der Bcl-2 Familie für den zytosolischen Metabolismus synthetisiert werden, ist eine direkte Interaktion zwischen Bax,



Bcl-2 und PrP wegen räumlicher Trennung in verschiedenen Kompartimenten durch unterschiedlicher Proteinbiosynthesewege nicht möglich ist. Der zytosolische Zielort des PrP hängt mit der Adressierung durch hochspezifische- und selektive Signalsequenzen auf den mRNA-Molekülen zusammen. Die Signalsequenzen tragen Erkennungsstrukturen für den Ort der Proteinbiosynthese, die bei zytosolischen Proteinen an funktionellen Ribosomen und bei sekretorischen Proteinen am rER (raues Endo-plasmatisches Retikulum) stattfinden. Sie stehen somit im Zusammenhang mit dem endgültigen Bestimmungsziel eines dann fertig synthetisierten Proteins. Wie oben erwähnt, unterscheidet man Proteine, die im Zytosol der synthetisierenden Zelle für den eigenen Stoffwechsel verbleiben und andere Proteine die u.a. für die Sekretion für Lysosomen oder für die Zytoplasmamembran benötigt werden. So entstehen verschiedene Proteinbiosynthesewege und damit verbunden unterschiedliche Transportwege und getrennte Lokalisationen in verschiedenen Kompartimenten, die wiederum keine direkte Interaktion eingehen können (Roucou et al., 2004).

### **PrP schützt vor oxidativem Stress**

PrP bindet zweiwertiges Kupfer in der Oktarepeatregion des N-terminalen Abschnitts des PrP-Moleküls (Brown et al., 1997a) und reguliert die Aktivität der Kupfer ( $\text{Cu}^{2+}$ )/ Zink ( $\text{Zn}^{2+}$ ) Superoxiddismutase (SOD), welche ein Schlüsselenzym der intrazellulären antioxidativen Enzyme darstellt (Brown, Besinger 1998). Weiterhin scheinen die Konzentrationslevels von PrP mit der Glutathionreduktaseaktivität zu korrelieren (Brown, Besinger 1998; Rachidi et al., 2003). Zwei der Kupferbindungsstellen des PrP könnten dabei eine physiologische Relevanz haben. Es handelt sich dabei um molekulare Abschnitte, die vergleichbar mit Abschnitten von anderen bekannten kupferbindenden Proteinen, wie SOD und Ceruloplasmin sind (Roucou et al., 2004). Eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber erhöhten Kupferkonzentrationen weisen z.B. Spermien von PrP<sup>0/0</sup>-Mäusen im Vergleich zu Spermien von PrP exprimierenden Zellen auf (Shaked et al., 1999). So sind auch PrP<sup>0/0</sup>-Zelllinien gegenüber einer erhöhten Kupfertoxizität anfälliger (Brown et al., 1997b). Die Kupferbindungsfähigkeit ist ein wichtiger Faktor für die neuroprotektive Funktion des PrP, allerdings variieren Anzahl und Ausprägung der Bindungsstellen für Kupfer zwischen verschiedenen Spezies (van Rheede et al., 2003). Brown (2001) hielt die erhöhte Konzentration von PrP in den Synapsen und die erhöhte Bindungsaffinität zu Kupfer eher für eine schützende Funktion von PrP bei erhöhten Kupferkonzentrationen als für eine direkte Funktion von PrP in der Signalübertragung. Die erhöhte Konzentration von PrP in Synapsen und die kupferaufnehmende- und bindende Funktion könnten zu einer erhöhten Aktivität der

Cu/Zn-SOD führen und in einer gesteigerten Resistenz gegenüber oxidativem Stress resultieren. Die Rolle des PrP in den Synapsen könnte hinsichtlich der Erkenntnis, dass die ersten spongiformen Veränderungen bei Prionerkrankungen in den Synapsen zu finden sind, an Bedeutung gewinnen (Jeffrey et al., 2000). Weiterhin sind Prn<sup>P<sup>0/0</sup></sup>-Zellkulturen gegenüber oxidativem Stress anfälliger als Zellkulturen von PrP-Wildtypen (Brown et al., 1997b; White AR et al., 1999). Des Weiteren unterbindet eine Elimination der Oktarepeatregion die antioxidative Funktion durch PrP (Brown et al., 1999).

Zusammenfassend kann man folgern, dass PrP eine Rolle in der Neuroprotektion gegen oxidativen Stress, vermittelt durch die Cu/Zn-SOD und die Glutathionreduktase spielt.

## **2 Ziel der Arbeit**

Die Zielsetzung der vorliegenden Dissertation ist eine Analyse des Einflusses einer Überexpression des zellulären Prionproteins (PrP<sup>c</sup>) auf das Ausmaß der ischämischen Hirnschädigung nach fokaler zerebraler Ischämie in PrP überexprimierenden (TG 35) Mäusen. Weiterhin soll der Einfluss der PrP-Überexpression auf die postischämische Regulation der zelltodrelevanten PI3-Kinase/Akt und MAPK/Erk-Signalkaskaden untersucht werden.

## **3 Material und Methodik**

### **3.1 Versuchstiere**

Die im Folgenden dargestellten Experimente wurden nach Genehmigung und in Übereinstimmung mit bestehenden Richtlinien im Umgang mit Versuchstieren durchgeführt. Es erfolgte eine regelmäßige Kontrolle durch die Abteilung für Versuchstiere der Universitätsklinik Göttingen. (Aktenzeichen des Versuchsvorhabens: 55.03).

Für die Experimente wurden Prnp-transgen veränderte Mäuse (TG-35) und Wildtyp-Prnp Mäuse (129/sv(ev)xC57BL/6J) mit dem gleichen genetischen Hintergrund verwendet. Alle Tiere waren älter als 12 Wochen, von männlichem Geschlecht und hatten ein Gewicht zwischen 22 und 27 Gramm. Sie hatten einen freien und unbeschränkten Zugang zu Futter und Wasser.

### **TG35:**

Das Maus PrP-Gen enthält ein upstream Intron von 2kb und ein downstream Intron von 6-12kb (Westaway et al., 1994). Um eine Veränderung des genetischen Codes herbeizuführen, wurde ein PrP-Gen aufschlüsselndes Konstrukt geschaffen, dessen größeres Intron (halb-genomisches Konstrukt bzw. phgPrP) oder beide Introns (cDNA-Konstrukt bzw. pPrP-cDNA) ausgeschaltet wurden. Sie enthielten eine Sequenz der 5,5kb der 5'-Seite und eine 2kb der 3'-Seite. Diese Konstrukte, ebenso wie die Prnp-enthaltende Cosmid-DNA (cosmid cos.I/InJ4; Westaway et al., 1991), wurden in Prnp0/0- oder Prnp0/+ Mäuse durch Kerninjektion eingebracht. Die PrP-Expression im Hirn wurde durch Northernblot-Analysen kontrolliert (Fischer et al., 1996).

Bei der gezüchteten cosmid-Mauslinie (tgc35/+) sind 30 bis 40 gleiche Genkopien vorhanden. Das führt zu einer Überexprimierung von PrP<sup>c</sup> in einer vier- bis fünffachen Konzentration im Vergleich zu Wildtypen. In einigen Hirnarealen, wie dem Kleinhirn, fallen bei den transgenen Tieren die PrP-RNA-positiven Zellen wesentlich deutlicher auf als bei den Wildtypen, welches die Theorie unterstützt, dass die PrP-Expression generell bei den transgenen Tieren erhöht ist. Einige Tiere der transgenen Mauslinien tgc 35/+ und tgc 35/c35 entwickelten nach vier bis sechs Monaten Paresen der Hinterläufe. Dies könnte auf eine simultane Überexprimierung eines bisher unbekanntes Genabschnitts zurückzuführen sein, der im Cosmid lokalisiert ist.

### **3.2 Induktion der fokalen zerebralen Ischämie**

Die Laboratoriumseinrichtung für diese Versuche sieht ein inhalatives Narkosesystem sowie ein rückgekoppeltes Wärmeerhaltungssystem vor. Das Narkosesystem besteht aus einem Isofluranverdampfungssystem, welches eine individuell gesteuerte Abgabe von dem Narkotikum Isofluran erlaubt. Des Weiteren wird das Narkosesystem von einem Atemgasgemisch aus 30-prozentigem Sauerstoff und 68,5-prozentigem Stickstoffdioxid zur Analgesie gespeist.

