

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

**Über die Interaktionen des zellulären Prion-Proteins
(PrP^c) mit relevanten Proteinen der
Alzheimer-Erkrankung**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Katharina Maria Maibach-Wulf

aus

Wolfenbüttel

Göttingen, 2014

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatterin: Prof. Dr. I. Zerr

II. Berichterstatter: PD Dr. O. Wirths

III. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Schu

Promotor: Prof. Dr. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Prionenerkrankungen	1
1.1.1 Entdeckung des Prion-Proteins	1
1.1.2 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE)	1
1.1.3 Strukturenvergleich von PrP ^c und PrP ^{sc}	2
1.1.4 Die „Protein-only“-Hypothese	3
1.2 Das zelluläre Prion-Protein (PrP ^c).....	4
1.2.1 Das PrP ^c -Gen.....	4
1.2.2 Die Struktur von PrP ^c	5
1.2.3 Der Zellzyklus von PrP ^c	7
1.2.4 Physiologische Aufgaben von PrP ^c	8
1.2.4.1 Allgemeine physiologische Funktionen von PrP ^c	8
1.2.4.2 Die Funktion von PrP ^c im Nervensystem.....	9
1.3 Rolle von PrP ^c bei der Alzheimer-Demenz (AD)	10
1.4 Die Rolle von PrPc beim amyloiden Spaltweg und Tau-Metabolismus.....	11
1.4.1 Das Amyloide Vorläufer-Protein APP und dessen Spaltwege.....	11
1.4.2 Das Tau-Protein bei der AD	13
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Chemikalien	15
2.1.1 Kits	15
2.1.2 Antikörper	16
2.1.2.1 Primäre Antikörper.....	16
2.1.2.2 Sekundäre Antikörper	17
2.1.3 Zellen.....	17
2.1.4 Plasmidvermehrung.....	17
2.1.5 Mäuse	18
2.1.6 Verwendete Puffer und Lösungen.....	18
2.1.7 Proteinstandard-Marker.....	18

2.1.8 Instrumente.....	18
2.1.9 Verbrauchsmaterialien	20
2.2 Molekularbiologische Methoden	20
2.2.1 Transformation der elektrokompenten E. coli-Stämme mit der Plasmid-DNA... 20	
2.2.1.1 Plasmide	21
2.2.1.2 Transformation	21
2.2.1.3 Transformation der kompetenten E. coli.....	22
2.2.1.4 Vermehren und Aufbewahren der E. coli-Stämme	22
2.2.2 Gewinnung der Plasmid-DNA	22
2.2.2.1 Mini-Plasmidpräparation.....	22
2.2.2.2 Midi-Plasmidpräparation.....	23
2.2.3 Transfektion der Zelllinien.....	24
2.3 Zellbiologische Methoden.....	24
2.3.1 HEK 293-Zellen	25
2.3.1.1 Kultivierung von HEK 293-Zellen.....	25
2.3.1.2 Splitten von HEK 293-Zellen.....	25
2.3.2 SH-SY5Y-Zellen	26
2.3.2.1 Kultivierung von SH-SY5Y-Zellen	26
2.3.3 Kryokonservierung.....	26
2.4 Zellbiochemische Methoden	26
2.4.1 Herstellung der Zelllysate	26
2.4.2 Herstellung der Hirnhomogenate	26
2.4.3 Proteinmessung nach Bradford	27
2.4.4 Deglykosylierung von PrP ^c	28
2.4.5 SDS-Page	28
2.4.6 Western-Blot	29
2.4.7 Antikörperinkubation	30
2.4.8 Membranentwicklung.....	30
2.4.9 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	30
2.4.10 Analyse der Tau- und p-Tau-Konzentration mittels ECLIA (Elektrochemilumineszenz-Immunoassay)	31
2.4.11 Immunzytochemie	31

2.4.12 Immunpräzipitation	32
2.5 Statistische Analyse.....	32
3. Ergebnisse	33
3.1 Immunzytochemische Detektion von PrP ^c	33
3.2 Quantifizierung der PrP ^c -Expression in transfizierten Zellen.....	34
3.3 Deglykosylierung von PrP ^c	36
3.4 Einfluss von PrP ^c auf die APP- und BACE-Expression	36
3.5 Interaktion von PrP ^c mit AD-relevanten Proteinen.....	37
3.6 Einfluss von PrP ^c auf die APP-Spaltung.....	38
3.6.1 Regulation von A β -40 durch PrP ^c	39
3.6.2 Regulation von A β -42 durch PrP ^c	40
3.6.3 Regulation von APP β durch PrP ^c	40
3.6.4 Einfluss von PrP ^c auf die nicht-amyloide Spaltung von APP	41
3.7 Mausmodell	42
3.7.1 APP- und BACE-Expression in Mäusen.....	42
3.7.2 Detektion von A β -40 in Prnp ^{0/0} - , WT- und PrP ^c -überexprimierenden (Tg-35) Mäusen	43
3.7.3 Detektion der Tau- und p-Tau-Expression in Prnp ^{0/0} - und WT-Mäusen	44
4. Diskussion	46
4.1 PrP ^c interagiert mit APP, sAPP und BACE	46
4.2 PrP ^c hat keinen Einfluss auf die APP- und BACE-Expression.....	49
4.3 PrP ^c beeinflusst die Bildung der APP-Spaltprodukte	49
4.4 PrP ^c interagiert mit Tau und p-Tau	53
5. Zusammenfassung.....	57
6. Literaturverzeichnis.....	58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Umfaltungs- und Keimbildungsmodell.....	3
Abbildung 2:	Struktur des humanen Prion-Proteins.....	5
Abbildung 3:	Dreidimensionales Modell des humanen Prion-Proteins.....	7
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der APP-Prozessierung.....	11
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des pMCS-EGFP-Vektors.....	21
Abbildung 6:	Materialanordnung in der Blotting-Maschine nach der Semi-dry-Methode..	29
Abbildung 7:	Immunzytochemische Detektion von PrP ^c in HEK-293- und SH-SY5Y-Zellen.....	34
Abbildung 8:	Expression von PrP ^c in HEK-293- und SH-SY5Y-Zellen nach 24 und 48 Stunden Transfektion mit Quantifizierung in Prozent.....	35
Abbildung 9:	Deglykosylierung von PrP ^c	36
Abbildung 10:	Expression von APP und BACE in HEK-293- und SH-SY5Y-Zellen mit und ohne PrP ^c -Überexpression.....	37
Abbildung 11:	Interaktion von PrP ^c mit APP, BACE, p-Tau und Tau.....	38
Abbildung 12:	Interaktion von APP, BACE, Tau und p-Tau mit PrP ^c	38
Abbildung 13:	Abnahme von A β -40 in PrP ^c -überexprimierenden Zellen intra- und extrazellulär.....	39
Abbildung 14:	Einfluss von PrP ^c auf die Expression von A β -42.....	40
Abbildung 15:	Einfluss von PrP ^c auf die Entstehung von sAPP β	41
Abbildung 16:	Einfluss von PrP ^c auf die sAPP α -Expression.....	42
Abbildung 17:	Detektion und Quantifikation der Proteine APP und BACE in Gehirnhomogenaten von Prnp ^{0/0} - und WT-Mäusen im Alter von 3 und 15 Monaten.....	43
Abbildung 18:	A β -40-Konzentrationen in Mäusegehirnhomogenaten.....	44
Abbildung 19:	Detektion von Tau, p-Tau in Mäusegehirnhomogenaten.....	45
Abbildung 20:	Einfluss von PrP ^c auf die APP-Spaltung im Modell.....	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primäre Antikörper.....	16
Tabelle 2: Sekundäre Antikörper.....	17
Tabelle 3: Instrumente.....	18
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien.....	20
Tabelle 5: Interaktionspartner von PrP ^c	47
Tabelle 6: Untersuchungsergebnisse zu den Tau-Formen.....	54

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A β	Amyloid beta
AD	Alzheimer-Demenz
AP	Alkalin-Phosphatase
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein (<i>Amyloid Precursor Protein</i>)
BACE	<i>beta-site APP-cleaving enzyme</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
°C	Grad Celsius
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EIA	<i>enzyme immuno assay</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FFI	Fatale familiäre Schlaflosigkeit (<i>Fatal Familial Insomnia</i>)
GSS	Gerstmann-Sträulsser-Scheinker-Syndrom
HEK-293	<i>human embryonic kidney cell line</i>
M	Mol/Liter
mM	Millimol/Liter
nm	Nanometer
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PRNP	humanes Prion-Protein-Gen
PrP ^c	zelluläres Prion-Protein

PrP ^{sc}	pathologische Isoform des Prion-Proteins
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
SDS	<i>sodium-dodecyl-sulfate</i>
SH-SY5Y	Neuroblastoma-Zelllinie
TEMED	Tetramethyldiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
vCJD	<i>variant Creutzfeldt-Jakob disease</i>
x g	relative Zentrifugalkraft

1. Einleitung

1.1 Prionenerkrankungen

1.1.1 Entdeckung des Prion-Proteins

Bei Untersuchungen zum Erreger der Krankheit Scrapie bei Schafen und Ziegen stellte T. Alpert im Jahr 1967 erstmals die Vermutung auf, dass es sich um eine von Nukleinsäuren unabhängige Vermehrung handeln müsse. Gestützt wurde seine These durch gescheiterte Versuche, den Scrapie-Erreger durch Bestrahlung mit ultraviolettem und DNA-schädlichem Licht zu inaktivieren (Alpert et al. 1967).

Im gleichen Jahr zeigte J. S. Griffith erste theoretisch denkbare Modelle der DNA- bzw. RNA-freien Replikation eines Erregers auf. Eines dieser Modelle beschreibt die Fähigkeit von Proteinuntereinheiten, energetisch ungünstiger gefaltete Proteine in ihrer Konformation zu verändern. Mit dieser Theorie konnte erklärt werden, wie ein in eine Zelle eingedrungenes Protein zelleigene Proteine umfaltet und somit deren Funktion ändern kann (Griffith 1967).

Die Bezeichnung „Prion“ (*proteinaceous infectious particles*) erreichte letztlich eine klare Abgrenzung zu den bisher bekannten viralen und bakteriellen Erregern. Anlass dafür gab die Tatsache, dass verschiedenste Wege Proteine zu inaktivieren auch die Inaktivierung des Scrapie-Erregers zur Folge hatte. Das war der Beweis dafür, dass dieser Erreger zumindest einen Proteinanteil besitzen musste und der Anfang vieler Forschungen rund um dieses rätselhafte Protein (Prusiner 1982).

1.1.2 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE)

Hans Gerhard Creutzfeldt und Alfons Jakob beschrieben 1920 erstmals die Humane Spongiforme Enzephalopathie, bei der die graue Substanz des Großhirns schwammartige Löcher aufwies und zuvor als „Spastische Pseudosklerose“ bezeichnet wurde (Jakob 1921). Ungefähr vierzig Jahre später entdeckte der amerikanische Tierpathologe William Hadlow Ähnlichkeiten zwischen der Traberkrankheit Scrapie und der Erkrankung Kuru, deren Infektiosität 1966 durch C. Gajdusek nachgewiesen werden konnte (Hadlow 1959; Gajdusek et al. 1966).

Später stellte sich heraus, dass es sich bei den Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien um Prionenerkrankungen handelt, die genetisch, infektiös oder sporadisch sein können. Beim Menschen unterscheidet man vier verschiedene Typen: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, Gerstmann-Sträulsser-Scheinker-Syndrom (GSS), tödliche familiäre Schlaflosigkeit (Fatal Familial Insomnia, FFI) und Kuru. Bei Schafen zählen die Traberkrankheit (Scrapie) und beim Rind die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) ebenfalls zu den Prionenerkrankungen. Diese sind durch Neurodegeneration und Proteinaggregation gekennzeichnet. Die Latenz beträgt oft mehr als 30 Jahre, was die Durchführbarkeit prospektiver Studien stark einschränkt. Der symptomatische Krankheitsverlauf beginnt oft abrupt mit progressiver Demenz, Ataxie sowie weiteren neuronalen Ausfällen und führt, abhängig von der Unterform nach ca. 4-12 Monaten zum Tod (Knight und Will 2004).

Während weniger als 1% der Prionenerkrankungen durch iatrogene Übertragung verursacht werden, macht die sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit ca. 85% aller Prionenerkrankungen aus und hat eine Inzidenz von ein bis zwei Fällen pro eine Million Einwohner in Deutschland. In den 1990er Jahren wurde die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (vCJD) entdeckt, an der besonders jüngere Menschen durch den Verzehr von BSE-verseuchtem Rindfleisch erkrankten. Bis heute sind 213 Fälle von vCJD weltweit bekannt. Allein 172 davon wurden in Großbritannien registriert.

1.1.3 Strukturenvergleich von PrP^c und PrP^{sc}

PrP^c und das fehlgefaltete Prion-Protein PrP^{sc} besitzen die gleiche Primärstruktur (Stahl et al. 1993). Die beiden Konformationsisomere unterscheiden sich allerdings in ihrer Sekundärstruktur, was sich wiederum auf die Tertiärstruktur und somit auf die Funktion auswirkt. Mit der Fourier-Transformation-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) konnte Mitte der 1990er Jahre die Sekundärstruktur der Proteine ermittelt werden. Den Unterschied macht beim PrP^{sc} ein deutlich höherer Anteil an β -Faltblatt-Strukturen aus (Caughey et al. 1991; Pan et al. 1993). Daraus ergibt sich für PrP^{sc} eine schlechte Löslichkeit in nicht-ionischen Detergenzien und eine partielle Resistenz gegenüber Protease K. PrP^{sc} verfügt über ein geringeres Molekulargewicht und kann in zwei Phänotypen unterteilt werden (Parchi et al. 1999). Im Gegensatz zu PrP^c neigt PrP^{sc} zur Ausbildung neurotoxischer Aggregate (Ross und Poirier 2004). Welche genauen Me-

chanismen und Kofaktoren bei Prionenerkrankungen zur Entstehung von PrP^{Sc}-Aggregaten führen, wurde noch nicht eindeutig geklärt.

1.1.4 Die „Protein-only“-Hypothese

Bereits 1967 wurde vermutet, dass PrP^{Sc} in der Lage sei, physiologisches PrP^C umzufalten und somit selbst das infektiöse Agens sei (Griffith 1967). Diese Hypothese hat nach wie vor Bestand. Eine in diesem Zusammenhang wichtige Entdeckung ist, dass PrP^C-Knockout-Mäuse resistent gegenüber einer Infektion mit PrP^{Sc} sind (Büeler et al. 1993).

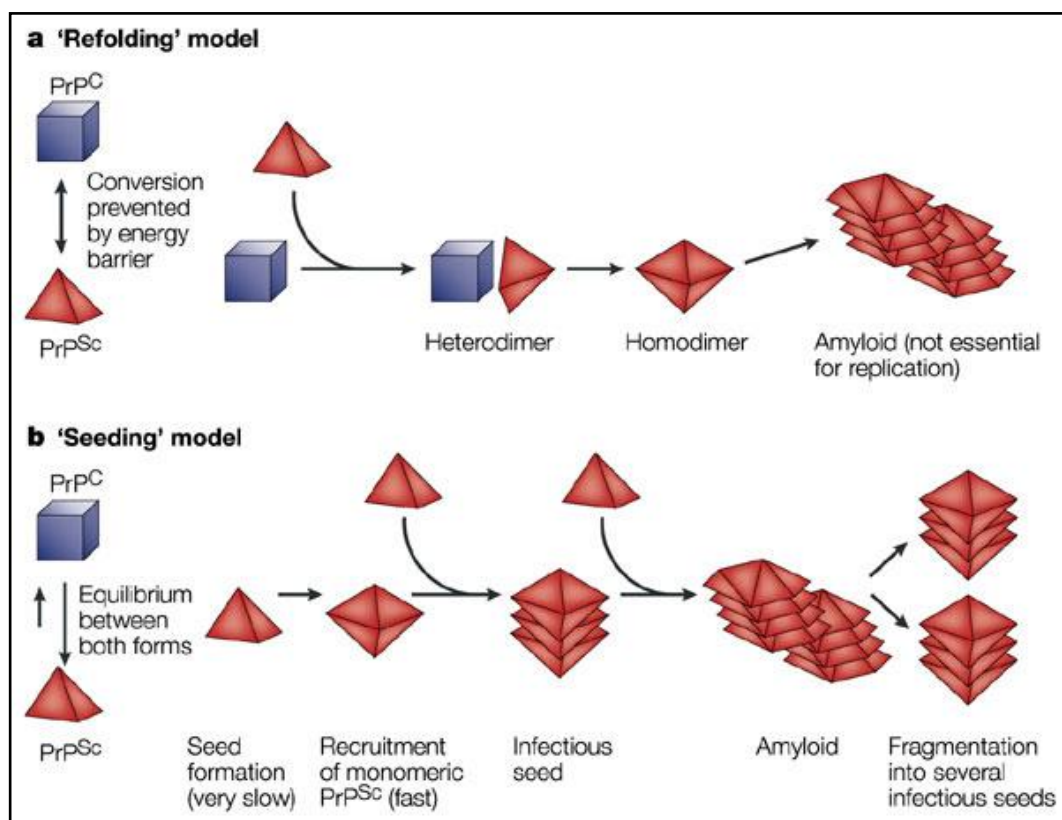


Abbildung 1: Umfaltungs- (a) und Keimbildungsmodell (b) (Aguzzi & Sigurdson, 2004, S. 730).