Während der Operationszeit wurden die Versuchstiere auf dem rückgekoppelten Wärmesystem gelagert, welches erlaubt die Temperatur konstant zwischen 36,5 - und 37° Celsius zu halten. Dabei erfolgte die Rückkopplung über eine Sonde, die Rektal bei den Tieren die Körpertemperatur registrierte und dementsprechend die Wärmeabgabe der Heizplatte steuerte.

Die Induktion der transienten Ischämie erfolgte nach dem Prinzip des Fadenokklusionsmodells (Hata et al., 1998).

Dieses Modell ist ein etabliertes und valides Verfahren zur Erzeugung einer zerebralen Ischämie im Tierversuch mit Mäusen.

Nach Einleitung der inhalativen Narkose, bestehend aus einem Gasgemisch mit einprozentigem bis 1,5-prozentigem Isofluran sowie 30-prozentigem Sauerstoff und 68,5-prozentigem Stickstoff, wurden die Versuchstiere auf dem Wärmesystem gelagert und fixiert. Zur semi-quantitativen Erfassung des zerebralen Blutflusses (CBF) mittels Laser-Doppler-Messung, wurde eine flexible 0,5 Millimeter dicke, fiberoptische Sonde (Perimed, Stockholm-Schweden) mit einem speziellen Gewebekleber auf der intakten Schädelkalotte, über dem Stromgebiet der linken A. cerebri media, fixiert.

In Rückenlage wurde ventral ein medianer Hautschnitt im Halsbereich von ca. einem Zentimeter Länge angelegt. Die weitere Präparation erfolgte unter dem Mikroskop. Dabei wurde unter stumpfer Präparation sowie Schonung des umliegenden Gewebes insbesondere des Gefäß- und Nervenstranges, bestehend aus Arteria carotis communis (ACC), Vena jugularis interna und Nervus vagus, vorgegangen. Nach Abgrenzung der ACC erfolgte die Ligatur der Arterie im mittleren Abschnitt. Nach Darstellung der Bifurkation der ACC in Arteria carotis externa (ACE) und Arteria carotis interna (ACI) erfolgte die Ligatur der ACE kranial der Bifurkation. Weiterhin wurde die Darstellung der ACI im Verlauf nach kranial vorgenommen, wobei die Arteria pterygopalatina, ein Abgang der ACI, elektrisch koaguliert wurde. Am kranialen Ende der ACI, vor Eintritt der Arterie in die Schädelbasis, wurde ein temporärer Verschluss, mittels eines entfernbaren mikrovasculären Clip (Aesculap; Tuttlingen-Deutschland), der ACI durchgeführt. Distal der Ligation wurde die ACC mit einem kleinen tangentialen Schnitt eröffnet. Durch diese Öffnung wurde ein speziell angefertigter Faden eingeführt. Es handelte sich dabei um einen 14 Millimeter langen mit Silicon (Xantopren; Deuker, Kassel-Deutschland) beschichteten, monofilamentären Faden der Größe 8-0 (Ethilon, Ethicon; Norderstedt-Deutschland) mit einem Durchmesser von 180-200 Mikrometern.

Der Faden wurde nach Entfernen des Gefäßclips in der ACI, neun Millimeter nach kranial verschoben, gelangte so an den Abgang der Arteria cerebri media (ACM) und führte dort zu einem Gefäßverschluss. Nach korrekter Positionierung des Fadens kam es zum gewünschten Abfall des cerebralen Blutflusses im Mediastromgebiet. Dieser wurde durch einen Abfall im Laser-Doppler-Fluss (LDF) registriert.

Vorraussetzung für die Aufnahme der Tiere in die Versuchsreihe war ein Abfall des CBF auf  $< 30\%$  des Ausgangswertes und das Persistieren des reduzierten Blutflusses während der Ischämie, wobei die Kontrolle unter stetigem Monitoring des Blutflusses erfolgte.

Bei transienter zerebraler Ischämie wurde das distale Fadenende mit einem Gefäßklip fixiert und das Versuchstier während der 90-minütigen Ischämiezeit in flacher Narkose belassen. Dabei wurde der auf ein Drittel reduzierte zerebrale Blutfluss über dem Mediastromgebiet permanent kontrolliert.

Nach Ablauf der transienten Ischämiezeit wurde der Faden aus dem Gefäß entfernt und kranial der Inzision die ACC legiert. Nach dem Entfernen des Fadens, sollte eine Reperfusion von mindestens zwei Dritteln des Ausgangswertes in dem Mediastromgebiet erzielt werden.

Der Wundverschluss erfolgte nach schichtweiser Adaption durch Einzelknopfnähte.

Die Narkose wurde ausschleichend unter 100 Prozent Sauerstoff beendet und die Versuchstiere nach subkutaner Injektion von zwei Millilitern Sterofundin in einem 30 Grad warmen Käfig gehalten.

Unter regelmäßiger Kontrolle und Registrierung von Vitalparametern sowie wiederholter Substitution von Sterofundin überlebten die Tiere 24 Stunden nach Induktion der Ischämie.

### **3.3 Messung des zerebralen Blutflusses (CBF)**

Bestandteil des Experimentes war es, den zerebralen Blutfluss im Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media (ACM) zu reduzieren. Um die Perfusion in diesem Gebiet zu kontrollieren, verwendeten wir das Laser-Doppler-Verfahren. Dazu wird eine elastische Glasfasersonde (Perimed, Stockholm-Schweden) mit dem genannten System verbunden und diese über dem Mediastromgebiet auf der intakten Schädelkalotte permanent fixiert. Das Areal befindet sich in einem Schnittpunkt über der linken Schädelkalotte, welches sich sechs Millimeter lateral der Sutura sagittalis und zwei Millimeter posterior der Sutura coronaria befindet. So ist es möglich, den zerebralen Blutfluss während des gesamten Experimentablaufes zu registrieren.

### **3.4 Bestimmung der Infarktvolumina**

24 Stunden nach Ischämieinduktion erhielten die Versuchstiere eine inhalative Überdosis an Isofluran, welche zur Beendigung der kardio-pulmonalen Funktionen führte. Nach eingetretenem exitus letalis folgte eine Dekapitation und nach Eröffnung der Schädelkalotte die schonende Entnahme des Gehirns. Direkt im Anschluss folgte die Sektion in fünf zwei Millimeter dicke Schichten in koronarer Schnittführung in einem dafür angefertigten Schnittblock. Nach Entnahme der Hirnscheiben aus der Apparatur folgte die sofortige Inkubation in zweiprozentiger 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung (TTC). TTC wird

durch verschiedene Enzyme in vitalem Gewebe zu einem tiefen Rot reduziert und grenzt sehr präzise infarzierte gegenüber vitalen Arealen ab.

Anschließend wurden die angefärbten Hirnschichten in Formaldehyd fixiert und mit Hilfe eines Scanners digitalisiert.

Mit der Hilfe eines Image-Analyse-Programms ( NIH- Image 3.12, <http://rsb.info.nih.gov/ij> ) wurden die angefärbten Schnitte ausgewertet.

Die Infarktareale wurden bestimmt, indem das nicht infarzierte Areal der linken Hemisphäre von der gesamten rechten nicht infarzierten Hemisphäre, in allen Schnitten, subtrahiert wurde. Das Infarktvolumen wurde durch Integration der infarzierten Areale berechnet.

### **3.5 Westernblot-Analysen**

Die Gehirne der Prnp-überexpmierenden Mäuse und Prnp-Wildtyp-Mäuse wurden nach einer Überdosis an Isofluran entfernt und schockgefroren. Die linke ischämische Hemisphäre wurde mit Lysis-Puffer (50mmol/L Tris, pH 8,0, 150mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, und Proteaseinhibitoren) versetzt, anschließend homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand für das SDS-PAGE verwendet.

Für die Westernblot-Analysen wurden gleiche Mengen an Protein (40µg) in sechs Anteilen Puffer verdünnt, erhitzt und auf 10% bis 15% Polyacrylamidgele aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend auf eine Polyvinyliden-Difluoridmembran gebracht, welche in einer Blockierlösung (5% milk, 0,1% Tween 20 in TBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert wurden und mit verschiedenen Mausantikörpern (anti-PrP: 12F10, 1:1000; anti-phospho-Erk1/2: 1:250, Cell Signalling, USA; anti-β-tubulin: 1:5000, Sigma-Aldrich, Germany; anti-actin: 1:2000, Chemicon, USA) oder Kaninchen polyklonale Antikörper (anti-phospho-Akt (Ser473)/anti-Akt: 1:500/1:1000, Cell Signaling) oder polyklonale Ziegenantikörper (anti-Erk1/2: 1:500, Santa Cruz, Germany) in 5% Milch/TBST (18 Stunden, 4°C). Die Membranen wurden mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus oder Anti-Kaninchen (1:2000-2500) sekundären Antikörper (in 1% milk/TBST; Santa Cruz Biotechnology; eine Stunde bei Raumtemperatur) versehen, anschließend in luminisierende Lösung (ECL) gegeben und einem ECL-Hyperfilm (Amersham, Germany) ausgesetzt. Die Intensität der einzelnen Bänder von Erk1/2, phospho-Erk1/2, Akt und phospho-Akt wurde mittels eines Densitometer (LabImage software, Kapelan, Germany) gemessen und verglichen zu Intensitäten von korrespondierenden β-Tubulin oder Aktinbanden von Erk/β-tubulin, phospho-Erk/β-tubulin, Akt/actin, und phospho-Akt/actin.

### **3.6 Statistische Auswertungen**

Die statistische Auswertung der Infarktvolumina beider experimenteller Gruppen erfolgte durch den bilateralen „Students t-Test“ bei normal verteilten Grundgesamtheiten. Der t-Test wird zum Testen von Hypothesen über Erwartungswerte einer oder zweier Stichproben aus normal verteilten Grundgesamtheiten mit unbekannter Standardabweichung verwendet.

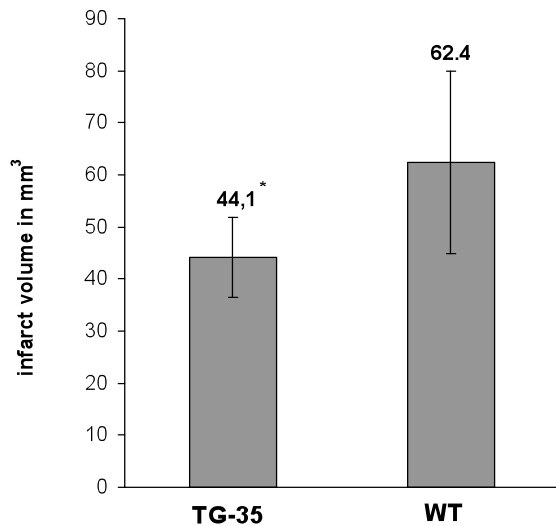
Statistische Signifikanz ist gegeben bei  $p < 0,05$ .

Die Auswertung der densitometrischen Analysen der Western-Blot Untersuchungen für phospho-Erk/Erk und phospho-Akt/Akt erfolgte durch eine univariante Varianzanalyse (ANOVA, analysis of variance), um Aufschlüsse über Gesetzmäßigkeiten der analysierten Daten zu erlangen, wobei sich die Varianz der Zielvariable durch den Einfluss einer Einflussvariable erklärt. Weiterhin wurde der Tukey-HSD-Test (ehrlich signifikante Differenz) zur Korrektur der Gesamtfehlerwerte eingesetzt.

## **4 Ergebnisse**

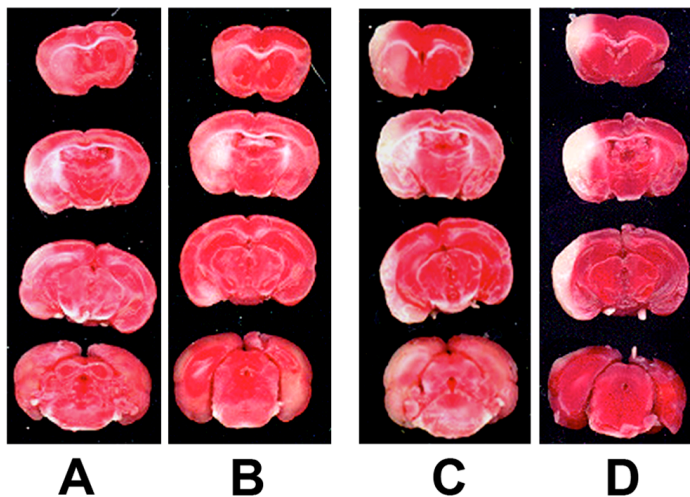
### **4.1 Infarktvolumina nach transienter zerebraler Ischämie**

In den quantitativen Analysen konnte ein signifikant kleineres Infarktvolumen bei den Prnp-überexpmierenden (TG-35) Mäusen im Vergleich zu den Prnp-WT-Mäusen festgestellt werden. Der Unterschied in den Infarktvolumina ist besonders deutlich nach 90-minütiger transienter Ischämie festzustellen, wobei das Infarktvolumen der Prnp-überexpmierenden Tiere (TG-35)  $44,1 \pm 7,7 \text{ mm}^3$  beträgt und das Infarktvolumen der Prnp-WT-Tiere (129/BL6)  $62,4 \pm 17 \text{ mm}^3$  ( $n=10$  pro Versuchsgruppe; Abb.1, S.34). Dies bedeutet eine eindeutige statistische Signifikanz ( $p= 0,023$ ) im zweizeitigen students t-Test. Die Infarktareale der transgenen-Tiere (TG-35) nach 90-minütiger transienter Ischämie waren lediglich auf einen umschriebenen Bereich lateral der Basalganglien begrenzt, wohingegen die Infarktareale der PrnP-WT-Mäuse ein deutlich größeres Areal einnahmen, welches sich in einigen Hirnschnitten von den Basalganglien bis hin zum Parietalkortex ausdehnt (Abb. 2, S.32)



### Abb.1: Infarkt volumina nach transienter zerebraler Ischämie

Graphische Darstellung der Infarkt volumina (in mm<sup>3</sup>) nach transienter zerebraler Ischämie (90 Minuten) bei transgenen Tieren (TG35) und Wildtyp-Tieren (WT). Es zeigte sich eine eindeutige statistische Signifikanz für reduzierte Infarkt volumina nach transienter Ischämie bei TG35-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (n=10 pro Versuchsgruppe).



### Abb.2: Vitalfärbung zur Darstellung ischämischer Areale

2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung zur Darstellung ischämischer Regionen (helle Areale) der linken Hemisphäre. A und C: TG35 Tiere nach transienter (90 Minuten) Ischämie. B und D: WT-Tiere nach transienter (90 Minuten) Ischämie. Es markieren sich deutlich größere Infarkt areale nach transienter Ischämie bei Wildtyp-Tieren (WT) im Vergleich zu transgenen Tieren (TG35). (n=10 pro Versuchsgruppe)



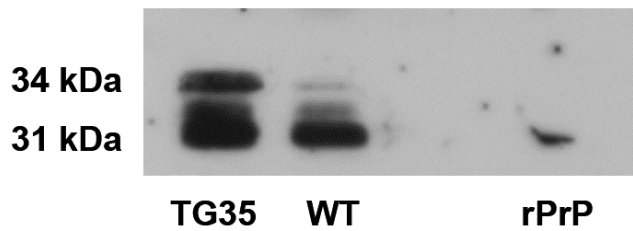
## **4.2 CBF-Analyse nach transienter zerebraler Ischämie**

Um einen reproduzierbaren Vergleich zwischen den Infarktvolumina der Prnp-überexprimierenden- und Prnp-WT-Mäuse erstellen zu können, müssen hämodynamische Unterschiede ausgeschlossen werden. Dazu wurde der Blutfluss mittels LDF permanent aufgezeichnet. Der Abfall des LDF nach Induktion der transienten Ischämie beträgt bei Prnp-+/+ Mäusen im Median 72,5% des Ausgangsblutflusses und bei Prnp-WT im Median 79% (n=10 pro Versuchsgruppe). Dabei fällt der CBF im Mittelwert auf  $21,8 \pm 6,5\%$  des initialen Blutflusses bei den TG35-Mäusen und auf  $21,6 \pm 5,4\%$  bei den WT-Mäusen und zeigt im zweiseitigen students t-Test keine Signifikanz.