Dargestellt sind zwei Modelle, die den Umfaltungsprozess von PrP^C zu PrP^{Sc} auf unterschiedliche Weise beschreiben.

Die Proteinumfaltung und die Entstehung der PrP^{Sc}-Aggregate lassen sich anhand von zwei verschiedenen Modellen erklären. Es gibt das Umfaltungsmodell (Refolding) und das Keimbildungsmodell (Seeding). Das Umfaltungsmodell hat eine hohe Energie-

Barriere als Ausgangspunkt, die unter normalen Umständen die Umfaltung von endogenem PrP^c in PrP^{sc} verhindert. Erst exogen in den Organismus eingedrungenes PrP^{sc} soll durch mehrmaliges Entfalten und wieder Auffalten von endogenem PrP^c in der Lage sein, die benötigte Reaktionsenergie zu senken, sodass die Konformationsänderung von PrP^c zu PrP^{sc} resultiert (Prusiner et al. 1990). Begründer des Keimbildungsmodells sehen den Unterschied zwischen PrP^c und PrP^{sc} in der Quartärstruktur. Während PrP^c unter normalen Umständen mit PrP^{sc} in einem PrP^c-favorisierenden Gleichgewicht steht, kann die Verbindung von zwei PrP^{sc} zu dessen Stabilisierung führen. Dadurch gelingt dann die PrP^c-Konversion, was zu weiteren PrP^{sc}-Anlagerungen führt. Trotz der kontinuierlichen Forschung ist bis heute der genaue Mechanismus der PrP^{sc}-Vermehrung und der Entstehung von Amyloid-Aggregaten im Gehirn nicht verstanden. Seit über 50 Jahren ist es Kritikern der nukleinsäurefreien Vermehrung jedoch auch nicht gelungen, die „Protein-only“ Hypothese zu widerlegen.

1.2 Das zelluläre Prion-Protein (PrP^c)

1.2.1 Das PrP^c-Gen

Das zelluläre Prion-Protein (PrP^c) ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das in der Evolution hoch konserviert ist. Es wurden bereits bei Amphibien und Fischen cDNA-Abschnitte identifiziert, die dem Prion-Protein-Gen höher entwickelter Arten ähneln (Strumbo et al. 2001; Oidtmann et al. 2003). Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass das Prion-Protein wichtige physiologische Funktionen besitzt.

Das humane Prion-Protein-Gen (PRNP) befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 20. Es besteht bei Menschen und Hamstern aus zwei, bei Maus, Rind und Schaf aus drei Exons. Dabei codiert nur ein Exon für das Protein, sodass auch nur ein Ort des Genablesens (*open reading frame*) vorhanden ist (Makrinou et al. 2002; Lee et al. 1998; Choi et al. 2006). Die höchste PrP^c-Expression findet man beim Erwachsenen im Gehirn, wobei sich verschiedene Regionen und Zelltypen in der Rate unterscheiden. In Organen wie z. B. Milz, Knochenmark, Leber und Herz sind dagegen nur geringe Expressionen zu finden (Fournier et al. 1998; Horiuchi et al. 1995). Interessanterweise wurde keine TATA-Box zur Expressionsregulation identifiziert, weshalb diskutiert wird, ob PRNP zu den sogenannten *housekeeping*-Genen gehört. Der für diese Gene typische CG-reiche Abschnitt direkt am 5'-Ende des Transkriptionsstartes wurde

auch hier gefunden und stützt die These einer unregulierten Expression. Die potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und der Einfluss von chromatinen Strukturen sprechen jedoch für einen Regulationsmechanismus (Puckett et al. 1999; Cabral et al. 2002).

Betrachtet man die PRNP-Transkriptionsaktivität eines Individuums, so ist diese schon während der embryonalen Entwicklung vorhanden und erreicht, abhängig von der Spezies, postnatal schnell ein adultes Expressionsniveau (McKinley et al. 1987). In Mäusegehirnen konnte eine nahezu ubiquitäre Expression von PrP^c während der Embryogenese gemessen werden (Manson J. et al. 1992). Das PRNP-Gen scheint somit schon in der frühen Embryogenese eine entscheidende Rolle zu spielen. Neuere Ergebnisse konnten zeigen, dass PrP^c bei der Regulation und Differenzierung von Stammzellen mit verschiedenen Schlüsselgenen im pluripotenten Stadium interagiert (Miranda et al. 2011).

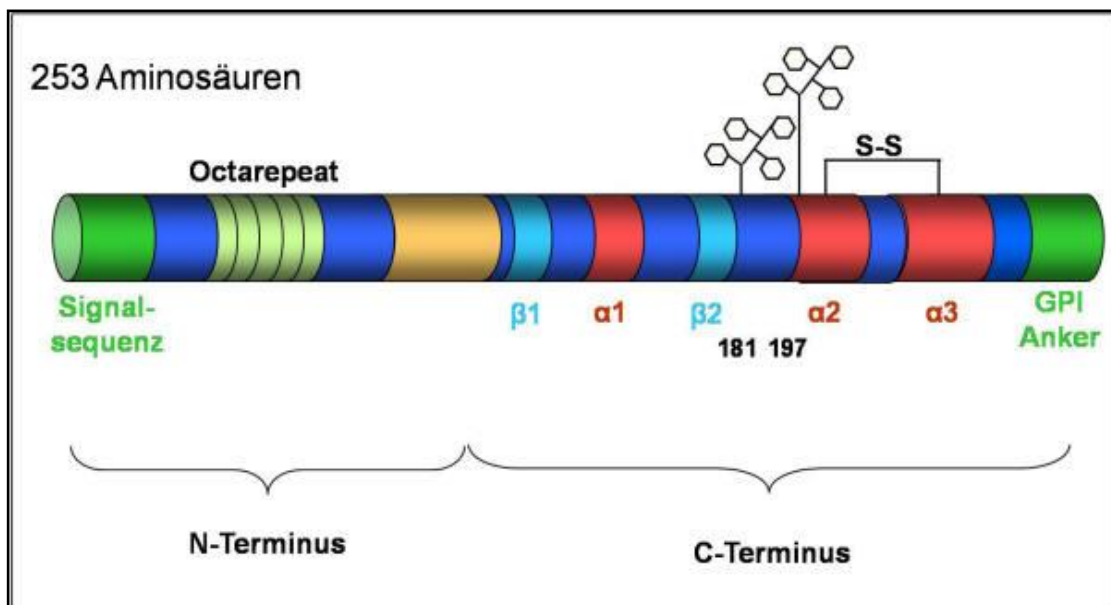


Abbildung 2: Struktur des humanen Prion-Proteins (Becker, 2005, S. 4)

1.2.2 Die Struktur von PrP^c

Die PrP^c-Primärstruktur ist 253 Aminosäuren lang. Während der posttranslationalen Modifikation werden die Aminosäuren 1-22 als Signalpeptid abgespalten und das Peptid 232-245 am C-terminalen Ende durch einen glykosyl-phosphatidylinositol-Anker

ersetzt, der das Protein an der Plasmamembran befestigt (Stahl et al. 1987). PrP^c kann an der Aminosäure Asparagin 180 und 196 Glykosylierungen aufweisen und in di-, mono-, und unglykosylierter Form vorkommen. Das Molekulargewicht liegt je nach Glykosylierungsart zwischen 27 kDa und 36 kDa.

Die Proteinstruktur von PrP^c wurde unter anderem mit Hilfe von Nuklearer Magnetresonanzspektroskopie (NMR) ermittelt. Dabei ist innerhalb verschiedener Spezies ein hoher Grad an Homologie zu sehen. Als sekundäre Strukturelemente besitzt PrP^c an seiner C-terminalen Domäne drei Alpha-Helices und ein zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt (Abb. 3). Dabei beinhalten die Helices die Aminosäuresequenzen 144-154, 173-194 und 200-228, wobei das Cystein 179 der zweiten Helix über eine Disulfidbrücke mit dem Cystein 214 der dritten Helix verbunden ist (Zahn et al. 2000).

Das β -Faltblatt enthält die Aminosäuresequenzen 128-131 sowie 161-164 und wird wie der große und sehr flexible N-terminale Proteinanteil (AS 29-124) als wichtige Struktur bei der Umwandlung in die infektiöse Proteinform diskutiert (Glockshuber, 1996; Donne et al., 1997). Die N-terminale Domäne besitzt vier Oktarepeats (Wiederholung der 8 Aminosäuren PHGGGWGQ) und ist in der Lage, Kupfer zu binden (Hornshaw et al. 1995). Da das infektiöse PrP^{sc} kein Kupfer binden kann, wird dieser Eigenschaft eine neuroprotektive Wirkung und Zellschutz vor oxidativem Stress zugeschrieben (Shaked et al. 2001; Mitteregger et al. 2007).

Die Struktur des PrP^{sc} konnte im Gegensatz zum physiologisch vorhandenen PrP^c bis heute nicht ermittelt werden, was größtenteils an der geringen Lösbarkeit dieses Proteins liegt.

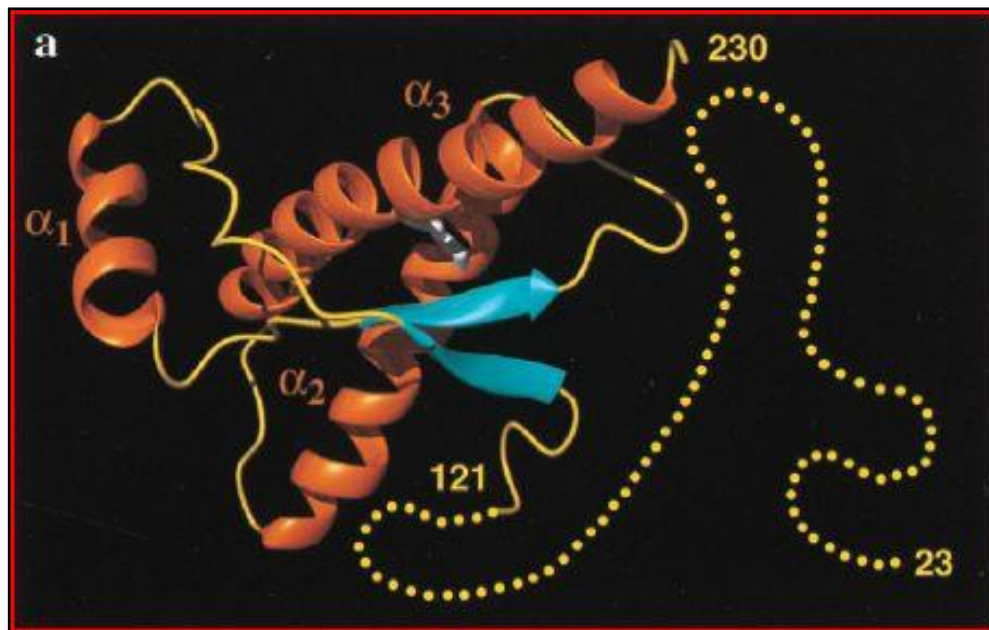


Abbildung 3: Dreidimensionales Modell des humanen Prion-Proteins, hPrP (23-230) (Zahn et al. 2000, S. 147). Die α -Helices sind orange, die β -Faltblätter blau, unreguläre Sekundärstruktur gelb und der flexible N-Terminus von Aminosäure 23-121 gelb gepunktet.

1.2.3 Der Zellzyklus von PrP^c

Wie bereits erwähnt, wird PrP^c zu einem großen Teil an der Zelloberfläche exprimiert, wo es durch einen Glykosylphosphatidyl-Inositol-Anker (GPI) befestigt ist. Zuvor wurde PrP^c in den verschiedenen Zellkompartimenten wie zum Beispiel dem endoplasmatischen Retikulum (ER) posttranslational modifiziert.

Als Erkennung dient ein N-terminales Signalpeptid (1-22), welches beim Erreichen des ER abgespalten wird. Hier formieren sich die Disulfidbrücken, das C-terminale Ende wird durch den GPI-Anker ersetzt und die möglichen Glykosylierungen an Asparagin vorgenommen (Haraguchi et al. 1989). Vom Golgi-Apparat wird PrP^c über Vesikel zur Plasmamembran transportiert und ein Großteil wird in sogenannten *lipid rafts*, Sphingolipid- und Cholesterin-reiche Abschnitte der Zellmembran exprimiert, die unter anderem eine relevante Rolle bei der Signalweiterleitung spielen (Taraboulos et al. 1992; Sarnataro et al. 2004).

Im weiteren Verlauf wird das membranständige PrP^c via Endozytose wieder in die Zelle aufgenommen. In verschiedenen Studien wurde dieser Prozess 30-60 Minuten nach Erreichen der Zelloberfläche beobachtet (Shyng et al. 1993; Harris 2003). Der genaue Vorgang der Endozytose sowie deren Relevanz sind noch nicht vollständig

verstanden. Sicher scheint aber zu sein, dass hohe Konzentrationen extrazellulären Kupfers die Endozytose stimulieren (Brown et al. 2003). Ob das Kupfer zu einer Destabilisierung von PrP^c und *lipid raft* führt oder eine PrP^c-Bewegung in *non-raft*-Regionen verursacht, um somit eine Endozytose durch klathrinhaltige Vesikel zu ermöglichen, ist nicht geklärt (Taylor et al. 2005; Prado et al. 2004).

1.2.4 Physiologische Aufgaben von PrP^c

1.2.4.1 Allgemeine physiologische Funktionen von PrP^c

Die genauen physiologischen Aufgaben des PrP^c im Organismus sind noch nicht bekannt. Das molekulare Klonen von Maus-cDNA und die Möglichkeit, das Prnp-Gen in Mäusen auszuschalten, sind deshalb wichtige Voraussetzungen, um die Funktion von PrP^c in der Zelle untersuchen zu können (Locht et al. 1986). Im Jahre 1992 wurde die erste PrP^c-Knockout-Maus gezüchtet. Der Vergleich mit Wildtypmäusen ergab keine offensichtlichen Unterschiede bezüglich der Anatomie der Gehirne, viszeraler Organe oder Muskeln. Auch das Lernvermögen und das Verhalten der PrP^c-Null-Mäuse waren auf den ersten Blick sehr ähnlich (Bueler et al. 1992). Ein anderer PrP^c-Null-Mäusestamm zeigte gleiche Resultate (Manson et al. 1994). Aufgrund dieser Tatsache muss davon ausgegangen werden, dass PrP^c entweder von geringer Bedeutung für eine normale Entwicklung ist oder dass das Fehlen durch ein anderes Protein kompensiert werden kann.

PrP^c ist in viele Bereiche der zellulären Homöostase wie oxidativen Stress und Apoptose involviert (Ramljak S. et al. 2008). PrP^c besitzt auch eine Reihe identifizierter Interaktionspartner, was eine vielfältige Funktionseigenschaft vermuten lässt. Beispiele sind Bcl-2 (Regulation des programmierten Zelltodes), das Hitzeschock Protein 60 kD (Zellschutz) oder Laminin (wichtiger Bestandteil der Basalmembran) (Kurschner und Morgan 1995; Edenhofer et al. 1996; Graner et al. 2000). Eine höhere Resistenz gegenüber Apoptose konnte bei Prnp-transfizierten knockout Zellen gezeigt werden, was die Zellprotektivität und Schutz bei Zellstress untermauert (Kuwahara et al. 1999). In einer weiteren Studie wurde eine Hochregulation von PrP^c nach fokaler zerebellärer Ischämie beobachtet (Weise et al. 2004). Auch konnte überexprimiertes PrP^c das Infarktausmaß bei Ratten reduzieren sowie die neuronale Signalübertragung verbessern (Shyu et al. 2005).

Auch antioxidative Enzyme scheinen einer PrP^c-abhängigen Aktivierung zu unterliegen. Die Menge an Cu²⁺/Zn²⁺ Superoxid-Dismutase und Glutathionreduktase steigt abhängig von der PrP-Produktion (Rachidi et al. 2003). Da PrP^c in der Lage ist, Kupfer zu binden und freies Kupfer im Körper einen Oxidanten darstellt, ist in diesem Mechanismus allein eine zellprotektive Wirkung naheliegend (Brown et al. 1997). Dabei scheint auch die Anzahl an Kupferbindungen mit der antioxidativen Aktivität zu korrelieren (Brown et al. 2001). Ein weiterer Anhaltspunkt für die zellprotektive Eigenschaft von PrP^c ist, dass in Zellkulturen von PrP-Knockout-Mäusen erniedrigte Mengen verschiedener antioxidativer Substanzen ermittelt werden konnten, was eine höhere Sensitivität gegenüber Zellschäden zur Folge hatte (Brown et al. 2002).

Des Weiteren aktiviert PrP^c die Fyn-Tyrosinkinase, die einen Effekt auf Neurone und deren Wachstum hat (Mouillet-Richard et al. 2000). Auch die Aktivität der cAMP/Proteinkinase A wird von PrP^c getriggert, was einen Zellschutz von neuronalen Zellen mit sich bringt (Chiarini et al. 2002). Neben den genannten Enzymen sind in den letzten Jahren viele weitere Interaktionspartner entdeckt worden. Einzelne Reaktionswege verlaufen parallel in der Zelle, sodass regelrechte Netzwerke an Reaktionsvorgängen entstehen (Brini et al. 2005; de Silva und Stumpf 2005).

1.2.4.2 Die Funktion von PrP^c im Nervensystem

Wie bereits erwähnt, sind in der Entwicklung von PrP^c-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen keine Unterschiede zu erkennen. Verfolgt man das Verhalten dieser Mäuse aber weiter, so kann im adulten Alter eine schwere Ataxie und die Degeneration von Purkinje-Zellen bei Fehlen von PrP^c beobachtet werden. Entdeckt wurde dieses neuronale Defizit bei der Knockout-Linie Prnp^{-/-} Nagasaki (Sakaguchi et al. 1996). Kurze Zeit später konnte zusätzlich auch eine Demyelinisierung peripherer Nerven bei zwei voneinander unabhängigen Prnp^{-/-}-Mäusestämmen festgestellt werden (Nishida et al. 1999). Dass die neuronalen Probleme wahrscheinlich durch das fehlende PrP^c entstanden sind, wurde insofern ermittelt, als durch das Einbringen eines Wildtyp Prion Protein-Gens in das Genom der Knockout-Mäuse sowohl die Demyelinisierung als auch die Degeneration der Purkinje-Zellen gestoppt werden konnte. Weitere Untersuchungen aber konnten beweisen, dass nicht das Fehlen von PrP^c, sondern hohe Mengen des Proteins Doppel in den Knockout-Linien für die Ataxie und den neuronalen Verlust verantwortlich sind. Bei diesem Protein handelt es sich um ein N-glykosyliertes Protein mit GPI-Anker, welches zu 25% mit der Aminosäuresequenz von PrP^c überein-

stimmt (Silvermann et al. 2000, Moore et al. 1999). Nichtsdestotrotz verbessert die Wiedereinführung des PrP-Gens die neuronale Situation, sodass die verwandten Proteine Doppel und PrP^c entgegengesetzte Wirkungen zu haben scheinen (Behrens et al. 2002). Ob das Protein Doppel auch bei Prionenerkrankungen eine Rolle spielt, ist unklar.

Auch andere Funktionen des Nervensystems werden mit PrP^c in Verbindung gebracht. So schreiben ihm einige Studien eine wichtige Rolle im Tag/Nacht Rhythmus zu. Ein Anhaltspunkt ist dabei die FFI, eine Prionenerkrankung mit einer Punktmutation im Prnp-Gen an Codon 178, die zum Einbau von Asparagin an Stelle von Asparaginsäure führt (Medori et al. 1992). Ein ähnlich gestörter Tag-Nacht-Rhythmus wie bei der FFI mit deutlich pathologischen EEG-Veränderungen im Schlaf wurde bei Patienten mit sporadischer Creutzfeldt-Jakob Erkrankung beobachtet (Landolt et al. 2006).

Letztlich zeigten auch Prnp^{0/0}-Mäuse einen gestörten Tag-Nacht-Rhythmus, sodass eine wichtige Funktion von PrP^c in diesem Bereich zu vermuten ist (Tobler et al. 1996).

1.3 Rolle von PrP^c bei der Alzheimer-Demenz (AD)

Ob PrP^c einen Einfluss auf die Entstehung der AD hat, ist nicht ausreichend untersucht. Es gibt eine Studie, die eine erhöhte Amyloid-Plaque-Bildung bei PrP^c-Überexpression zeigen konnte (Schwarze-Eiker et al., 2005). Im Gegensatz dazu wird in der Publikation von Parkin et al. (2007) von einer signifikant höheren Menge an Amyloid β bei PrP^c-Null-Mäusen berichtet. Auf genetischer Ebene konnte in einer Studie mit 482 Patienten, die an Alzheimer erkrankt waren, und zwei unabhängigen Kontrollgruppen ein Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus an Position 129 im Prnp-Gen und dem Einsetzen der Alzheimer-Erkrankung festgestellt werden. In diesem Fall erhöhte ein homozygotes Methionin (MM) das Risiko, in jüngeren Jahren an AD zu erkranken (Riemenschneider et al. 2004). Auch eine Korrelation zwischen der Liquorkonzentration von PrP^c und der AD wurde bereits beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass die PrP^c-Konzentrationen proportional zum Schweregrad der AD erniedrigt waren (Meyne 2008). Trotz der genannten Arbeiten ist die Rolle von PrP^c bei AD noch nicht ausreichend geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

1.4 Die Rolle von PrPc beim amyloiden Spaltweg und Tau-Metabolismus

1.4.1 Das Amyloide Vorläufer-Protein APP und dessen Spaltwege

Das Amyloide Vorläufer-Protein (APP) ist ein auf Chromosom 21 lokalisiertes membranständiges Protein mit 8 Isoformen. Im zentralen Nervensystem findet man vornehmlich APP mit 695 Aminosäuren, während andere Formen ubiquitär exprimiert werden (Bayer et al. 1999). Einige Studien konnten bereits positive Effekte von APP auf das Neuronenwachstum und einen Einfluss in Bereichen des Langzeitgedächtnisses und des zirkadianen Rhythmus beobachten (Ring et al. 2007; Oh et al. 2009). Bei APP-Knockout-Mäusen konnten zwar leichte kognitive Einschränkungen beobachtet werden, generell zeigte sich aber ein kaum veränderter Phänotyp sowie eine unveränderte Fertilität (Zheng et al. 1995; Dawson et al. 1999).

APP unterliegt einem hohen Metabolismus und wird in verschiedene Fragmente gespalten, die diverse Funktionen besitzen. Der Einfluss von APP ist deshalb möglicherweise sehr komplex und abhängig von den jeweiligen Konzentrationen der Spaltprodukte.

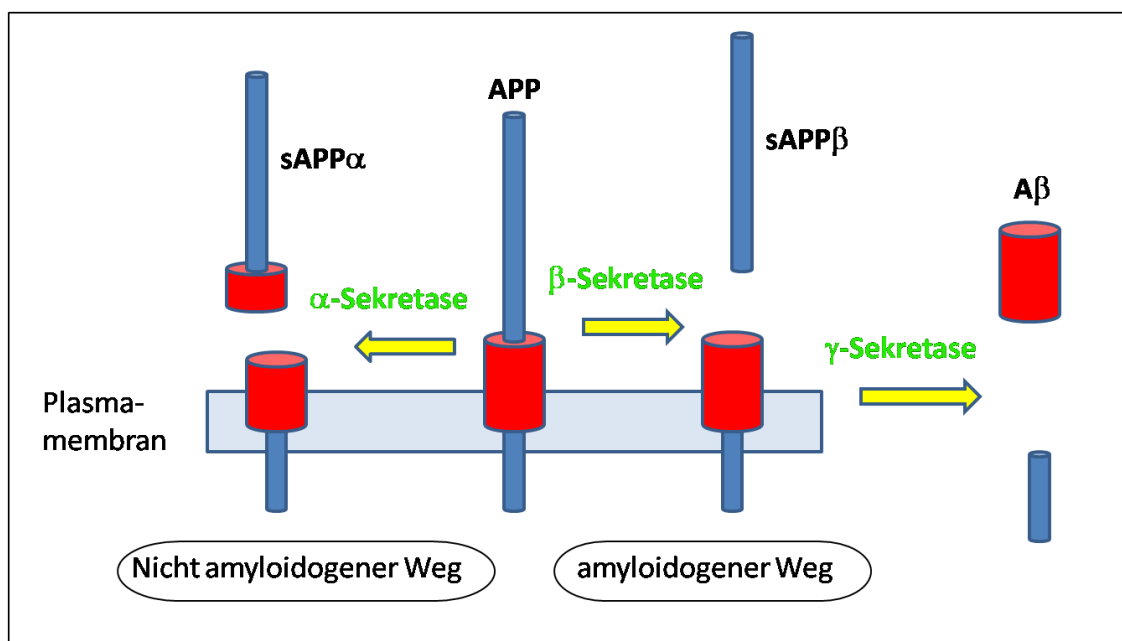


Abbildung 4: Schematische Darstellung der APP-Prozessierung (eigene Abbildung nach Kellet und Hooper, 2009). APP wird vorerst durch die α - oder β -Sekretase gespalten, sodass sAPP α bzw. sAPP β entsteht. Durch die γ -Sekretase entsteht nach Abspaltung von sAPP β das A β .

Ein Protein der APP-Spaltung ist die β -Sekretase mit dem Synonym BACE (für *beta-site APP-cleaving enzyme*), ein 501 Aminosäuren langes Enzym der Pepsin-Familie (Hussain et al. 1999). Die Spaltung von APP durch BACE gehört zum amyloidogenen Weg und ist der erste Schritt bei der Entstehung von A β . Dass BACE APP spaltet, konnte in einigen Studien gezeigt werden (Vassar et al. 1999; Cai et al. 2001). In den meisten Körperzellen ist BACE-Aktivität vorhanden, wobei die höchste Aktivität in Nervengewebe und neuronalen Zelllinien gemessen wurde (Haass et al. 1992; Seubert et al. 1993). Die Spaltprodukte von BACE sind sAPP β und C99, von dem mit Hilfe der γ -Sekretase Amyloid β (A β) abgespalten wird. Die Bedeutung von BACE wird kontrovers diskutiert. Bei ersten Untersuchungen von BACE-Knockout-Mäusen, mit dem Ziel, die Entstehung von A β und somit auch von amyloiden Plaques zu verhindern, wurden keine Verhaltensänderungen festgestellt (Ohno et al. 2004).

Das Fehlen von BACE zeigte bei Mäusen mit Morbus Alzheimer sogar eine Verbesserung der Neuronenfunktion und des Gedächtnisses sowie eine deutliche Reduktion der A β -40/-42 Level (Luo et al. 2001; Ohno et al. 2007). Auch die Reduktion der BACE-Expression durch siRNA zeigte eine geringere Amyloid-Expression und weniger neurodegenerative Defizite bei transgenen Mäusen (Singer et al. 2005). All diese Ergebnisse machen BACE oder Proteine, die BACE regulieren, als therapeutisches Target bei Alzheimer interessant. Auch eine höhere Expression und Aktivität von BACE in den von Alzheimer betroffenen Hirnregionen unterstützen diesen Ansatz (Johnston et al. 2005). Es zeigte sich jedoch in anderen Untersuchungen, dass bei BACE-Knockout-Mäusen deutliche kognitive Einschränkungen zu beobachten waren und eine Funktion von BACE beim hippokampalen Lernprozess vermutet wird (Liard et al. 2005). Das Fehlen von BACE führte in einer Studie sogar zum Tod einiger Mäuse in der ersten Woche und deutlichen Verhaltensänderungen der überlebenden Mäuse (Dominguez et al. 2005).

Bei sAPP α handelt es sich um ein Fragment von APP, das durch die α -Sekretase abgespalten wird und somit zum nicht amyloidogenen Spaltweg gehört. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sAPP α eine wichtige Rolle bei neuronalen Funktionen und der frühen ZNS-Entwicklung besitzt (Furukawa et al. 1996; Ohsawa et al. 1999). Die Spaltung von APP durch die α -Sekretase verhindert die Entstehung von A β . In diesem Zusammenhang konnten deutlich erniedrigte Level an sAPP α bei Alzheimerpatienten

detektiert und ein pathologischer Metabolismus von APP bei Morbus Alzheimer gezeigt werden (Colciaghi et al. 2002).

Inwieweit PrP^c einen Einfluss auf die APP Spaltung hat, ist noch nicht ausreichend verstanden. In einem Modell mit Alzheimer-Mäusen konnte bereits eine Abnahme von A β durch PrP^c beobachtet werden (Parkin et al. 2007). Auch die Rolle des Methionin-/Valin (M/V)- Polymorphismus an Codon 129 des PrP^c-Gens bei der Entstehung von Morbus Alzheimer wurde bereits untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass Patienten unter 70 Jahren mit homozygotem Methionin (MM) ein signifikant höheres Risiko haben, an Morbus Alzheimer zu erkranken (Riemschneider et al. 2004). In einer weiteren Arbeit wird eine Bindungsmöglichkeit für amyloide Oligomere an einer zentralen Stelle von PrP^c bei Aminosäure 95-110 beschrieben (Laurén et al. 2009). PrP^c agiert somit womöglich als Rezeptor für A β . Es konnte auch ein Einfluss von A β -Oligomeren auf die Expression von PrP^c an der Zelloberfläche gezeigt werden, was die Hypothese einer Interaktion von A β und PrP^c stützt (Caetano et al. 2011). Insgesamt deuten die Ergebnisse auf einen Einfluss von PrP^c bei der Entstehung von Morbus Alzheimer hin. Ob dieser Einfluss einen krankheitsfördernden oder protektiven Charakter hat ist noch umstritten.

1.4.2 Das Tau-Protein bei der AD

Das Tau-Protein ist ein Mikrotubulus-assoziiertes Protein (MAP), welches als hitzestabiler Protein-Faktor die Polymerisation von α - und β -Tubuli zu Mikrotubuli fördert (Weingarten et al. 1975). Es wird vornehmlich in Nervenzellen exprimiert und ist überwiegend im Axon lokalisiert (Binder et al. 1985). Die Funktion von Tau wird durch posttranslationale Modifikation gesteuert und besteht in der Stabilisation der Zellform und dem zielgerichteten axonalen Transport verschiedener Moleküle. Dabei spielt die posttranslationale Phosphorylierung der Tau Proteine bei Morbus Alzheimer eine besondere Rolle, die in Alzheimer-Gehirnen besonders stark ausgeprägt ist und als Folge die Bildung neurofibrillärer Tangles hat, die das mikrotubuläre Bindungsvermögen herabsetzen (Gustke et al. 1992).

Die Rolle von PrP^c im Tau-Metabolismus wird noch nicht ausreichend verstanden. Erste Studien deuten jedoch auf eine Interaktion der beiden Proteine hin (Wang et al. 2010; Canu et al. 2011).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die physiologische Funktion von PrP^c ist noch nicht ausreichend geklärt. Die bisherigen Erkenntnisse lassen einen Einfluss auf zellmetabolische Abläufe vermuten, die bei der Alzheimer Demenz (AD) eine Rolle spielen. In den meisten Studien wurde dabei bisher mit genetisch veränderten Alzheimer-Mäusen gearbeitet. Im Gegensatz dazu beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Funktion von PrP^c unter physiologischen Bedingungen.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von PrP^c auf die Expression der für die AD-Pathogenese relevanten Proteine und deren Metabolismus unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Im Vordergrund standen dabei speziell das Amyloide Precursor-Protein (APP), sAPP, das Enzym BACE, die Spaltprodukte A β -40, A β -42, sAPP β und sAPP α .

Dabei sollten mögliche Interaktionen von PrP^c und Auswirkungen auf die Konzentrationen der Spaltprodukte untersucht werden. Zusätzlich sollte der Einfluss von PrP^c auf Tau überprüft werden. Für diese Untersuchungen dienten neben Tau die phosphorylierten Tau-Formen S 396, Thr 181, Ser 199 und Thr 231.

Um eine möglichst hohe Aussagekraft der Ergebnisse zu erlangen, wurden die Untersuchungen sowohl an einem Zell- als auch an einem Mausmodell durchgeführt.

2. Material und Methoden

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit den folgenden Materialien und Methoden durchgeführt und jeweils mindestens drei Mal wiederholt.

2.1 Chemikalien

BSA (bovine serum albumine)	Roth (Karlsruhe)
Dulbecco's modified Eagle's medium	Applichem (Darmstadt)
Fetales Bovines Serum	PAA (Pasching)
Glycerol	Sigma-Aldrich (München)
L-Glutamin	Biochrom (Berlin)
Lipofectamin	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
Luminol	Sigma-Aldrich (München)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
OptiMEM	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
p-Coumarsäure	Sigma-Aldrich (München)
PBS Dulbecco	Biochrom (Berlin)
Penicillin/Streptomycin	PAA (Pasching)
Roti®Load	Roth (Karlsruhe)
SDS	BioRad (München)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Tris/HCl	Roth (Karlsruhe)
Trypsin/EDTA Solution	Biochrom (Berlin)
Tween-20	Merck (Darmstadt)
Mowiol 4-88	Roth (Karlsruhe)

2.1.1 Kits

Kits für die Plasmidpräparation

High Pure Plasmid isolation Kit Roche Diagnostics (Mannheim)

QIAGEN Plasmid Kit (Midi) Qiagen (Hilden)

Deglykosylierungskit Calbiochem, Merck (Darmstadt)

Elisa-Kits

sAPP β -Kit IBL No. 27732 (Hamburg)

A β 1-40-Kit IBL No. 27714 (Hamburg)

A β 1-42-Kit IBL No. 27712 (Hamburg)

sAPP α -Kit IBL No. 27734 (Hamburg)

ECLIA-Kit

Tau- und p-Tau-Kit Meso Scale DiscoveryTM

2.1.2 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden für Western-Blots und immunhistochemische Färbung verwendet.