Zum anderen ist die Reperfusion nach Beendigung der Ischämie registriert worden und erreicht bei den TG35-Mäusen im Median 79% des Blutflusses vor Induktion der Ischämie und einen Mittelwert von  $82,5\% \pm 11\%$ . Im Vergleich dazu beträgt bei Kontrollen (WT-Mäuse), die Reperfusion im Median 74% bei einem Mittelwert von  $72,9\% \pm 5,6\%$ . Die Unterschiede bei Abfall und Wiederanstieg des CBF zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen waren statistisch nicht signifikant. Damit ist nicht von einem relevanten Einfluss des zerebralen Blutflusses auf die unterschiedlichen Infarktgrößen in beiden Versuchsgruppen auszugehen.

## **4.3 Expression von PrP<sup>c</sup> in Wild-Typ- und transgenen Tieren**

Um eine vergleichbare Aussage über den Einfluss der unterschiedlichen Konzentrationen an PrP<sup>c</sup> bei Wildtyp- und transgenen Tieren (TG35) auf die molekularen Mechanismen und den Einfluss auf die Infarktgröße machen zu können, analysierten wir mittels Westernblot-Verfahren bei den von uns verwendeten Wildtyp- und transgenen Mäusen die Konzentration an vorliegendem PrP<sup>c</sup>. In der Abb.3 (S.34) erkennt man eine verstärkte Bande bei den transgenen Tieren bei 31 und 34 Kilodalton im Vergleich zu den Wildtyp- Tieren. Densitometrische Bestimmungen zeigten eine um das Vierfache erhöhte Konzentration an PrP<sup>c</sup> bei den transgenen Tieren. Diese Ergebnisse belegen die aus der Literatur bekannte moderate PrP- Überexpression in von uns verwendeten TG35-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren.



**Abb.3: Westernblot-Analyse zellulärer PrP Konzentration**

Westernblot-Analyse der zellulären Konzentrationen an Prionprotein bei Wildtyp und transgenen Tieren. Hier zeigte sich eine um das Vierfache höhere Konzentration an PrP<sup>c</sup> bei transgenen Tieren (TG 35) im Vergleich zu Wildtyp Tieren. rPrP (rekombinantes PrP; Positivkontrolle).

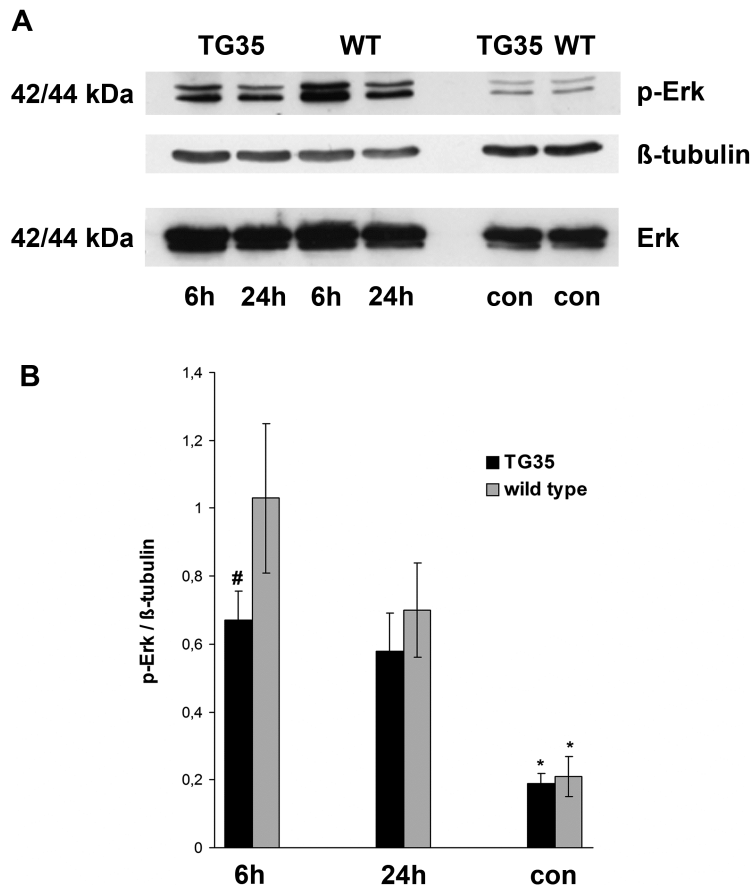
#### **4.4 Einfluss von PrP<sup>c</sup>-Überexpression auf postischämische Erk 1/2-Phosphorylierung**

In dieser Studie wurden die Effekte einer PrP-Überexpression auf die postischämische Aktivierung der MAPK/Erk- und der PI-3-Kinase/Akt- Signalwege untersucht. Die Signalwege spielen eine entscheidende Rolle für die Regulation von ischämisch induziertem neuronalen Zelltod. Während der PI-3-Kinase/Akt-Signalweg Zellüberleben fördert, führt die Aktivierung des MAPK/Erk-Signalweges zu einer Exazerbation der schädigenden Prozesse nach zerebraler Ischämie (Alessandrini et al., 1999; Namura et al., 2001). Es wurde eine Expressionsanalyse von Erk1/2, phospho-Erk1/2 (aktivierte Form von Erk), Akt, und phospho-Akt (aktivierte Form von Akt) in TG35- und WT-Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Ischämie und unter nicht ischämischen Konditionen durchgeführt. Die Intensitäten der Banden von Erk1/2 und phospho-Erk1/2 im Westernblot wurden mit Hilfe einer Densitometrie bestimmt und anhand von korrespondierenden Banden von Beta-Tubulin oder Aktin (Ladekontrollen) gemittelt.

Die postischämische Aktivierung der phospho-Erk1/2-Expression war signifikant geringer bei TG35-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen nach 6-stündiger Ischämie (Abb.4, S.35). 24 Stunden nach induzierter zerebraler Ischämie hat die phospho-Erk1/2-Expression im Vergleich zu der Expression nach 6-stündiger Ischämie in beiden Gruppen abgenommen. Die Expression von phospho-Erk1/2 war bei den TG35-Mäusen auch nach 24-stündiger Ischämie im Vergleich zu den WT-Mäusen geringer, zeigte jedoch keine statistische Signifikanz.

Bei nicht ischämisch alterierten TG35- und WT-Mäusen besteht keine signifikante Differenz in der phospho-Erk1/2 Expression (Abb.4, S.35).

Die Resultate zeigen eine erniedrigte postischämische Erk1/2-Aktivierung mit reduzierter phospho-Erk1/2-Expression in PrP<sup>c</sup>-überexprimierenden TG35-Mäusen 6 Stunden nach induzierter zerebraler Ischämie.



**Abb.4:A: Westernblot-Analyse der Expression von p-Erk/Erk nach transienter Ischämie**

**B: Densitometrische Bestimmung der p-Erk Konzentration im Westernblot**

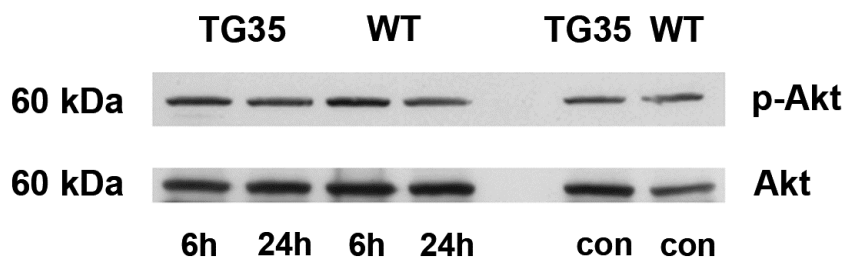
(A:) Westernblot-Analyse der Expression von phospho-Erk (p-Erk) und Erk bei zerebraler Ischämie nach 6 und 24 Stunden sowie unter nicht ischämischen Bedingungen bei transgenen Tieren (TG35) und Wildtyp-Tieren (WT). Es zeigte sich eine reduzierte Aktivität für phospho-Erk bei TG35-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren. Die Erk-Konzentration zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen TG35- und WT-Tieren.

(B:) Densitometrische Bestimmung der phospho-Erk Konzentration im Westernblot. # Phospho-Erk Konzentration nach 6 Stunden zerebraler Ischämie bei TG35-Tieren zeigte eine signifikante Reduktion der p-Erk Expression gegenüber WT-Tieren.