2.1.2.1 Primäre Antikörper

<u>Name</u>	<u>Spezifität</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Anbieter</u>
PrP-Antikörper			
12F10	Maus, Monoklonal	1:1000	SPI-Bio, Montigny Le Bretonneux, Paris (Frankreich)
SAF32	Maus, Monoklonal	1:500	SPI-Bio
APP-Antikörper			
22C11	Maus, Monoklonal	1:1000	Millipore, Schwalbach
BACE-Antikörper			
	Kaninchen, polykl.	1:1000	Acris, Herford
Anti-Tau	Kaninchen, polykl.	1:1000	Abcam, Cambridge

Anti-p-Tau			
Anti-p-Tau 181	Kaninchen, polykl.	1:1000	Abcam, Cambridge
Anti-p-Tau 199	Kaninchen, polykl.	1:1000	Roboscreen, Leipzig
Anti-p-Tau S396	Kaninchen, polykl.	1:1000	Acris, Herford
β -Aktin	Maus, monoklonal	1:5000	Abcam

Tabelle 1: Primäre Antikörper

2.1.2.2 Sekundäre Antikörper

<u>Name</u>	<u>Spezifität</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Anbieter</u>
Anti-Maus-IgG	Maus	1:10000	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK No. 115 035-062
Anti-Rabbit-IgG	Kaninchen	1:7500	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK No. 111 035-144

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper

2.1.3 Zellen

HEK (Human Embryonal Kidney) 293-Zellen	Stratagene, La Jolla, USA
SH-SY5Y-Zellen	Subklon einer Neuroblastoma-Zelllinie

2.1.4 Plasmidvermehrung

Plasmid	pCMS-EGFP (BD Biosciences, Palo Alto, USA)
Bakterienstamm	5DH α E. coli
LB – Medium	Applichem (Darmstadt)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (München)

Kühl- und Gefrierschränke	-20°C -80°C	Liebherr Economy Sanyo Biomedical (Bad Nenndorf)
Wasserbad		Köttermann
Ultraschallbad	310/H Transsonic	Elma (Pforzheim)
Heater	Thermomixer comfort	Eppendorf
Gelelektrophorese	Power Pac 3000	Bio-Rad (München)
Semi-Dry Transferzelle	Trans-Blot SD	Bio-Rad (München)
Blot-Maschine	Power Pac 200	Bio-Rad (München)
Entwicklungsgerät	SAX 101A	Kunika (International)
Schüttler	HS 501 digital	Schütt Labortechnik (Göt- tingen)
Mikroskop	Olympus BX51	Olympus (Hamburg)
Waage	CP 3202P	Satorius (Göttingen)
Rührer	IKAMAG RCT	IKA Labortechnik (Stau- fen)
Hybridizationoven/shaker		Life Science (Amersham, England)
ELISA-Platten Lesegerät	1420 Victor	Wallac (Turku, Finnland)
Vortexer	Vortex mixer SA8	Stuard (England)

Scanner	CanoScan 8400F	Canon (International)
Microwelle	Powerwave	Brother
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann (Eberstadt)

Tabelle 3: Instrumente

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Pipetten (25, 10, 5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen (10, 100, 1000 µl)	
Zellkulturflaschen	
6-Well Platten	
24-Well Platten	Rettberg (Göttingen)
Skalpell	
Eppendorf Cups	
Nitrozellulosemembran Chemiluminescence Entwicklungsfilm	GE Healthcare (International)

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation der elektrokompententen *E. coli*-Stämme mit der Plasmid-DNA

Verwendete Lösungen

LB-Medium:

2,5 g LB-Medium / 100 ml ddH₂O

LB-Agar-Platten mit Ampicillin (100µg/ml):

Es wurden 6g LB-Agar in 150 ml dd H₂O bei 100 °C gelöst und 30 Minuten bei 65-80 °C inkubiert. Anschließend wurde die bis 50°C abgekühlte Lösung mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzt.

Der bei Raumtemperatur polymerisierte Agar konnte nun für max. 2 Wochen bei 4 °C gelagert werden.

2.2.1.1 Plasmide

Das in dieser Arbeit transfizierte Plasmid beinhaltet einen pCMS-EGFP-Vektor, in den das PRNP Gen eingebaut wurde. Durch die Transfektion der HEK-293- und SH-SY5Y- Zellen mit diesem Vektor war eine transiente kurzzeitige Überexpression von PrP^c in der Zelle zu erreichen.

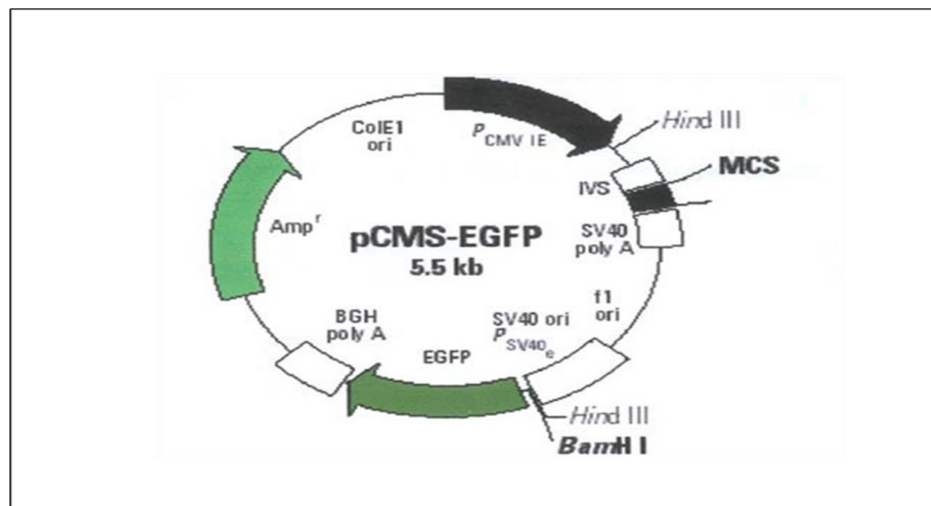


Abbildung 5: Schematische Darstellung des pMCS-EGFP-Vektors (Ramljak, 2008 S. 34).

2.2.1.2 Transformation

Das Verfahren hat seinen Ursprung in der Beobachtung, dass Calciumchlorid die Aufnahme von λ-DNA von Bakterien fördert (Mandel und Higa 1970). Die Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA gelang Cohen das erste Mal 1972 (Cohen et al. 1972).

2.2.1.3 Transformation der kompetenten E. coli

Vorerst wurden 0,5 µg Vektor-DNA zu 50 µl DH10B-kompetenten Zellen gegeben und in gekühlte (5 Minuten in Eis) Elektroküvetten transferiert. Nach zweiminütiger Eis-Inkubation wurde nun mit Hilfe eines Elektroimpulses die Plasmid-DNA in die Bakterien transformiert.

Anschließend wurde zu den Bakterien 1 ml vorgewärmtes LB-Medium hinzugefügt und bei 37 °C für 45 Minuten im Wasserbad leicht geschüttelt.

Nach dem Verdünnen von 10 µl dieser Kultur in 1 ml LB-Medium wurden schließlich 50 µl der entstandenen Bakterienlösung auf die LB/Ampicillin-Agar Platten pipettiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die über Nacht gewachsenen transformierten E. coli-Kolonien wurden jeweils in 100 ml LB Medium gelöst. Nach ca. 16 Stunden schütteln bei 37 °C folgte die Plasmidisolierung.

2.2.1.4 Vermehren und Aufbewahren der E. coli-Stämme

Zur Vermehrung von E. coli wurden diese über Nacht in LB-Medium bei 37° C in einem Schüttler geschwenkt, um ein optimales Wachstum zu erreichen. Das LB-Medium wurde vorher mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzt um Bakterien, die eine Ampicillinresistenz besitzen zu selektieren.

Anschließend wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm mit Hilfe eines Spektrometers gemessen, wobei das LB-Medium als Referenz diente.

Zur Aufbewahrung der E. coli-Stämme wurden 900 µl E. coli mit 100 µl Glycerol bei -80 °C eingefroren.

2.2.2 Gewinnung der Plasmid-DNA

2.2.2.1 Mini-Plasmidpräparation

Ziel dieser Methode ist es die Plasmid-DNA für die Transfektion aus den transformierten E. coli-Bakterien zu isolieren.

Um dies zu erreichen, wurden die über Nacht bei 37°C im Schüttler gewachsenen E. coli-Bakterien nach Erreichen einer optischen Dichte von 1,5-5,0 pro ml bei 600 nm zentrifugiert (5 Minuten bei 6000 x g) und das Bakteriensediment mit 250 µl RNasehaltigem Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) versetzt.

Nach Zugabe von 250 µl eines zweiten Puffers (0,2 M NaOH, 1% SDS) wurde die Lysereaktion nach 5 Minuten durch 350 µl eiskalten Binding Buffer neutralisiert.

Der Überstand wurde nach vorangegangener Zentrifugation (10 Minuten 13 000 x g) in eine Filtersäule überführt und eine Minute in die Zentrifuge (13 000 x g) gegeben. Dann wurde vor einer weiteren Minute in der Zentrifuge mit 700 µl Waschpuffer die DNA gesäubert. Um Reste des Waschpuffers zu vermeiden, wurde ein weiteres Mal eine Minute zentrifugiert.

Letztlich sammelte sich die Plasmid DNA mit Hilfe von 100 µl Auswaschpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) während einer Minute Zentrifugation in einem Eppendorf-Gefäß und konnte bei -20 ° C eingefroren werden.

2.2.2.2 Midi-Plasmidpräparation

Bei der Gewinnung größerer Plasmidmengen wurden 25 ml der über Nacht in LB-Medium gewachsenen E. coli Bakterien mit der optischen Dichte von 1,5-5,0 bei 6000 x g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde anschließend in 4 ml Resuspensionspuffer (50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) gelöst. Nach Zugabe von 4 ml Lysepuffer (200 mM NaOH, 1% SDS) wurde die Lysereaktion nach 5 Minuten durch den Neutralisationspuffer (3,0 M Kalziumacetat) gestoppt und 15 Minuten auf Eis gelagert.

Im nächsten Schritt wurde das Lysat für 30 Minuten bei 20 000 x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend der plasmidreiche Überstand abgenommen. Dieser wurde erneut 15 Minuten bei 20 000 x g und 4 °C zentrifugiert, um letzte Zellpartikel vom Überstand zu entfernen. Danach wurde der DNA-Filter mit 4 ml Äquilibrationpuffer (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15 % Isopropanol; 0,15% Triton® X-100) vorbereitet und anschließend der Überstand filtriert. Der DNA enthaltende Filter wurde noch zweimal mit 10 ml Waschpuffer (1,0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15 % Isopropanol) gewaschen, bevor im nächsten Schritt durch den Auswaschpuffer (1,25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8,5; 15 % Isopropanol) die DNA aus dem Filter isoliert wurde. Die DNA wurde nun mit Isopropanol präzipitiert und bei 15 000 x g und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert.

Das hierbei entstandene Pellet wurde vom Überstand entfernt und mit 2 ml Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 15 000 x g für 10 Minuten wurde vorsichtig der Überstand verworfen und das Pellet für ca. 10 Minuten luftgetrocknet. Im

letzten Schritt wurde dann das Pellet in ca. 300 µl Puffer (Tris.Cl, pH 8,5) gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Transfektion der Zelllinien

Verwendete Lösungen

Transfektionsmedium:

98 % OptiMEM

2 % fetales bovines Serum

Zur Transfektion der Zellen wurden diese beim Splitten in 6-Well-Platten ausgesät. Bei einer Zelldichte von ca. einer Million/Well wurde das Medium (2 ml/Well) entfernt und nach einmaligem Waschen mit PBS durch vorgewärmtes Transfektionsmedium ersetzt. Dann wurden jeweils 250 µl vorgewärmtes OptiMEM mit 8 µl Plasmid-DNA und 5 µl Lipofectamin versetzt und nach fünf Minuten vermenget. Diese 500 µl wurden dann nach 20 Minuten Inkubation auf das Well gegeben. Nach ca. 7 Stunden im Brutschrank -oder über Nacht- wurde das Transfektionsmedium wieder durch normales Medium ersetzt und die transfizierten Zellen bis zum Zeitpunkt der Weiterverarbeitung im Brutschrank kultiviert.

2.3 Zellbiologische Methoden

Alle im folgenden Text beschriebenen Vorgehensweisen wurden stets unter sterilen Bedingungen und mit den Zellpassagen 5-25 durchgeführt.

Die verwendeten Zelllinien wuchsen einschichtig in 175 cm² Zellkulturflaschen mit 13 mL des jeweiligen Mediums und wurden in H₂O-gesättigter Umgebung bei 5% CO₂, 98 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Das Wachstumsverhalten der Zellen wurde täglich mikroskopisch kontrolliert, wobei auf die Morphologie der Zelle, mögliche Kontaminationen, sowie auf die Gesamtkonfluenz geachtet wurde. Alle 2 Tage wurde das Nährmedium gewechselt und bei einer Zelldichte von 70 % wurden die Zellen im Verhältnis 1/5 gesplittet.

2.3.1 HEK 293-Zellen

Die HEK (human embryonal kidney) 293-Zellen sind das Transformationsprodukt von humanen embryonalen Nierenzellen und Teilen der DNA des Adenovirus 5.

HEK 293-Zellen sind gut für die Plasmidtransfektion geeignet und vergleichsweise einfach in der Handhabung.

2.3.1.1 Kultivierung von HEK 293-Zellen

Verwendete Lösung

Medium

Dublecco's modified Eagle medium

10 % Fetales bovines Serum

2 % Penicillin/Streptomycin

Die HEK 293-Zellen wurden nach dem Auftauen zentrifugiert (5 Minuten, 600 x g) und der Überstand durch frisches Medium (DMEM + 10 % FBS u. 2 % PS) ersetzt. Die Zellen wurden anschließend zusammen mit 20 ml Medium in eine Kulturflasche (175 cm²) überführt und im Brutschrank kultiviert.

2.3.1.2 Splitten von HEK 293-Zellen

Alle 3-5 Tage wurden die Zellen nach Entfernung des alten Mediums mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsinlösung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA) versehen. Nach zweiminütiger Inkubation mit Trypsinlösung im Brutschrank wurden die abgelösten Zellen zusammen mit 7 ml vorgewärmten Medium in die Zentrifuge (5 Minuten, 600 x g) gegeben.

Anschließend wurde der Überstand durch 5 ml Medium ersetzt, wovon 1 ml in eine neue Zellkulturflasche (+ 20 ml Medium) überführt wurde.

Bei der Verwendung von 6-Well-Flaschen wurden jeweils 1 Million Zellen pro Well ausplattiert.

2.3.2 SH-SY5Y-Zellen

2.3.2.1 Kultivierung von SH-SY5Y-Zellen

Verwendete Lösung:

Medium

Dublecco's modified Eagle medium

10 % Fetales bovines Serum

1 % Penicillin/Streptomycin

1 % L-Glutamin

Die Kultivierung und das Passagieren der SH-SY5Y-Zellen erfolgte auf gleiche Weise wie bei den HEK 293-Zellen. Den einzigen Unterschied machte die Zusammensetzung des Zellmediums aus, welches bei den SH-SY5Y-Zellen zusätzlich 1 % L-Glutamin und nur 1 % Penicillin/Streptomycin enthielt, um die vergleichsweise empfindlicheren Zellen geringerem Stress auszusetzen.

2.3.3 Kryokonservierung

Zur Konservierung der Zellen wurden 800 µl zellreiches Medium mit 100 µl FBS und 100 µl DMSO vermischt und zur Schockfrostung in Trockeneis gegeben. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.4 Zellbiochemische Methoden

2.4.1 Herstellung der Zelllysate

Um die Proteine aus den Zellen freizusetzen, wurde 10%iges SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) in Kombination mit einem zweiminütigen Ultraschallbad verwendet und auf die mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Das Lysat wurde anschließend unter sterilen Bedingungen in Eppendorf-Cups überführt und transportfähig gemacht.

2.4.2 Herstellung der Hirnhomogenate

Zur Herstellung der Hirnhomogenate wurden Mäusegehirne männlicher Prion-Protein Knockout-Mäuse (Prnp^{0/0}) und männlicher Wildtyp-Mäuse im Alter von 3 und 15 Mo-

naten verwendet. Für jedes Experiment wurden wenigstens 5 verschiedene Mäuse verwendet. Das Hirnmaterial wurde uns im Zuge einer Zusammenarbeit an der Universitätsmedizin Göttingen von Herrn Dr. Walter Schultz-Schäffer zur Verfügung gestellt. Die Prnp^{0/0}-Mäuse waren Nachkommen der Zürich I-Mauslinie. Die Wildtyp-Mäuse waren eine Kreuzung der F₁-Nachkommen von gepaarten Mäusen der Stämme C57BL/6J x 129/Sv(ev).

Die Tg-35-Mäuse waren transgene Mäuse, die ein Cosmid mit einem Maus PrPc b-Allel besitzen, wodurch eine 8-10 mal höhere PrPc-Expression erreicht wird.

Das Hirnmaterial wurde auf Eis mit einer Rasierklinge zerkleinert und mit Extraktionspuffer aus 50 mM Tris HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100 und Proteaseinhibitoren gemischt und homogenisiert. Diese Suspension wurde im Ultraschallbad sonifiziert, anschließend für 15 Minuten im Rotator inkubiert und abschließend für 10 Minuten bei 4° C zentrifugiert (13000 x g). Die im Überstand angereicherten Proteine wurden in Eppendorf-Cups überführt und bei -80 °C gelagert.

2.4.3 Proteinmessung nach Bradford

Der Proteingehalt der Zellproben wurde mit Hilfe des Bestimmungsverfahrens nach Bradford ermittelt (Bradford 1976). Bei dieser photometrischen Messmethode befindet sich die Absorption des Ausgangsreagenz Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) bei 465 nm. Kommt es zu einer Komplexbildung dieses Farbstoffes mit Proteinen, verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm, sodass die Absorption mit dem Maß an Komplexbildung und somit mit dem Proteingehalt der Probe korreliert.

Für die Messung wurde das Bradford-Konzentrat im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser gemischt und anschließend mit Filterpapier filtriert.

Als Standard wurde BSA-Protein mit destilliertem Wasser verdünnt. Dabei wurden sechs verschiedene Verdünnungen im Bereich von 0,1-1,4 mg/ml angefertigt. Die Proben für die Proteinmessung wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt, 20 µl Probe mit 980 µl Bradford-Lösung gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 595 gemessen. Für die Umrechnung der Absorption auf den Proteingehalt der Probe wurde die Software Microsoft Office 2003 Excel zur Hilfe genommen.

2.4.4 Deglykosylierung von PrP^c

Die Deglykosylierung von PrP^c wurde mit Hilfe des Enzyms N-Glykosidase F durchgeführt. Dabei werden die N-glykosidisch gebundenen Zuckerketten an Position 180 und 191 von der Aminosäure Asparagin abgespalten, wodurch Asparaginsäure entsteht.

Diese Methode wurde mit dem Deglykosylierungs Kit der Firma Calbiochem (Merck) durchgeführt.

Vorerst wurde das Zellpellet mit 30µl ddH₂O versetzt. Anschließend wurden 10 µl 5X Reaktionspuffer und 2,5 µl Denaturierungslösung hinzugefügt.

Nach dem Erhitzen der Probe für 5 Minuten bei 100 °C wurden 2,5 µl Triton X-100 Detergenz in die Probe pipettiert. Zuletzt wurde dann noch 1 µl des Enzym N-Glykosidase F zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden bei 37 °C war PrP^c vollständig deglykosyliert.

2.4.5 SDS-Page

Gelzusammensetzung

Trenngel (2x)		Sammelgel (2x)
Tris/SDS-Puffer	3,7 ml (pH 6,8)	1,05 ml (pH 8,8)
40 %iges Acrylamid	4,4 ml	0,84 ml
destilliertes Wasser	6,8 ml	2,6 ml
APS 10%	150 µl	45 µl
TEMED	6 µl	5 µl

Die SDS-Page (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) dient zur Größenauftrennung von Proteinen. Dabei wandern die negativ geladenen Proteine auf Grund der angelegten elektrischen Spannung durch das Gel. Da Proteine mit einem geringen molekularen Gewicht schneller durch das Gel migrieren als große, findet eine Proteinauftrennung nach Größe im Gel statt.

Das verwendete Gel bestand aus zwei Phasen, die sich aus dem Sammelgel mit den Geltaschen (Acrylamidgehalt 5%) und dem Trenngel (Acrylamidgehalt 12%) zusammensetzten. Zuerst wurde das angefertigte flüssige Trenngel in die Gelkammern gegossen und zur Beschwerung mit Wasser überschichtet, bis es nach 30 Minuten auspo-

lymerisiert war. Nach Beseitigung des Wassers wurde das Sammelgel über das Trenngel in die Gelkammern gegossen und 30 Minuten auspolymerisiert. Durch den eingeführten Gel-Kamm entstanden Geltaschen, die zur Probenauftragung dienten.

Zur Beladung der Geltaschen sind die aus den Zellen gewonnenen Proteine mit Auftragspuffer (Roti-Load, Roth, Karlsruhe) vermischt und für 2 Minuten bei 95 °C erhitzt worden. Die proteinbeladenen und in Elektrophoresepuffer eingelegten Gele wurden anschließend an eine konstante 100 V Spannung angeschlossen. Die durch Bromphenol Blau gefärbte Lauffront im Gel zeigte dabei an, wie weit die Proteine im Gel schon gewandert waren. Als Standard diente hier der Precision Plus Protein Standard (dual color) von Bio-Rad.

2.4.6 Western-Blot

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine detektieren zu können, wurden sie mit Hilfe der Western-Blot-Methode vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dabei binden die Proteine über hydrophobe Aminosäurereste an die Membran (Towbin et al., 1979).

Bei der hier verwendeten Blot-Technik handelt es sich um die Semi-dry-Methode, bei der Gel und Membran von zwei mit Transferpuffer getränkten Filterpapieren umgeben sind (s. Abb. 6). Die Proteine wurden bei konstanten 12V für 70 Minuten auf die vorbereitete Membran geblottet (je eine Minute in Methanol, ddH₂O u. Transferpuffer).

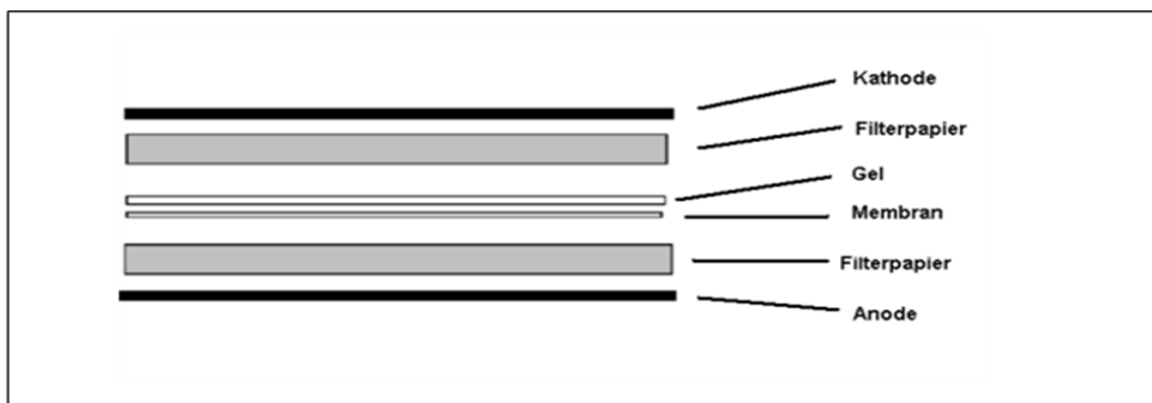


Abbildung 6: Materialanordnung in der Blotting-Maschine nach der Semi-dry-Methode (eigene Abbildung).

2.4.7 Antikörperinkubation

Bevor die proteinhaltige Membran mit Antikörper beladen wurde, war die Absättigung der freien Proteinbindungsstellen mit milchpulverhaltiger Blockierungslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur nötig.

Nachdem der erste Antikörper über Nacht bei +4 °C an die Membran gebunden hatte, wurde die Membran mehrfach mit PBS-T gewaschen, bevor der zweite Antikörper für eine Stunde auf die Membran gebracht wurde. Verdünnt wurden die Antikörper jeweils mit Blocklösung.

2.4.8 Membranentwicklung

Um die Membran zu entwickeln, wurde der 2. Antikörper vorerst gründlich mit PBS-T und OKANO gewaschen. Dann wurde die Membran für exakt eine Minute in eine vorher angefertigte Entwicklungslösung (ECL 1+2) gelegt, vorsichtig mit Frischhaltefolie ummantelt und bei Dunkelheit mit Röntgenpapier in einer geeigneten Box fest verschlossen. Das Entwicklungspapier wurde dann in eine Entwicklungsmaschine der Röntgenabteilung gegeben, die nach kurzer Zeit das fertige Bandenmuster hervorbrachte. Die Dauer der Entwicklungszeit in der Box war hierbei von Antikörper und Probe abhängig.

2.4.9 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Die in dieser Arbeit verwendeten ELISA-Kits für die Detektion von sAPP α , sAPP β , A β -40 und A β -42 wurden alle von der Firma IBL hergestellt und sind aus diesem Grund nahezu identisch in der Durchführung.

Anfangs wurde eine Verdünnungsreihe mit in destilliertem Wasser gelöstem Standard hergestellt. Um den Standard in der Messung doppelt bestimmen zu können, wurden 230 μ l Standardlösung mit 230 μ l EIA-Puffer (1% BSA, 0,05% Tween 20 in PBS) gemischt und dann noch sechs Mal verdünnt. Im achten Well befand sich die Leerprobe mit EIA-Puffer.

Um verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können, wurden die zuvor ermittelten Proteinwerte der Zellproben mit Hilfe des EIA-Puffers angeglichen. Anschließend wurden 100 μ l von jeder Probe in die mit dem ersten Antikörper beschichteten ELISA-Well pipettiert und die abgedeckte Well-Platte über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag folgte nach siebenmaligem Waschen die Inkubation mit 100 µl des zweiten Antikörpers, die je nach Kit 30 Minuten bis eine Stunde dauerte. Anschließend wurde die Platte neun Mal gewaschen und für 30 Minuten mit 100 µl Chromogen (TMB Lösung) versetzt. Eine Stop-Lösung beendete letztlich die Reaktion und ermöglichte für 30 Minuten die stabile Messung der Proben bei 450 nm im Plattenlesegerät.

2.4.10 Analyse der Tau- und p-Tau-Konzentration mittels ECLIA (Elektrochemilumineszenz-Immunoassay)

Die ECLIA ist eine Vereinigung der Elektrochemie mit der Spektrometrie. Zur Analyse der Tau- und p-Tau-Konzentration wurde die Tau und p-Tau 231 ECLIA von Meso Scale TM (MSD) nach den entsprechenden Anweisungen des Herstellers benutzt. Für jede Analyse wurden 40 µg Hirnhomogenat verwendet. Für die MSD ECL-Plattform wurden spezielle Platten mit eingebetteten Elektroden benutzt. Das Prinzip der Elektrochemilumineszenz fußt dabei auf elektrochemische Stimulation eines SULFO-TAG [Ruthenium(II) tris-bipyridine-(4-methylsulfonate) NHS-Ester]-konjugierten Antikörpers. Die Chemilumineszenz konnte dann mit Hilfe einer CCD (Charge-coupled Device) -Kamera bei 620 nm gemessen werden und war der Konzentration des Tau in der Probe direkt proportional.

2.4.11 Immunzytochemie

Um die Konzentration bestimmter Zellproteine sichtbar zu machen, wurden die Zellen immunzytochemisch gefärbt.

Die anzufärbenden Zellen wurden auf runden Deckplättchen kultiviert und bei ausreichender Dichte in 24-Well-Platten einmal für 5 Minuten mit 500µl PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen folgte eine 20minütige Inkubation in 4% Paraformaldehyd. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 Minuten wurden die Zellkerne mit PBS + 0,2 µg/ml DAPI für 10 Minuten angefärbt. Danach wurden die fixierten Zellen wieder dreimal gewaschen und anschließend die Zellmembran mit Hilfe einer zehnmütigen Inkubation mit PBS+ 0,2 % Triton permeabel gemacht. Wieder folgte die gleiche Waschung. Vor der Antikörperinkubation wurde eine Blocklösung (PBS + 2% BSA + 10% FBS) für eine Stunde auf die Zellen gegeben. Der erste Antikörper inkubierte über Nacht bei 4° C in spezifischer Verdünnung mit PBS + 2% BSA auf den

Zellen. Nach mehrmaliger Waschung mit PBS erfolgte am nächsten Tag die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für zwei Stunden. Zur Überprüfung der Spezifität des ersten Antikörpers wurde zusätzlich eine Negativkontrolle durchgeführt. Dabei wurde anstelle des ersten Antikörpers PBS und anschließend der Sekundärantikörper aufgetragen. Durch die Verwendung des polymerisierenden Eindeckmediums Moviol wurde die Austrocknung und ein Verrutschen des Deckgläschens verhindert. Über Nacht wurden schließlich die Objektträger im Kühlschrank ausgehärtet. Anschließend wurden die Zellen unter dem Mikroskop angesehen und Bilder mit Hilfe der cell-F Software von Olympus gemacht.

2.4.12 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurde Dynabeads Protein G (Invitrogen) verwendet. Vorher wurden 4 µl Antikörper und 315 µl Zelllysat bei ständiger Rotation für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Danach wurden 50 µl 50% Dynabeads jeder Probe hinzugefügt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben dreimal gewaschen und anschließend das Zielantigen extrahiert. Die immunpräzipitierten Proteine (2×10^6 /Protein) wurden anschließend im Western-Blot untersucht.

2.5 Statistische Analyse

Die Quantifizierung der Bandenintensität aller Western-Blot-Banden wurde mit Hilfe von Scion Image gemacht. Alle Daten wurden mit der Statistik-Software GraphPad Prism 4 ausgewertet. Dabei wurden die Werte bei normaler Verteilung mit dem „student t-test“ berechnet. Bei einer unnormalen Verteilung wurde die Analyse mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Mann-Whitney-U-Test) gemacht. Die Standardabweichung wurde in den Diagrammen mit einem Fehlerbalken dargestellt. Alle Werte mit $p < 0,05$ wurden als Signifikant eingestuft.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob PrP^c einen Einfluss auf die Expression Alzheimer-relevanter Proteine hat. Insbesondere das membranständige Amyloide Precursor-Protein (APP) mit seinen Spaltprodukten A β -40, APP α und APP β , die β -Sekretase BACE sowie Tau und das neurotoxische 3PO-Tau bilden in diesem Zusammenhang den Schwerpunkt der vorgestellten Ergebnisse.

Für die Untersuchungen wurden die Zellen zweier Zelllinien mit einem pCMS-EGFP-Vektor transfiziert, der das PrP^c-Gen (*Prnp*) enthält. Verglichen wurden PrP^c-überexprimierende Zellen mit Kontrollzellen, die eine deutlich geringere PrP^c-Expression zeigten. Die im Zellmodell erlangten Daten wurden zusätzlich im Mausmodell untersucht. Dabei wurden Hirnhomogenate von transgenen PrP^c-Knockout-Mäusen (*Prnp*^{0/0}) mit denen von Wildtyp-Mäusen (WT) verglichen, die eine physiologische PrP^c-Expression besitzen.

3.1 Immunzytochemische Detektion von PrP^c

Durch eine immunzytochemische Färbung von transfizierten HEK-293- und SH-SY5Y-Zellen wurde PrP^c markiert und durch den rot fluoreszierenden zweiten Antikörper Alexa 546 detektiert. Bei den HEK-293-Zellen wurde zur Detektion der monoklonale PrP^c-Antikörper SAF32 und bei den SH-SY5Y-Zellen der monoklonale PrP^c-Antikörper 12F10 verwendet. Die immunzytochemische Anfärbung von PrP^c zeigte bei beiden Zelllinien eine ubiquitäre Lokalisation von PrP^c.

Für die Darstellung der Zellkerne wurden die Zellen mit DAPI gefärbt. Die Zellkerne beider Zelllinien zeigten eine vorhandene Vitalität der Zellen an. Die Transfektionsrate der Zellen wurde durch die im Vektor enthaltene grüne Fluoreszenz GFP (*Green Fluorescent Protein*) mit UV-Licht sichtbar gemacht. Die Auszählung der fluoreszierenden Zellen ergab eine geschätzte Transfektionsrate von 70-80 %. Durch die ubiquitäre Rotfärbung der Zellen ist eine Lokalisation von PrP^c sowohl in der Zelle als auch an der Zellmembran zu vermuten.