## 4.5 Einfluss von PrP<sup>c</sup>-Überexpression auf postischämische Akt-Phosphorylierung

Quantitative Westernblot-Analysen der Expression von phosphoryliertem (aktiviertem) Akt und Total-Akt zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen TG35- und WT-Mäusen 6 und 24 Stunden nach induzierter zerebraler Ischämie (Abb.9, S.36).

Diese Resultate sprechen gegen einen relevanten Effekt bei einer Überexpression von PrP<sup>c</sup> in der postischämischen Akt Phosphorylierung nach zerebraler Ischämie in vivo.



**Abb.9: Westernblot-Analyse der Konzentrationen an p-Akt und Total-Akt**

Westernblot-Analyse der Konzentrationen an phospho-Akt und Total-Akt bei transgenen Tieren (TG35) und Wildtyp Tieren (WT) bei transienter zerebraler Ischämie nach 6 und 24 Stunden.

## 5 Diskussion

Es gibt hinreichende Erkenntnisse, dass PrP<sup>c</sup> durch diverse molekulare Mechanismen und insbesondere Signalkaskaden neuronales Überleben, nach neuronaler Schädigung, moduliert (Roucou et al., 2004). Verschiedene Studien zeigten, dass eine Unterdrückung der PrP<sup>c</sup>-Expression in einer erhöhten Vulnerabilität in vitro und in vivo, bei verschiedenen neuronalen Noxen, wie z.B. einer zerebralen Ischämie resultiert (Kuwahara et al., 1999; Bounhar et al., 2001; McLennan et al., 2004; Roucou et al., 2004; Weise et al., 2006). Dahingegen existieren unterschiedliche Erkenntnisse über die Effekte einer PrP<sup>c</sup>-Überexpression nach induzierter neuronaler Ischämie. PrP<sup>c</sup> überexprimierende TG20-Mäuse zeigten keinen geringeren hypoxischen neuronalen Schaden nach transientem Verschluss der Arteria cerebri media (Spudich et al., 2005), wohingegen Adenovirus-vermittelte PrP<sup>c</sup>-Überexpression in einem Ischämiemodell mit Ratten zu einem reduzierten hypoxischen neuronalen Defekt führte (Shyu et al., 2005). Die kontroversen Ergebnisse gaben Anlass eine Studie zu konzipieren, die die Effekte einer PrP<sup>c</sup>-Überexpression nach hypoxischer neuronaler Schädigung untersucht. Weiterhin untersuchten wir den Einfluss einer PrP<sup>c</sup>-Überexpression auf Signalkaskaden,

welche im Zusammenhang mit hypoxischer neuronaler Schädigung stehen, um mögliche molekulare Mechanismen der PrP<sup>c</sup> vermittelten Neuroprotektion aufzuzeigen.

Wir konnten feststellen, dass eine moderate PrP<sup>c</sup>-Überexpression zu einer verminderten neuronalen Zellschädigung nach transientser fokaler Ischämie führt. Als möglichen molekularen Mechanismus einer Neuroprotektion identifizierten wir eine reduzierte postischämische Erk-1/2-Aktivierung in PrP<sup>c</sup> überexprimierenden Mäusen.

In vorhergehenden Studien mit PrP<sup>c</sup>-Knock-out-Mäusen stellten wir eine reduzierte postischämische Akt-Aktivität als möglichen molekularen Mechanismus einer erhöhten neuronalen Schädigung fest (Weise et al., 2006). Bei PrP<sup>c</sup> überexprimierenden Mäusen konnten wir dahingegen keine Änderung in der postischämischen Akt-Aktivität verzeichnen.

Die extrazellulär regulierten Kinasen-1 und -2 (Erk 1/2) zeigten eine erhöhte Aktivität nach Reperfusion einer zerebralen Ischämie (Alessandrini et al., 1999; Irving, Bamford 2002).

Eine Inhibition der MEK (Mitogen activated and extracellular signal-regulated Kinase) mit folgender reduzierter Erk-1/2-Phosphorylierung, resultierte in einer Neuroprotektion nach hypoxischer neuronaler Schädigung in vivo (Alessandrini et al., 1999; Namura et al., 2001).

Darauf basierend stellten wir die Hypothese auf, dass eine reduzierte postischämische Erk-1/2-Aktivierung, wie wir sie in PrP<sup>c</sup> überexprimierenden Mäusen feststellten, in einer reduzierten ischämischen neuronalen Schädigung in TG35-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen resultiert.

Auch andere Studien bringen den MAPK/Erk-Signalweg mit den neuroprotektiven Eigenschaften des PrP<sup>c</sup> in Verbindung. Die Arbeitsgruppe um Spudich demonstrierte eine erhöhte postischämische Erk-1/2-Phosphorylierung in PrP<sup>c</sup>-Knock-out-Mäusen, verglichen mit WT-Mäusen, welche zu einer erhöhten neuronalen Schädigung nach 30-minütiger zerebraler Ischämie führte (Spudich et al., 2005). Dahingegen beobachteten sie keine relevanten Unterschiede in der postischämischen Erk-1/2-Aktivierung zwischen PrP<sup>c</sup> überexprimierenden TG20-Mäusen und WT-Mäusen. Erstaunlicherweise bestand in dieser Studie kein relevanter neuroprotektiver Effekt bei hypoxischer Hirnschädigung.

Diese Unterschiede im Vergleich zu unseren Ergebnissen, ließen sich durch unterschiedliche transiente Ischämiezeiten erklären. In unseren Experimenten wurde eine 90-minütige Ischämie durchgeführt. Wir stellten eine erhöhte postischämische Aktivierung der Erk-1/2 in WT-Mäusen und eine statistisch signifikant geringere postischämische Aktivierung der Erk-1/2 in TG35-Mäusen fest, was zu einer Neuroprotektion gegenüber hypoxischer Schädigung mit deutlicher Reduktion der Schlaganfallvolumina führte. Dahingegen führte in den Experimenten von Spudich eine 30-minütige transiente Ischämie zu keiner relevanten Erk-

1/2-Phosphorylierung, weder bei den WT-Mäusen, noch bei den PrP<sup>c</sup> überexprimierenden Mäusen (Spudich et al., 2005). Dies würde für einen geringeren Einfluss des Erk-1/2-Signalwegs auf den ischämischen neuronalen Zelltod nach milder transienter Ischämie sprechen und somit die fehlende Neuroprotektion bei PrP<sup>c</sup> überexprimierenden TG20-Mäusen nach 30-minütiger Ischämie erklären.

Als weiteren möglichen molekularen Mechanismus der Neuroprotektion untersuchten wir den Einfluss des PrP<sup>c</sup> auf die anti-apoptotische Kinase Akt. In vorhergehenden Experimenten konnten wir zeigen, dass bei PrP<sup>c</sup>-Knock-out Mäusen eine reduzierte postischämische Aktivierung der anti-apoptotischen Kinase Akt mit gesteigerter Caspase-3-Aktivierung resultierte, welche zu einer verstärkten ischämischen neuronalen Schädigung führte (Weise et al., 2006). Darauf basierend stellten wir die Arbeitshypothese auf, dass PrP<sup>c</sup> überexprimierende TG35-Mäuse eine verstärkte postischämische PI-3Kinase/Akt-Aktivierung mit resultierender verminderter neuronaler Schädigung nach transienter Ischämie haben könnten. In unseren durchgeführten Experimenten bestand jedoch kein Unterschied in der postischämischen Akt-Aktivierung bei TG35- und WT-Mäusen. Diese Erkenntnis würde gegen eine Involvierung des PI-3-Kinase/Akt-Signalwegs in der Neuroprotektion nach transienter zerebraler Ischämie bei PrP<sup>c</sup> überexprimierenden TG35-Mäusen sprechen.