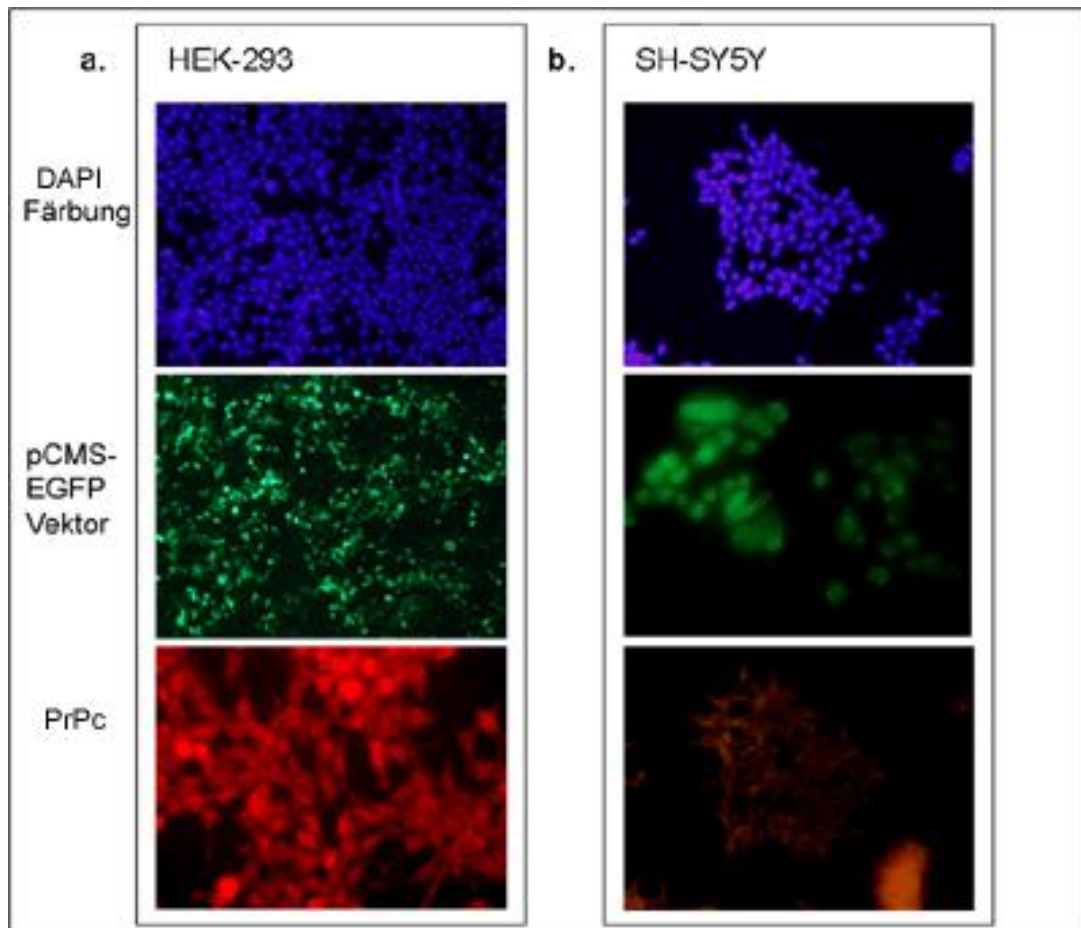


Abbildung 7: Immunzytochemische Detektion von PrP^c in HEK-293 (a) - und SH-SY5Y (b)

-Zellen. Darstellung der Zellkerne mittels DAPI-Färbung. Die PrP^c-Expression wurde mit den monoklonalen Primärantikörpern 3F4 sowie 12F10 und dem rot fluoreszierenden Sekundärantikörper Alexa Fluor 546 dargestellt. Vergrößerung: 10fach und 40fach.

3.2 Quantifizierung der PrP^c-Expression in transfizierten Zellen

Die Überexpression von PrP^c wurde durch die Transfektion der Zellen mit einem pCMS-EGFP-PRNP-Vektor (PRNP+) erreicht, der humanes PRNP exprimiert. Ein leerer pCMS-EGFP-Vektor diente als Kontrolle (Ramljak et al., 2008). Die Effizienz der Transfektion und die Hochregulation von PrP^c wurde mittels Western-Blot unter Verwendung des monoklonalen PrP^c-Antikörpers SAF32 analysiert. Dabei zeigte sich unglykosyliertes PrP^c mit einem Molekulargewicht von 27 kDa sowie mono- und diglykosyliertes PrP^c mit 33 kDa und 35 kDa. Da es sich bei der Transfektionsmethode um eine transiente Transfektion handelt, musste ein geeigneter Zeitpunkt mit ausreichender Überexpression von PrP^c gefunden werden. Aus diesem Grund wurde die PrP^c-Expression nach 24 und 48 Stunden bestimmt.

Im Gegensatz zu den HEK-293 Zellen war bei den SH-SY5Y Zellen eine sehr geringe endogene Expression von PrP^c zu sehen. Nach der Transfektion ergab die Western-Blot-Analyse nach 24 Stunden eine durchschnittliche Expressionserhöhung um den Faktor 2. Nach 48 Stunden zeigte sich eine bis zu 3,5 fach erhöhte Expression von PrP^c. Für alle weiteren Versuche wurden demzufolge Zelllysate nach 48 Stunden Transfektion verwendet.

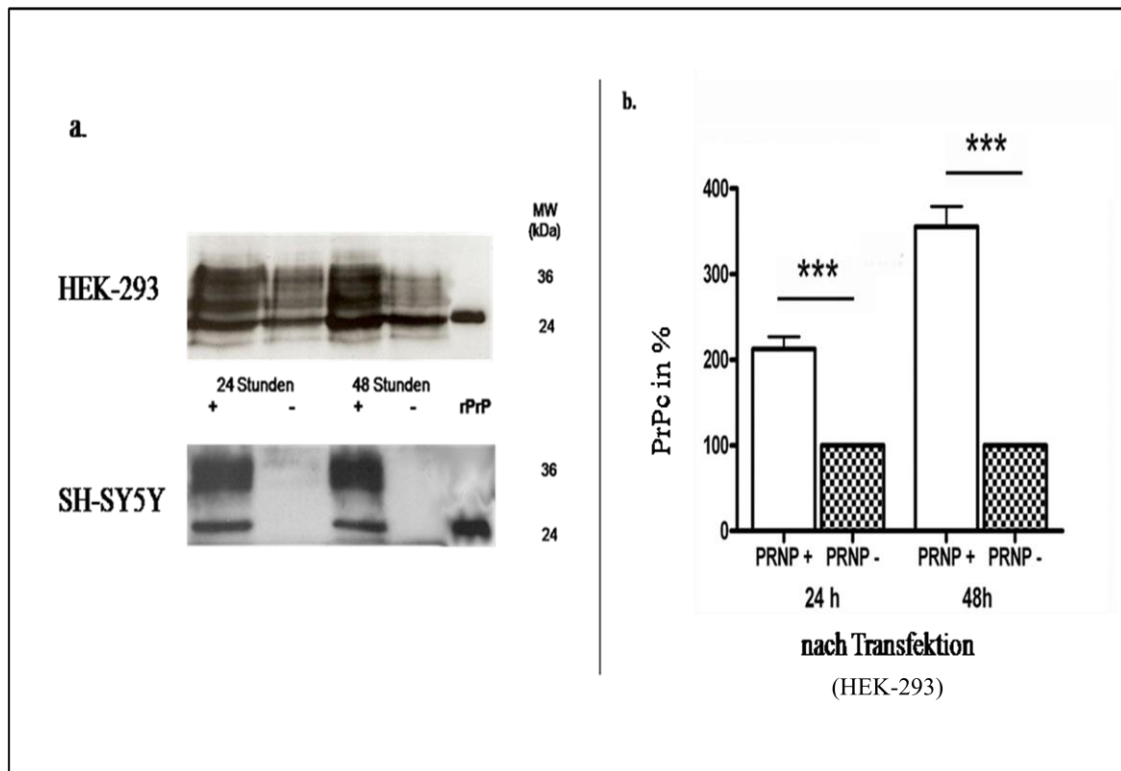


Abbildung 8: Expression von PrP^c in HEK-293- und SH-SY5Y-Zellen nach 24 und 48 Stunden Transfektion (a) mit Quantifizierung der HEK-293-Zellen in Prozent (b). Das Gel wurde jeweils mit 20 µg Protein beladen. Als positiv-Kontrolle dienten 4ng rekombinantes humanes Prion-Protein (rPrP). Die Hochregulation von PrP^c in den mit pCMS-EGFP-PRNP-Vektor transfizierten Zellen ist sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden im Vergleich zu den mit Leer-Vektor (pCMS-EGFP) transfizierten Zellen signifikant (***).

3.3 Deglykosylierung von PrP^c

Um die Spezifität der PrP^c-Antikörper zu untersuchen, wurde PrP^c glykosyliert und deglykosyliert detektiert. Hierbei wurde ein Deglykosylierungskit der Firma Calbiochem verwendet. Nach Inkubation mit dem Enzym N-Glykosidase F nahmen die Mengen an unglykosyliertem PrP^c (27 kDa) deutlich zu, bei gleichzeitiger Abnahme der glykosylierten Isoform. Damit konnte eine spezifische Detektion von PrP^c durch die verwendeten PrP^c-Antikörper gezeigt werden.

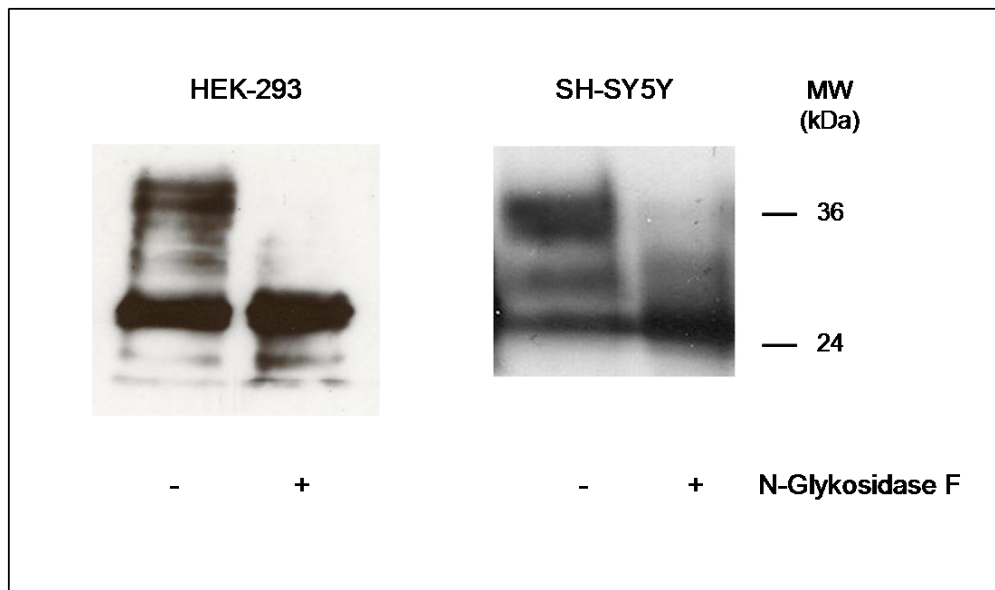


Abbildung 9: Deglykosylierung von PrP^c. Hek-293- und SH-SY5Y-Lysate wurden mit N-Glykosidase F behandelt. Danach konnte durch die PrP^c-Antikörper SAF32 und 12F10 eine deutliche Zunahme von unglykosylierten PrP^c beobachtet werden, was die Spezifität der PrP^c-Antikörper anzeigte.

3.4 Einfluss von PrP^c auf die APP- und BACE-Expression

In dieser Arbeit wurde das Amyloide Precursor-Protein (APP) und BACE untersucht, weil diese Schlüsselstellen in der Entstehung von Amyloid-Plaques im Gehirn darstellen. Um den Einfluss von PrP^c auf die Expression dieser Proteine zu untersuchen, wurden sie im Western-Blot dargestellt und mittels ScinImage quantifiziert. Eine β -Actin Kontrolle zeigte gleiche Gesamtproteinmengen in den Proben. Im Western-Blot war eine unveränderte Expression von APP und BACE nach Überexpression von PrP^c zu

sehen. Demzufolge hatte die Hochregulation von PrP^c keine Auswirkung auf die Expression von APP und BACE in der Zelle.

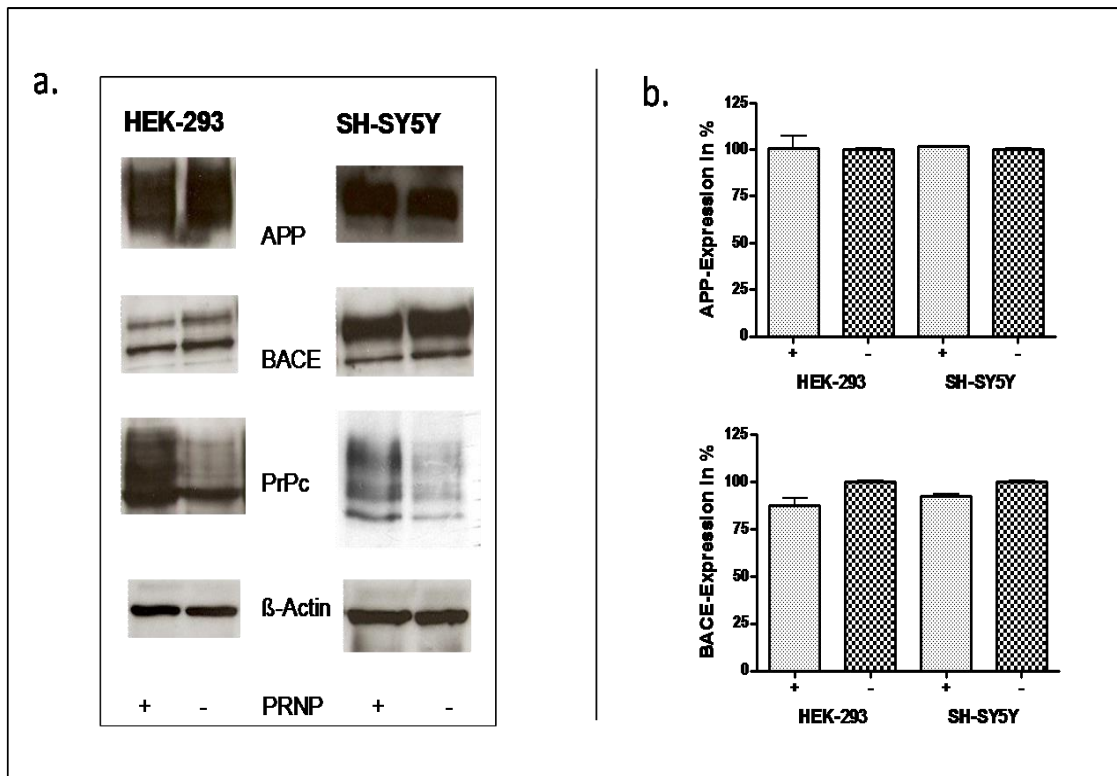


Abbildung 10: Expression von APP und BACE in HEK-293- und SH-SY5Y-Zellen mit und ohne PrP^c-Überexpression. Es wurden PrP^c-überexprimierende Zellen (Prnp +) und Kontrollzellen (Prnp -) verglichen. Die Detektion von APP erfolgte mit Hilfe des Primärantikörpers 22C11. Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte in % der Kontrolle. Dazu wurde die Expression der mit Leervektor transfizierten Zellen als 100 % gesetzt. In beiden Zelllinien sind keine signifikanten Unterschiede in der APP-Expression festzustellen. Die Darstellung von BACE erfolgte durch den polyklonalen Primärantikörper Anti-BACE. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede. Zur PrP^c-Detektion diente der Antikörper 12F10. Mit Hilfe von beta-Aktin konnte gezeigt werden, dass alle Proben gleiche Proteinmengen besaßen.

3.5 Interaktion von PrP^c mit AD-relevanten Proteinen

Anschließend wurden mögliche Interaktionen von PrP^c mit APP, BACE, p-Tau und Tau untersucht. Dabei diente PrP^c als Zielantigen der Immunpräzipitation. Anschließend konnte im Western-Blot durch die spezifischen Antikörper APP, BACE1 Tau, p-Tau 181 und p-Tau S396 eine Proteinbande des jeweiligen Proteins dargestellt werden. Das Ergebnis zeigt somit bei allen untersuchten Proteinen eine Interaktion mit PrP^c. Die Detektion von APP erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 22C11, der sowohl APP in voller Länge (130 kDa) als auch die Isoform sAPP mit einem Molekularge-

wicht von 100 kDa detektiert (Hilbich et al. 1993). Bei der Interaktion mit PrP^c zeigte sich hier nur eine schwache Proteinbande bei 130 kDa und eine deutlich intensivere Proteinbande bei 100 kDa. Die Interaktionsanalyse zeigt somit, dass PrP^c eine höhere Affinität zu sAPP als zum full length-APP hat.