## **6 Zusammenfassung**

Die physiologischen Funktionen des PrP<sup>c</sup> sind noch nicht vollständig verstanden. In diversen Studien zeigte sich jedoch eine Einflussnahme durch das Prionprotein bei neuronaler Schädigung (Roucou et al., 2004). Beispielsweise führt eine Suppression des PrP<sup>c</sup> zu einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber multiplen neuronalen Schädigungen (Kuwahara et al., 1999; Bounhar et al., 2001; McLennan et al., 2004). Dahingegen bestehen gegensätzliche Erkenntnisse hinsichtlich der Effekte einer PrP<sup>c</sup>-Überexpression bei ischämisch induziertem neuronalen Schaden (Shyu et al., 2005; Spudich et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit sollten Effekte einer PrP<sup>c</sup>-Überexpression bei ischämisch induziertem neuronalen Schaden aufgezeigt werden und mögliche molekulare Mechanismen einer Neuroprotektion identifiziert werden. Die zugrunde liegenden Experimente der vorliegenden Arbeit wurden unter Berücksichtigung der oben genannten gegensätzlichen Erkenntnisse konzipiert. Zur Realisierung des Versuchsvorhabens wurde eine transitorische 90-minütige neuronale Ischämie bei Mäusen induziert. Die Induktion der transienten Ischämie erfolgte nach dem Prinzip des Fadenokklusionsmodells ( Hata et al., 1998). Zur Evaluierung

einer Einflussnahmen durch PrP<sup>c</sup> wurden die Infarktvolumina von PrP<sup>c</sup> überexprimierenden Mäusen (TG35) und Wildtyp-Mäusen (WT) verglichen. Als möglicher molekularer Mechanismus der Neuroprotektion durch PrP<sup>c</sup>, wurde der Einfluss auf die postischämische Aktivierung des MAPK/Erk- und der PI-3-Kinase/Akt-Signalweg untersucht. Es erfolgte eine Expressionsanalyse von Erk-1/2, phospho-Erk-1/2, Akt und phospho-Akt bei TG35- und WT-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten der Ischämie und im Vergleich dazu unter nicht ischämischen Bedingungen. Es zeigte sich eine signifikant reduzierte Aktivität für phospho-Erk bei TG-35-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren. Die Erk-Konzentration zeigte keinen Unterschied zwischen TG-35 und WT-Tieren.

In unseren Experimenten konnten wir demonstrieren, dass eine 90-minütige Ischämie bei den PrP<sup>c</sup> überexprimierenden Mäusen (TG35) in einem verringerten Infarktvolumen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen resultiert. In weiterführenden Experimenten identifizierten wir eine postischämisch reduzierte Erk-1/2-Phosphorylierung bei PrP<sup>c</sup> überexprimierenden Mäusen im Sinne eines verminderten Aktivitätsgrades.

Die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die in verschiedenen Studien angenommene neuroprotektive Funktion des PrP<sup>c</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass Prnp-überexprimierende Mäuse nach Induktion einer 90-minütigen Ischämie signifikant geringere Infarktvolumina aufweisen als Prnp-WT-Mäuse. Als möglichen molekularen Mechanismus der PrP<sup>c</sup> vermittelten Neuroprotektion identifizierten wir einen Signalweg der extrazellulär regulierten Kinasen (Erk-1/2). Dabei konnten wir zeigen, dass eine PrP<sup>c</sup> Überexpression in transgenen Tieren (TG35-Mäuse) in einer Reduktion der postischämischen Erk-1/2-Phosphorylierung resultiert. Dies führte wiederum zu einer Reduktion der neuronalen Schädigung bei einer transienten zerebralen Ischämie im Sinne einer Reduktion der zerebralen Infarktvolumina im Vergleich zu Wildtyp-Tieren.

Inwiefern die gewonnenen Erkenntnisse am Mausmodell auf Menschen übertragbar sind, gilt es noch genauer zu verifizieren. Hinsichtlich weiterführender Forschungsansätze wäre es interessant, noch weitere molekulare Mechanismen zu identifizieren, welche in einer Neuroprotektion resultieren. In Hinblick auf therapeutische Ansätze stellt sich auch die Frage, inwieweit eine aktive postischämische Prnp-Aktivierung mit nachfolgender PrP<sup>c</sup>-Überexpression oder eine isolierte Beeinflussung protektiver Signalkaskaden zu einer Infarktvolumenreduktion führen könnten. Weitere Ansatzpunkte eröffnen sich auch hinsichtlich neurodegenerativer Erkrankungen, hier wäre tiefergehend zu erforschen, inwiefern die gewonnenen Erkenntnisse der Neuroprotektion zu einem therapeutischen Ansatz beitragen könnten.

## 7 Literaturverzeichnis

- Albers, GW, Goldber MP, Choi DW (1992): Do NBDA antagonists prevent neuronal injury? Yes. *Arch Neurol* 49:418-420.
- Alessandrini A, Namura S, Moskowitz, MA, Bonventre, JW (1999): MEK 1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12866-12869.
- Back T, Hirsch JG, Szabo K, Gass A. (2000): Failure to demonstrate peri-infarct depolarizations by repetitive MR diffusion imaging in acute human stroke. *Stroke* 31: 2901-2906.
- Bedogni A, Pani G, Colavitti R, Ricco A, Borrello S, Murphy M, Smith R, Eboli ML, Galeottie T (2003): Redox regulaion of cAMP-responsife element-binding protein and induction of manganous superoxide dismutase in nerve growth factordependent cell survival. *J Biol Chem* 278:16510-16519.
- Berlit P, Popescu O, Klotzsch C, Diehl RR, Berg-Dammer E (1997): Treatment of acute stroke on the stroke unit. Initial experiences with an acute stroke unit in Germany. *Nervenarzt* 68:122-128.
- Blomgren K (1999). Calpastatin is upregulated and acts as a suicide substrate to calpains in neonatal rat hypoxia-ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 890:270-271.
- Bogousslavsky J, Kaste M, Olsen TS, Hacke W, Orgogozo JM (2000): Risk factors and stroke prevention. *Cerebrovasc Dis* 10(suppl 3): 12-21.
- Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer C, LeBlanc A (2001): Prion protein protects human neurons against Bax-mediated cell death. *J Biol Chem* 276:39145-39149.
- Brown DR, Besinger A (1998): Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J* 334:423-429.
- Brown DR, Qin K, Herms, Madlung A, Manson J,Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway C, Kretzschmar H (1997a): The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390:684-687.
- Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA (1997b): Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 acivity. *Exp Neurol* 146:104-112.
- Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA (1997c): Effects of oxidative stress on prion protein expression in PC 12 cells. *Int J Dev Neurosci* 15:961-972.
- Brown DR, Wong BS, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, Jones IM (1999): Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J* 344:1-5.



- Brown DR, Clive C, Haswell SJ (2001): Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *J Neurochem* 76:69-76.
- Brown DR, Nicholas Rst.J, Canevari L (2002): Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J Neurosci Res* 67:211-224.
- Cashman N, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascak R, Bolton D, Bendheim P (1990): Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* 61:185-192.
- Caughey B, Race RE, Chesebro B (1988): Detection of prion protein mRNA in normal and scrapie-infected tissue and cell lines. *J Gen Virol* 69:711-716.
- Caughey B, Race RE, Ernst D, Buchmeier MJ, Chesebro B (1989): Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol* 63:175-181.
- Chacón MA, Barría MI, Larca R, Huidobro-Toro JP, Inestrosa NC (2003): A human protein peptide (PrP(59-91)) protects against copper neurotoxicity. *Mol Psychiat* 8:35, 8:853-862.
- Chen J, Simon RP, Nagayama T, Zhu R, Loeffert JE, Watkins SC, Graham SH (2000): Suppression of endogenous bcl-2 expression by antisense treatment exacerbates ischemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1033-1039.
- Chen S, Mange A, Dong L, Lehmann S, Schachner M (2003): Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neuritic outgrowth and neuronal survival. *Mol Cell Neurosci* 22:227-233.
- Chiarini LB, Freitas ARO, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R (2002): Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J* 21:3317-3326.
- Collinge J, Whittington MA, Sidle KCL, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JGR (1994): Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370:295-297.
- Creutzfeldt HG (1920): Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Ges Neurol Psychiat* 57:1-18.
- Cuillé J, Chelle PL (1936): La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *CR Acad Sci* 203:1552-1554.
- DeGracia DJ, Kumar R, Owen CR, Krause GS, White BC (2002): Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implications for neuronal survival or death. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:127-141.