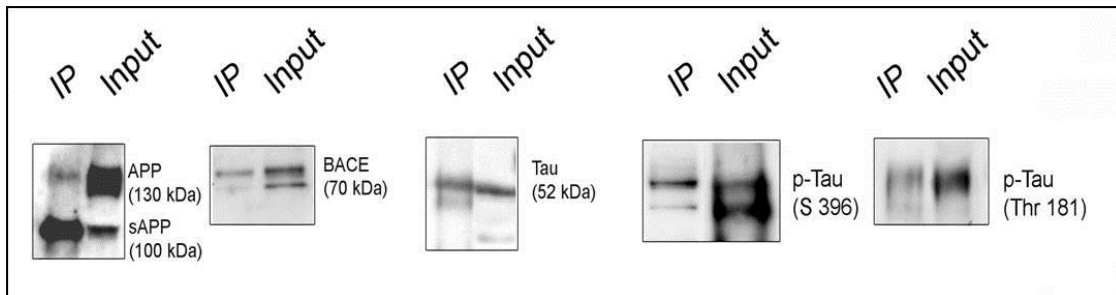


Abbildung 11: Interaktion von PrP^c mit APP, BACE, p-Tau und Tau. Die Interaktionen sind mittels Immunpräzipitation im Western-Blot dargestellt. Es zeigen sich im Immunpräzipitat (IP) von PrP^c Interaktionen mit APP, BACE, Tau, p-Tau (S 396) und p-Tau (Thr 181). Als Input sind die jeweiligen Proteine im Zelllysate als Positivkontrolle dargestellt.

Im Immunpräzipitat von APP, BACE, pTau S 396 und p-Tau Thr 181 waren die jeweiligen Proteine das Zielantigen und konnten im Western-Blot mit Hilfe des PrP^c-Antikörpers SAF32 ebenfalls als Interaktionspartner detektiert werden. Dieses Ergebnis bestätigt die zuvor gezeigten Interaktionen der einzelnen Proteine mit PrP^c.

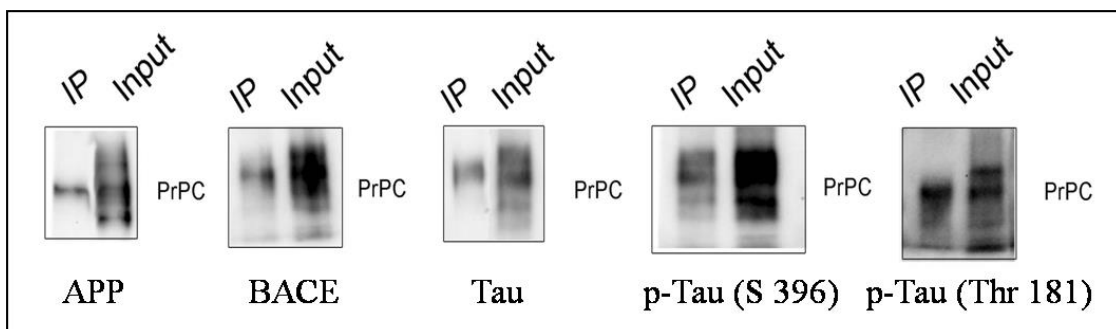


Abbildung 12: Interaktion von APP, BACE, Tau und p-Tau mit PrP^c. Die Proteine APP, sAPP, BACE, Tau, p-Tau (S 396) und p-Tau (Thr 181) zeigen im Immunpräzipitat (IP) alle Interaktionen mit PrP^c. Als Input ist PrP^c im Zelllysate als Positivkontrolle dargestellt.

3.6 Einfluss von PrP^c auf die APP-Spaltung

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression von PrP^c und der Spaltung von APP durch BACE zu untersuchen, wurden die APP-Spaltprodukte A β -40,

A β -42, APP β und APP α mit Hilfe von ELISA ermittelt. Durch diese Untersuchung konnte nicht nur der direkte Einfluss von PrP^c auf die Spaltprodukte, sondern auch indirekt der Einfluss auf BACE ermittelt werden. Dabei wurden PrP^c-überexprimierende Zellen (PRNP+) mit den Kontrollzellen verglichen. Die Konzentrationen der APP-Spaltprodukte wurden intrazellulär im Pellet und extrazellulär im Zellüberstand bestimmt. Zur Vergleichbarkeit der untersuchten Proben wurden die Proteinmengen zuvor angeglichen. Die Kontrollzellen mit endogener PrP^c-Expression bilden jeweils mit 100 % den Ausgangswert.

3.6.1 Regulation von A β -40 durch PrP^c

Um einen Einfluss von PrP^c auf die Expression von A β -40 zu untersuchen, wurde die A β -40-Expression in und außerhalb der Zelle (intra- und extrazellulär) in PRNP- und PRNP+-Zellen mittels IBL-ELISA gemessen und miteinander verglichen. Bei den untersuchten Zelllinien handelt es sich um HEK-293 und SH-SY5Y-Zellen. Intrazellulär war bei den PrP^c-überexprimierenden Zellen eine signifikante Reduktion von A β -40 von mehr als 20 % zu messen. Die Untersuchung des Überstandes zeigte eine signifikante Verringerung ($p < 0,01$) von A β -40 bei PRNP+ um ca. 30 %.

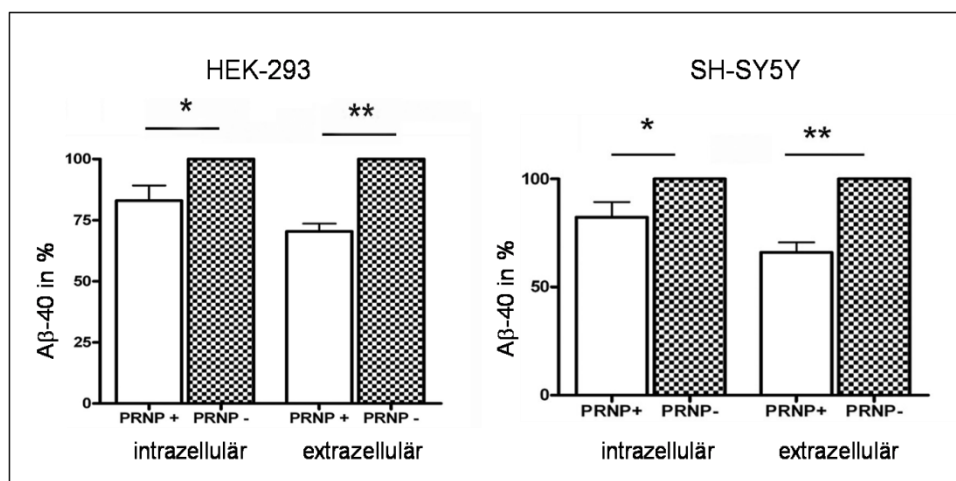


Abbildung 13: Abnahme von A β -40 in PrP^c-überexprimierenden Zellen intra- und extrazellulär.

Dargestellt ist die A β -40-Expression von HEK-293- und SH-SY5Y-Zellen intrazellulär und im Zellüberstand. Beide Zelllinien zeigten intrazellulär eine signifikante (*) und extrazellulär eine hoch signifikante (**) Verringerung des A β -40-Levels bei PRNP+-Zellen.

3.6.2 Regulation von A β -42 durch PrP^c

Da in dieser Studie kein Alzheimer-Zellmodell verwendet wurde, konnte A β -42 auf Grund seiner geringen Konzentration lediglich im Zellüberstand gemessen werden. Zwischen PrP^c-überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen konnte dabei kein signifikanter Unterschied gemessen werden.

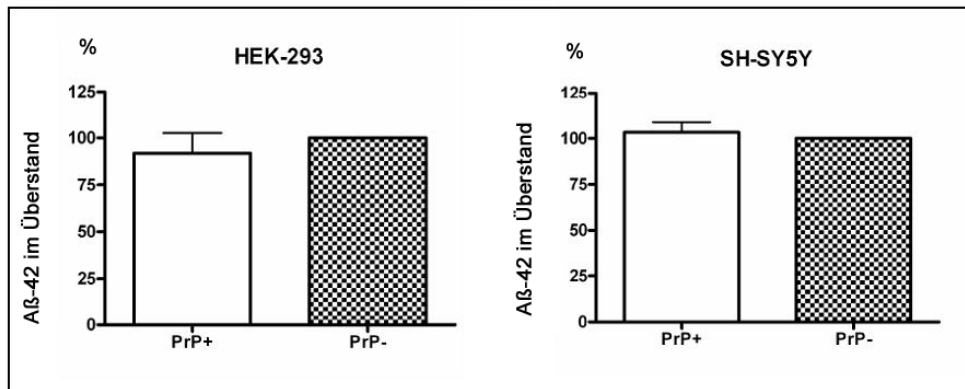


Abbildung 14: Einfluss von PrP^c auf die Expression von A β -42. A β -42-Expression von HEK-293- und SH-SY5Y-Zellen im Zellüberstand mittels IBL-ELISA gemessen. Beim Vergleich von PrP^c-überexprimierenden und Kontrollzellen konnte kein signifikanter Unterschied im Zellüberstand gemessen werden.

3.6.3 Regulation von APP β durch PrP^c

Ein weiteres Spaltprodukt des amyloidogenen Spaltungsweges von APP ist sAPP β . Um einen möglichen Einfluss von PrP^c auf sAPP β zu untersuchen, wurde mittels IBL-ELISA die Konzentration von sAPP β intrazellulär und im Zellüberstand bestimmt.

Bei den Messungen zeigte sich sowohl intra- als auch extrazellulär eine signifikant geringere Expression von sAPP β in den PrP^c-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die intrazelluläre sAPP β -Expression war bei den PRNP+-Zellen um ca. 20 % reduziert. Extrazellulär konnte bei den HEK-293-Zellen eine hoch signifikante Abnahme an sAPP β von über 30 % gemessen werden.

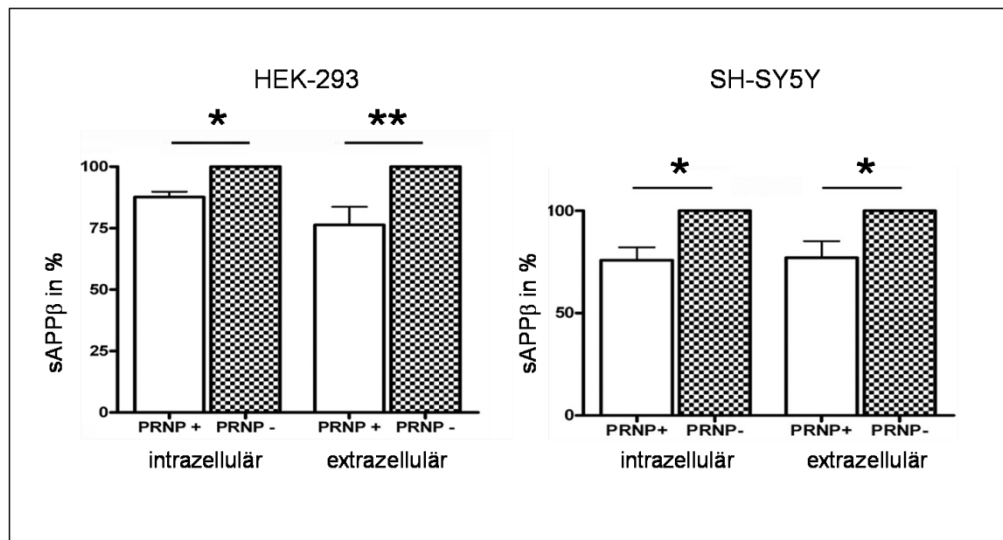


Abbildung 15: Einfluss von PrP^c auf die Entstehung von sAPPβ. Es wurde die sAPPβ-Expression von PrP^c-überexprimierenden und Kontrollzellen der Zelllinien HEK-293 und SH-SY5Y verglichen. In beiden Zelllinien ist bei den PrP^c-überexprimierenden Zellen intrazellulär eine signifikante und im Zellüberstand von HEK-293 eine hoch signifikante Abnahme an sAPPβ zu messen.

3.6.4 Einfluss von PrP^c auf die nicht-amyloide Spaltung von APP

Neben dem amyloiden β -Sekretase-Spaltungsweg sollte nun der Einfluss von PrP^c auf die alternative nicht-amyloide Spaltung von APP durch die α -Sekretase untersucht werden. Ein durch die α -Sekretase entstehendes Spaltprodukt ist sAPP α . Dieses wurde bei HEK-293- und SH-SY5Y-Zellen intrazellulär und im Überstand mittels IBL-ELISA gemessen. Die Auswertung ergab eine signifikant geringere intrazelluläre Expression von sAPP α in PRNP+-Zellen um 20 % im Vergleich mit den Kontrollzellen. Extrazellulär konnte bei den PrP^c-überexprimierenden Zellen ebenfalls eine signifikante Reduktion von sAPP α um 25 % beobachtet werden.

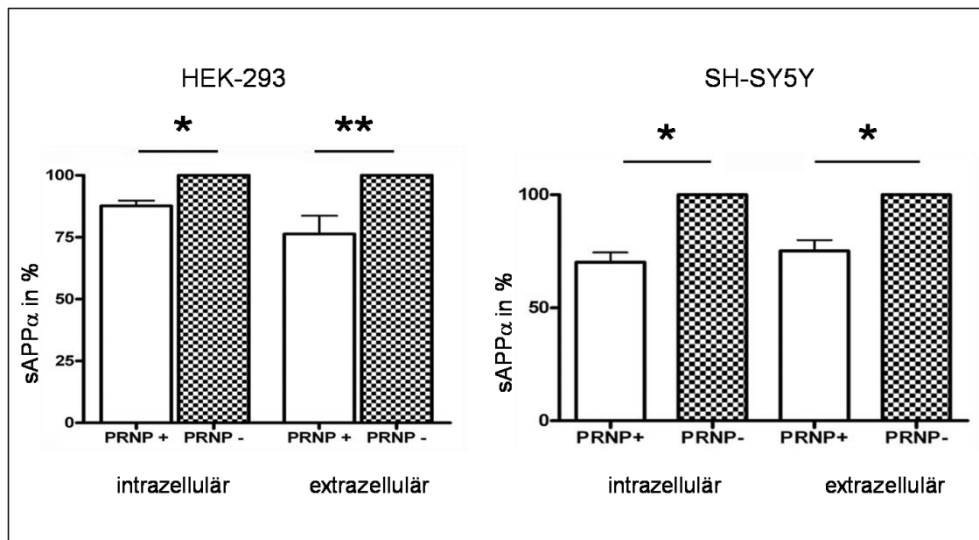


Abbildung 16: Einfluss von PrP^c auf die sAPPα-Expression. Verglichen wurde die sAPPα Expression von PrP^c-überexprimierenden und Kontrollzellen der Zelllinien HEK-293 und SH-SY5Y. Im Zellüberstand sowie innerhalb der Zellen ist eine signifikante Verringerung von sAPPα bei PRNP+ Zellen zu messen.

3.7 Mausmodell

Als nächstes sollte der *in vitro* detektierte Einfluss von PrP^c auf die Expression Alzheimer-relevanter Proteine *in vivo* mit Hilfe eines Mausmodells untersucht werden.

In den folgenden Experimenten wurden Mäusegehirne von PrP^c-Knockout-Mäusen (Prnp^{0/0}) mit Wildtyp-Mäusen (WT) verglichen. Bei den transgenen Mäusen handelt es sich um Nachkommen der Zürich I-Mauslinie im Alter von 3 und 15 Monaten.

3.7.1 APP- und BACE-Expression in Mäusen

Die Expression von APP und BACE in den Hirnhomogenaten der Mäuse wurde mittels Western-Blot detektiert. Die PrP^c-Expression der WT-Mäuse, die mit Hilfe des Antikörpers 12F10 dargestellt wurde, diente dabei als Kontrolle und zeigte im Vergleich zu den Prnp^{0/0}-Mäusen eine fehlende PrP^c-Expression. Bei der Expression von APP und BACE konnten keine Unterschiede zwischen Prnp^{0/0}- und WT-Mäusen festgestellt werden. Es zeigten sich auch keine altersabhängigen Expressionsunterschiede und somit keine altersbedingte Regulation. Durch die Detektion von β-Actin ließen sich die gleiche Proteinwerte der Proben darstellen.