- Del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ (2000): Inflammation and stroke: Putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol* 10:95-112.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999): Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-397.
- Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Waeber C, Zhang L, Gómez-Isla T, Hyman BT, Moskowitz MA (1998): Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:238-247.
- Fink K, Zhu J, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Endres M, Ma J, Dalkara T, Yuan J, Moskowitz MA (1998): Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1071-1076.
- Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C (1996): Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* 15:1255-1264.
- Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ, Hall S (2002): Selective Expression of Prion Protein in Peripheral Tissues of the Adult Mouse. *Neuroscience* 113:177-192.
- Forloni G, Del Bo R, Angeretti N, Chiesa R, Smiroldo S, Doni R, Ghibaudi E, Salmona M, Porro M, Verga L, Giaccone G, Bugiani O, Tagliavini F (1994): A neurotoxic prion protein fragment induces rat astroglial proliferation and hypertrophy. *Eur J Neurosci* 6:1415-1422.
- Forster C, Clark HB, Ross ME, Iadecola C (1999): Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts. *Acta Neuropathol (Berl)* 97:215-220.
- Frijns CJ, Kapelle LJ (2002). Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 33:2115-2122.
- Fujimura M, Morita-Furimura Y, Murakami K, Kawase M, Chan PH (1998): Cytosolic redistribution of cytochrome-c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1239-1247.
- Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M (1966): Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209:794-796.
- Gorodonsky A, Harris DA (1995): Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin. *J Cell Biol* 129:619-627.

- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR (2000): Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Mol Brain Res* 76:85-92.
- Hadlow WJ (1959): Scrapie and Kuru. *Lancet* 1959, 2:289-290.
- Hara H, Paul LH, Nariman P, Mark CF, Moskowitz MA (1996): Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient mca occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:605-611.
- Harris DA (1999): Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Review* 12:429-444.
- Hata R, Mies G, Wiessner C, Hossmann KA (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.
- Hata R, Macada K, Hermann D, Miles G, Hossmann KA (2000): Dynamics of regional brain metabolism and gene expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:306-315.
- Hirsch EC (1999): Mechanism and consequences of nerve cell death in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 56:127-137.
- Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emlet DR, Dieterich R, Wong AJ (1997): Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol3-Kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12419-12424.
- Hoshino S, Inoue K, Yokoyama T, Kobayashi S, Asakura t, Teramoto A, Itohara S (2003): Prions prevent brain damage after experimental brain injury: a preliminary report. *Acta Neurochir* 86:297-299.
- Hu WH, Johnson H, Shu HB (1999): Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signals NF-kB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. *J Biol Chem* 274:30603-30610.
- Humpel C, Lippoldt A, Chadi G, Ganten D, Olson L, Fuxe K (1993): Fast and widespread increase of basic fibroblast growth factor messenger RNA and protein in the forebrain after kainate-induced seizures. *Neuroscience* 57:913-922.
- Iadecola C, Salkowski CA, Zhang F, Aber T, Nagayama M, Vogel SN, Ross ME (1999): The transcription factor interferon regulatory factor 1 is expressed after cerebral ischemia and contributes to ischemic brain injury. *J Exp Med* 189:719-727.
- Irving EA, Bamford M (2002): Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:631-647.

- Jacobsen K, Dietrich C (1999): Looking at lipid rafts? *Trends Cell Biol* 9:87-91.
- Jakob A (1921): Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Dtsch Z Nervenheilkd* 70:132-146.
- Jakob A: Spastische Pseudosklerose. Die extrapyramidalen Erkrankungen. Springer, Berlin 1963: 215-245.
- Jeffrey M, Halliday WG, Bell J, Johnston AR, MacLeod NK, Ingham C, Sayers AR, Brown DA, Fraser JR (2000): Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26:41-54.
- Kamii H, Kinouchi H, Sharp FR, Koistinaho J, Epstein CJ, Chan PH (1994): Prolonged expression of hsp 70 mRNA following transient focal cerebral ischemia in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *J Cereb Blood Flow Metab* 14(3):478-486.
- Katsura K, Kristián T, Siesgö BK (1994): Energy metabolism, ionhomeostasis and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* 22:991-996.
- Kerr JF, Searle J (1972): The digestion of cellular fragments within phagolysosomes in carcinoma cells. *J Pathol* 1:55-58.
- Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC (1999): Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5752-5757.
- Krause GS, White BC, Aust SD, Nayini NR, Kumar K (1988): Brain cell death following ischemia and reperfusion: a proposed biochemical sequence. *Crit Care Med* 16:714-726.
- Kretzschmar HA (1995): Codon 178 mutation of the human prion protein gene in German family (Backer family): sequencing data from 72 year-old celloidin-embedded brain tissue. *Acta Neuropathol* 89:96-98.
- Kretzschmar HA (2002): Ätiologie, Pathologie und Diagnostik der Prionkrankheit des Menschen. *Internist* 43:716-730.
- Kretzschmar HA, Stowring LE, Westaway D, Stubblebine WH, Prusiner SB, Scott M, DeArmond SJ (1986): Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* 5:315-324.

- Krupinski J, Lopez E, Marti E, Ferrer I (2000): Expression of caspases and their substrates in the rat model of focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 7:332-342.
- Kurschner C, Morgan J (1995): The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Mol Brain Res* 30:165-168.
- Kurschner C, Morgan J (1996): Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein. *Mol Brain Res* 37:249-258.
- Kuwahara C, Takeuchi A, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T (1999): Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400:225-226.
- Lam M, Dubyak G, Chen L, Nunez G, Miesfeld RL, Distelhorst CW (1994): Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmatic reticulum-associated  $Ca^{2+}$  fluxes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6569-6573.
- Lawrence MS, McLaughlin JR, Gun GH, Ho DY, McIntosh L, Kunis DM, Sapolsky RM, Steinberg GK (1997): Herpes simplex viral vectors expressing Bcl-2 are neuroprotective when delivered after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:740-744.
- LeBlanc A: Unravelling the controversy of prion diseases. In: Wang E, Snyder S, editors. *Handbook of the aging brain*. Academic Press, New York 1998: 202-214.
- Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW (1999): The changing landscape of ischemic brain injury mechanisms. *Nature* 399 (suppl): A7-A14.
- Li Y, Sharov VG, Jiang N, Zaloga C, Sabbah HN, Chopp M (1995): Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 146: 1045-1051.
- Linnik MD, Zahos P, Geschwind MD, Federoff HJ (1995): Expression of bcl-2 from a defective herpes simplex virus-1 vector limits neuronal death in focal cerebral ischemia. *Stroke* 26:1670-1674.
- Lopes MH, Hajj GNM, Muras AG, Mancini GL, Castro RMPS, Ribeiro KCB, Brentani RR, Linden R, Martins VR (2005): Interaction of Cellular Prion and Stress-Inducible Protein 1 Promotes Neuritogenesis and Neuroprotection by Distinct Signaling Pathways. *J Neurosci* 25 (49):11330-11339.
- MacManus JP, Buchan AM (2000): Apoptosis after experimental stroke: fact or fashion? *J Neurotrauma* 17:899-914.

- Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI (1994): The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* 17:251-257.
- Martinou JC, Green DR (2001): Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 63-67.
- Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C, et al. (1994): Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 13:1017-1030.
- Martins VR, Granner E, Garcia-Abreu J, DeSouza S, Mercadante A, Veiga S, Zanata S, Neto V, Brentani R (1997): Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat Med* 3:1376-1382.
- Martins VR, Linden R, Prado MA, Walz R, Sakamoto AC, Izquierdo I, Brentani RR (2002): Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett* 512:25-28.
- Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ (1981): Creutzfeld-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Sträussler syndrome. With an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain* 104:559-588.
- McLennan NF, Prennan PM, McNeill A, Davies I, Fotheringham A, Rennison KA, Ritchie D, Brannan F, Head MW, Ironside JW, Williams A, Bell JE (2004): Prion Protein Accumulation and Neuroprotection in Hypoxic Brain Damage. *Am J Pathol* 165:227-235.
- Meggendorfer F (1930): Klinische und genealogische Beobachtungen bei einem Fall von spastischer Pseudosklerose. *Z Ges Neurol Psychiatr* 128:337-341.
- Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A (2004): Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Disease*, 19(3-4):151-67.
- Mies G, Iijima T, Hossmann KA (1993): Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* 4:709-711.
- Mitsios N, Saka M, Krupinski J, Pennucci R, Sanfeliu C, Turu MM, Gaffney J, Kumar P, Kumar S, Sullivan M, Slevin M (2007): Cellular prion protein is increased in the plasma and peri-infarcted brain tissue after acute stroke. *J Neurosci Res* 85:602-611.
- Mitteregger G, Voskoz M, Krebs B, Xiang W, Kohlmansperger V, Nötting S, Hamann GF, Kretzschmar HA (2007): The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein. *Brain Pathol* 17:174-183.

- Moser M, Colello RJ, Pott U, Oesch B (1995): Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* 14:509-517.
- Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O (2000): Signal transduction through prion protein. *Science* 289:1925-1928.
- Nagata S, Golstein P (1995): The Fas death receptor. *Science* 267:1449-1456.
- Nakatsuka H, Ohta S, Tanaka J, Toku K, Kumon Y, Maeda N, Sakanaka M, Sakaki S (1999): Release of cytochrome c from mitochondria to cytosol in gerbil hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia. *Brain Res* 849:216-219.
- Namura S, Iihara K, Takami S, Nagata I, Kikuchi H, Matsushita K, Moskowitz MA, Bonventre JV, Alessandrini A (2001): Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 11569-11574.
- Naslavsky N, Stein R, Yanai A, Friedlander G, Taraboulos A (1997): Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem* 272:6324-6331.
- Nellgard B, Wieloch T (1992): Postischemic blockade of AMPA but not NMDA receptors mitigates neuronal damage in the rat brain following severe cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:2-11.
- Nicholls D, Attwell D (1990): The release and uptake of excitatory amino acids. *Trend Pharmacol Sci* 11:462-468.
- Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C (1997): Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci* 17:2746-2755.
- Oesch B, Westaway D, Walchi M, McKinley M, Kent S, Aebersold R, Barry R, Tempst P, Teplow D, Hood L, Prusiner S, Weissmann C (1985): A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40:735-746.
- Padosch SA, Vogel P, Böttiger BW (2001): Neuronale Apoptose nach zerebraler Ischämie-Grundlagen, Pathophysiologie und Interventionsmöglichkeiten. *Anaesthesist* 50:905-920.
- Paitel E, Alves da Costa C, Vilette D, Grassi J, Checler F (2002): Overexpression of PrP<sup>c</sup> triggers caspase 3 activation: potentiation by proteasome inhibitors and blockade by anti-PrP antibodies. *J Neurochem* 83:1208-1214.
- Paitel E, Sunyach C, Alves da Costa C, Bourdon JC, Vincent B, Checler F (2004): Primary cultured neurons devoid of cellular prion protein display lower responsiveness to

- staurosporine through the control of p53 at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J Biol Chem* 279:612-618.
- Park CK, Nehls DG, Graham DJ, Teasdale GM, Mc Culloch J (1988): The glutamate antagonist MK-801 reduces focal ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 24:543-551.
- Rachidi W, Vilette D, Guiraud P, Arlotto M, Riondel J, Laude H, Lehmann S, 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.
- Roucou X, Guo G, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc AC (2003): Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *J Biol Chem* 278:40877-40881.
- Roucou X, Gains M, LeBlanc AC (2004): Neuroprotective functions of prion protein. *J Neurosci Res* 75:153-161.
- Sales N, Rodolfo R, Hässig R, Faucheux B, Di Giamberardino L, Moya KL (1998): Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur J Neurosci* 10:2464-2471.
- Schmidt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, Ball HL, Bradon N, Bosque PJ, Crossin KL, Edelman GM, DeAmond SJ, Cohen SB, Prusiner SB (2001): Binding of neuronal cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J Mol Biol* 314:1209-1225.
- Schneider B, Mutel V, Pietri M, Ermonval M, Mouillet-Richard S, Kellermann O (2003): NADPH oxidase and extracellular regulated kinases  $\frac{1}{2}$  are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13326-13331.
- Shaked Y, Rosenmann H, Talmor G, Gabizou R (1999): A C-terminal-truncated PrP isoform is present in mature sperm. *J Biol Chem* 274: 32153-32158.
- Shyu WC, Kao MC, Chou WY, Hsu YD, Soong BW, (2000): Heat shock modulates prion protein expression in human NT-2 cells. *Neuroreport* 11:771-774.
- Shyu WC, Lin SZ, Saeki K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Onodera T, Chiang MF, Thajeb P, Li H (2004): Hyperbaric oxygen enhances the expression of prion protein and heat shock protein 70 in a mouse neuroblastoma cell line. *Cell Mol Neurobiol* 24:257-268.
- Shyu WC, Shinn-Zhong L, Ming-Fu C, Dah-Ching D, Kuo-Wei L, Shih-Fen C, Hui-I Y, Hung L (2005): Overexpression of PrPc by Adenovirus-Mediated Gene Targeting Reduces Ischemic Injury in a Stroke Rat Model. *J Neurosci* 25(39): 8967-8977.



- Spielhauer C, Schatzl HM (2001): PrP<sup>c</sup> directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J Biol Chem* 276:44604-44612.
- Spudich A, Frigg R, Kilic E, Kilic Ü, Oesch B, Raeber A, Bassetti CL, Hermann D (2005): Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: Role of ERK-1/-2 and STAT-1. *Neurobiol Dis* 20:442-449.
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998): Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316.
- Van Rheede T, Smolenaars MM, Madsen O, De Jong WW (2003): Molecular evolution of the mammalian prion protein. *Mol Biol Evol* 20:111-121.
- Vassallo N, Herms J, Behrens C, Krebs B, Saeki K, Onodera T, Windl O, Kretzschmar HA (2005): Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by cellular prion protein and its role in cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* 332:75-82.
- Villalba AM, Hahne M, Kleber S, Volgel J, Falk W, Schenkel J, Krammer PH (2001): Therapeutic neutralization of CD95 ligand and TNF attenuates brain damage in stroke. *Cell Death Differ* 8:679-686.
- Weber T, Zerr I, Bodemer M, Poser S (1997): Expand illness spectrum of human spongiform encephalopathies or prion diseases. *Nervenarzt* 68:309-323.
- Weise J, Bähr M (2004): Molekulare Veränderungen beim ischämischen Schlaganfall. *Molekular medizinische Grundlagen von altersspezifischen Erkrankungen* 2:238-239.
- Weise J, Crome O, Sandau R, Schulz-Schaeffer W, Bähr M, Zerr I (2004): Upregulation of cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. *Neurosci Lett* 372:146-150.
- Weise J, Sandau R, Schwarting S, Crome O, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Bähr M (2006): Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* 37:1296-1300.
- Westaway D, Miranda CA, Foster D, Zebarjadin Y, Scott M, Tarchia M, Yang SL, Seban H, DeArmond SJ, Ebeling C (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, Cooper C, Turner S, Da CM, Carlson GA, Prusiner SB (1994): *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6418-6422.
- Whatley SA, Powell JF, Politopoulos G, Campbell I, Brammer M, Percey N (1995): Regulation of intracellular free calcium levels by the cellular prion protein. *Neurorep* 6:2333-2337.

- White AR, Collins SJ, Maher F, Jobling MF, Stewart LR, Thyer JM, Beyreuther K, Masters CL, 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.
- White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS (2000): Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* 179:1-33.
- Wiessner C, Allegrini PR, Rupalla K, Sauer D, Oltersdorf T, McGregor AL, Bischoff S, Böttiger BW, van der Putten H (1999): Neuron-specific transgene expression of Bcl-XL but not Bcl-2 genes reduced lesion size after permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurosci Lett* 268:119-122.
- Wong BS, Liu T, Li R, Pan T, Petersen RB, Smith MA, Gambetti P, Perry G, Manson JC, Brown DR, Sy MS (2001). Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. *J Neurochem* 76:565-572.
- Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, Lee KS, Juliano MA, DeOliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Lindern R, Brentani RR, Marins VR (2002): Stress inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J* 21:3307-3316.
- Zeevalk GD, Bernard LP, Nicklas WJ (1998): Role of oxidative stress and the glutathione system in loss of dopamine neurons due to impairment of energy metabolism. *J Neurochem* 70:1421-1430.
- Zerr I, Poser S (2002): Clinical diagnosis and differential diagnosis of CJD and vCJD with special emphasis on laboratory tests. *APMIS* 110:88-98.
- Zhang Y, Qin K, Wang J, Hung T, Zhao RY (2006): Dividing roles of prion protein in staurosporine-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 349:759-768.

## **Danksagung**

*Meine besondere Danksagung gilt Frau Prof. Dr. med. Inga Zerr und Herrn Dr. med. Jens Weise, die mir ermöglicht haben, in dieses besondere Projekt eingebunden zu werden. Ich bedanke mich bei meinen Mentoren für das hohe persönliche Engagement und die tatkräftige Unterstützung.*

*Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei meinen Eltern und insbesondere bei meiner Mutter, Frau Dr. Barbara Müller, für die vielen Anregungen und die anhaltende Motivation um die Dissertation zum Abschluss zu bringen.*