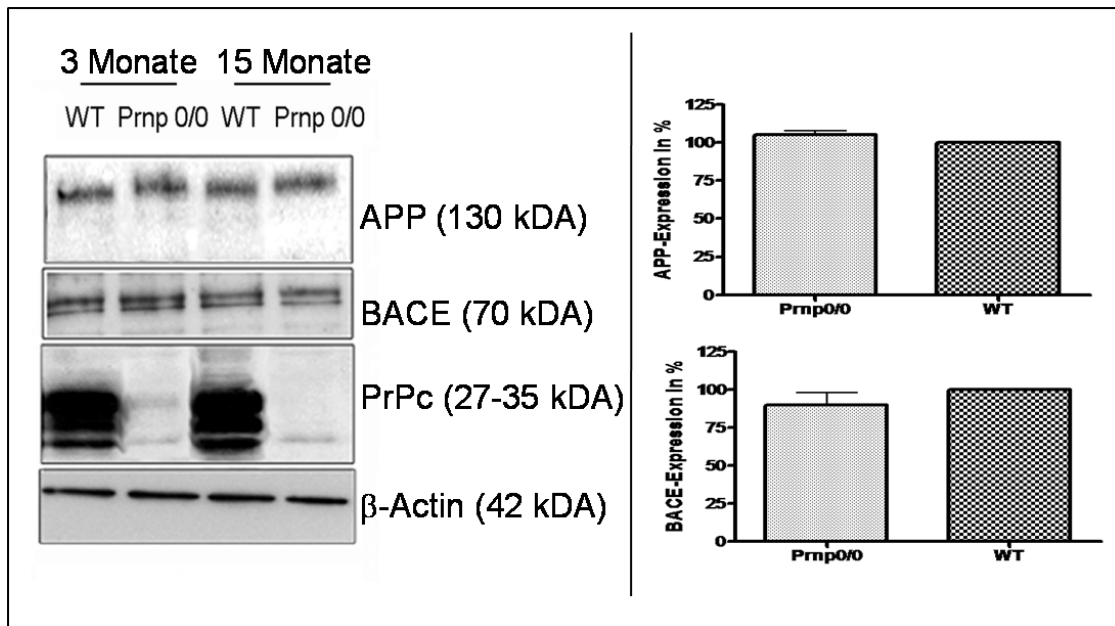


Abbildung 17: Detektion (a) und Quantifizierung (b) der Proteine APP und BACE in Gehirnhomogenaten von Prnp^{0/0}- und WT-Mäusen im Alter von 3 und 15 Monaten. Die Quantifizierung der Bandenintensität im Western blot ergab keine signifikanten Unterschiede in der Expression von APP und BACE. Die β-Actin Banden zeigen gleiche Proteinmengen in den untersuchten Proben.

3.7.2 Detektion von Aβ-40 in Prnp^{0/0}-, WT- und PrP^c-überexprimierenden (Tg-35) Mäusen

Die Konzentrationen von Aβ-40 wurden vorerst in den Hirnhomogenaten von WT und Prnp^{0/0}-Mäusen mittels IBL-ELISA analysiert. Um den möglichen Einfluss des Alters der Mäuse zu berücksichtigen, wurden Mäuse im Alter von 3 und 15 Monaten gewählt. Im Ergebnis zeigte sich bei beiden Altersstufen eine signifikante Erhöhung des Aβ-40 Level bei den Prnp^{0/0}-Mäusen. Im Alter von 3 Monaten konnte im Vergleich zu den WT-Mäusen eine Erhöhung der Aβ-40-Expression von über 30 % detektiert werden. Mit 15 Monaten zeigte sich eine um fast 50 % gestiegene Expression von Aβ-40. Auf Grund dieser Ergebnisse, die einen Zusammenhang der PrP^c-Expression mit der Aβ-40-Konzentration nahelegten, wurden anschließend noch Untersuchungen mit PrP^c-überexprimierenden Tg-35-Mäusen durchgeführt. Auch hier konnte eine Korrelation von PrP^c-Expression und Aβ-40-Konzentration gezeigt werden. Im Vergleich zu den Prnp^{0/0}-Mäusen konnte sogar eine um ca. 75 % geringere Aβ-40-Konzentration gemessen werden.

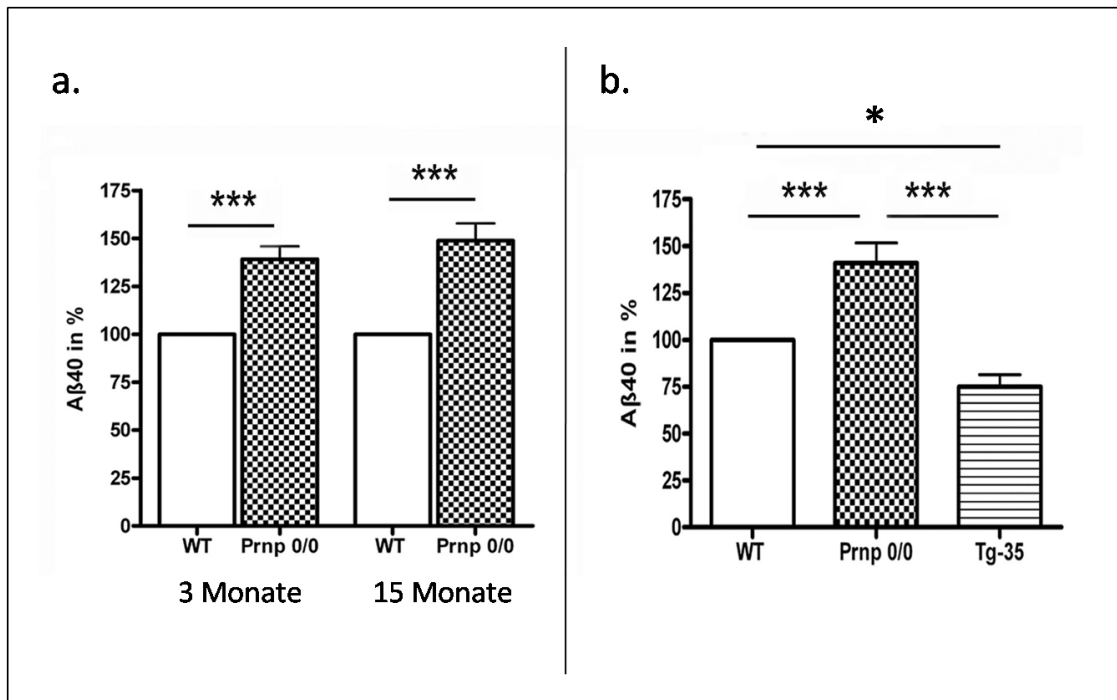


Abbildung 18: Aβ-40-Konzentrationen in Mäusegehirnhomogenaten. **a.** Bestimmung der Aβ-40-Konzentration in den Gehirnhomogenaten von WT- und Prnp^{0/0}-Mäusen im Alter von 3 und 15 Monaten. Mittels ELISA wurden die Mengen an Aβ-40 in Mäusegehirnhomogenaten (40μg Protein) gemessen. Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen ist die Expression von Aβ-40 bei den Prnp^{0/0}-Mäusen mit 3 und 15 Monaten um ca. 50 % erhöht. **b.** Aβ-Konzentrationen der Gehirnhomogenate von WT, Prnp^{0/0} und PrP^c-überexprimierenden Tg-35-Mäusen im Vergleich. Hier zeigt sich bei den Tg-35-Mäusen eine um ca. 25 % geringere Menge an Aβ-40 im Vergleich zu den WT-Mäusen.

3.7.3 Detektion der Tau- und p-Tau-Expression in Prnp^{0/0}- und WT-Mäusen

Die Expression von Tau und drei verschiedenen phosphorylierten p-Tau Isoformen (S396, 181 und 199) im Gehirn von WT- und Prnp^{0/0}-Mäusen wurden mittels Western-Blot untersucht. Dabei konnte in den untersuchten Altersgruppen (3 und 15 Monate) kein Einfluss von PrP^c auf die Expression von Tau und p-Tau festgestellt werden (Abb. 19 a).

Um einen möglichen Einfluss der Gehirnregion ausschließen zu können, wurden im Anschluss drei verschiedene Hirnregionen (Kortex, Zerebellum und Hippokampus) mittels Western-Blot analysiert. Beim Vergleich von WT- und Prnp^{0/0}-Mäusen ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Expressionsunterschiede bezüglich der Tau- und p-Tau-Expression (Abb. 19 b).

Eine genauere Bestimmung der Tau- und p-Tau 231-Konzentration erfolgte mittels Meso-Scale-ELISA, einem multiparametrischen, electrochemilumineszenz basierten Assay (Abb. 19 c). Während die Tau-Konzentration in 40 µg Gehirnhomogenat durchschnittlich bei 35000-40000 pg/ml lag, betrug die p-Tau 231-Menge ca. 5-6 pg/ml. Der Vergleich von Prnp^{0/0}- und WT-Mäusen ergab unabhängig vom Alter der Mäuse erneut keine signifikanten Unterschiede und entsprach somit den Western-Blot-Ergebnissen.

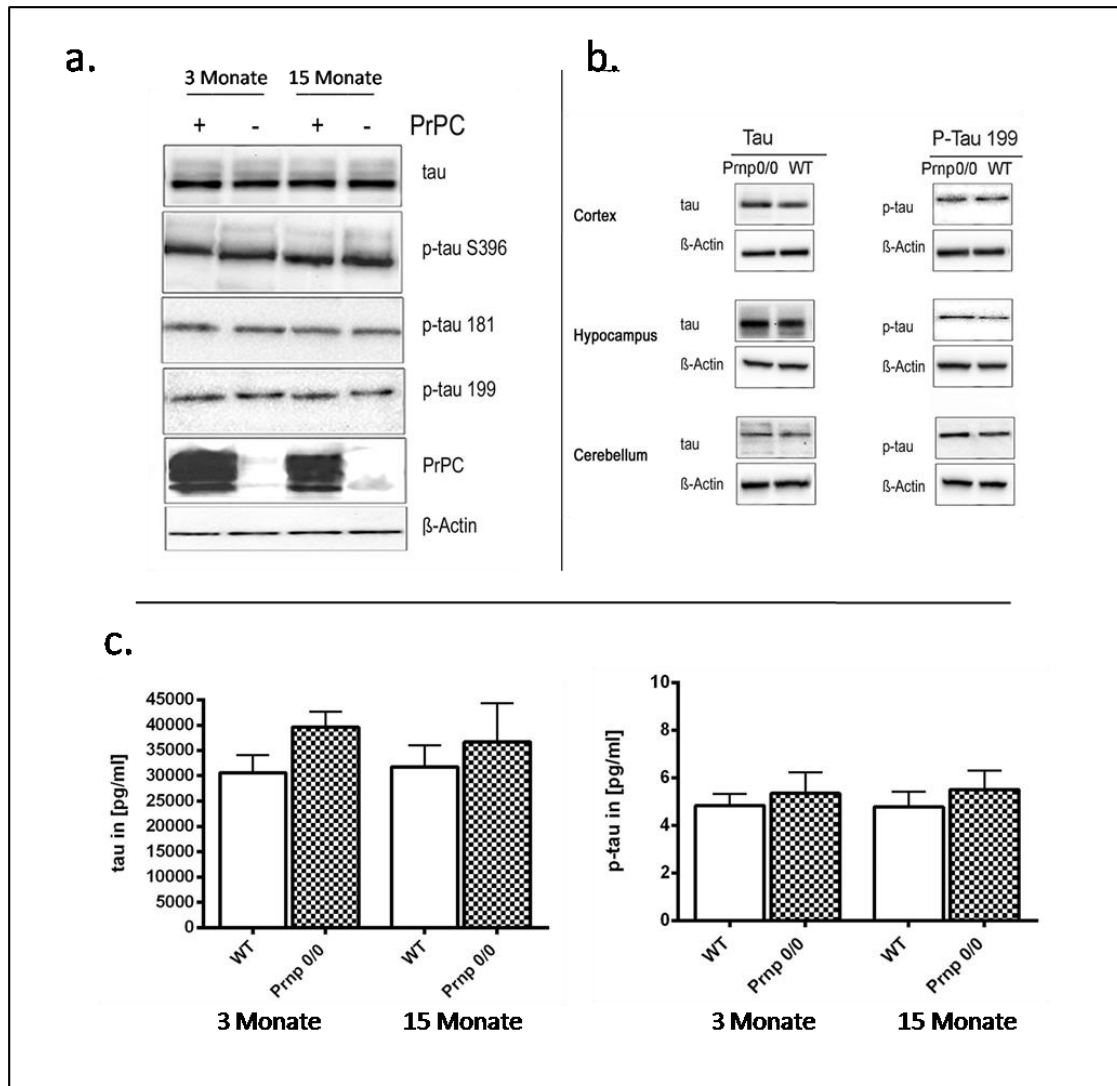


Abbildung 19: Detektion von Tau, p-Tau in Mäusegehirnhomogenaten. **a.** Expression verschiedener Tau- und p-Tau-Isoformen in WT- und Prnp^{0/0}- Mäusen im Alter von 3 und 15 Monaten im Western-Blot. Beim Vergleich von Prnp^{0/0}- und WT-Gehirnproben ließen sich keine signifikanten Expressionsunterschiede beobachten. **b.** Expression von Tau in drei verschiedenen Gehirnregionen (Kortex, Zerebellum und Hippokampus) von 15 Monate alten WT- und Prnp^{0/0}-Mäusen. Auch hier konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede detektiert werden. **c.** Tau- und p-Tau 231-Level in WT- und Prnp^{0/0}- Mäusen. Die mittels ECLIA gemessenen Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede.

4. Diskussion

Studien haben gezeigt, dass die pathologischen Mechanismen beim Entstehen der AD einige Parallelen zu Prionen-Erkrankungen aufweisen. In beiden Fällen sind Proteinaggregationen im Gehirn zu beobachten, die zu einem Absterben von Nervenzellen führen. Auch eine Koexistenz beider Erkrankungen in einem Individuum wurde beschrieben (Leuba et al. 2000; Tsuchiya et al. 2004; Yoshida et al. 2010).

Des Weiteren konnten Arbeiten mit genetisch veränderten Alzheimer-Mäusen einen Einfluss von PrP^c auf die Entstehung von Amyloid feststellen (Parkin et al. 2007; Gimbel et al. 2010). Auch konnte bereits gezeigt werden, dass die PrP^c-Konzentrationen in Gehirnen von AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erniedrigt waren und invers mit dem Stadium der Erkrankung korrelierten (Whitehouse et al. 2013).

Ziel dieser Arbeit war es, die physiologische Rolle von PrP^c genauer zu untersuchen. Insbesondere mögliche Interaktionen von PrP^c mit AD-relevanten Proteinen wie APP, BACE und A β sowie deren Regulation standen dabei im Fokus der Arbeit.

4.1 PrP^c interagiert mit APP, sAPP und BACE

Proteininteraktionen sind wichtige Elemente im Zellmetabolismus und haben eine Schlüsselrolle bei allen biologischen Prozessen mit Proteinbeteiligung. Besonders bei Signaltransduktionen sind Protein/Protein-Wechselwirkungen von zentraler Bedeutung. Dass PrP^c ein wichtiger Interaktionspartner im Bereich der neuronalen Signaltransduktion ist und viele Interaktionen mit unterschiedlichen Proteinen in diesem Bereich eingeht, konnte bereits gezeigt werden (Spielhauer und Schätzl 2001; Lopes et al. 2005). In der folgenden Tabelle sind die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Interaktionen sowie einige wichtige bekannte Interaktionspartner von PrP^c aufgeführt:

Interaktionspartner	Methodik der Untersuchung	Verwendete Zellen / Mäuse
<p>In dieser Arbeit gezeigte Interaktionen von PrP^c: APP sAPP BACE p-Tau S396 p-Tau S181</p> <p>Bereits bekannte Interaktionspartner: <u>AD-relevante Proteine:</u> Aplp1 (amyloid precursor-like protein 1) (<i>Yeihely et al. 1997</i>) BACE-Vorstufe (<i>Griffiths et al. 2011</i>) Tau (<i>Han et al. 2006</i>)</p> <p><u>Interaktionen im neuronalen Signalweg:</u> -Neurales phosphoprotein synapsis 1b -Adapterprotein Grb2 -Pint1 (Prion interaktor 1) (<i>Spielhauer und Schätzl 2001</i>) STI1 (stress-inducible protein 1) (<i>Lopes et al. 2005</i>)</p>	<p>Immunoprecipitation</p> <p>Screening der lambdaagt11-Mäusegehirn-cDNA-Bibliothek mittels PrP^c-AP</p> <p>Immunoprecipitation</p> <p>Immunoprecipitation</p> <p>Immunoprecipitation</p> <p>Immunofluoreszenz</p>	<p>HEK-293-Zellen</p> <p>Mäusegehirnzellen</p> <p>humane hippocampale Neurone und 129/Ola-Wildtyp-Mäuse</p> <p>Mit Tau und PrP^c transfierte CHO-Zellen</p> <p>mit murinem PrP^c transfierte BHK-Zellen</p> <p>Mäusegehirnzellen (17. Embryonaltag)</p>

Tyrosin Kinase Fyn (<i>Moulliet-Richard et al. 2000</i>)	Immunoprecipitation	hippokampale Neuronen der Maus 1C11-Zellen
Bcl-2 (<i>Kurschner et al. 1995</i>)	Hefe-Zwei-Hybrid-System	Hefezellen (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<u>Andere:</u>		
Hitzeschockprotein 60 (<i>Edenhofer et al. 1996</i>)	Hefe-Zwei-Hybrid-System	Hefezellen
37kD-Laminin (<i>Rieger et al, 1997</i>)	Hefe-Zwei-Hybrid-System	Hefezellen

Tabelle 5: Interaktionspartner von PrP^c

Die hier untersuchten Interaktionen von PrP^c mit APP und BACE sind von hohem Interesse und bedeutsam, um die Rolle von PrP^c im Zellmetabolismus sowie die mögliche Beteiligung beim Entstehen der AD besser zu verstehen. Durch eine Immunoprecipitationsanalyse war es in dieser Arbeit erstmals möglich, nachzuweisen, dass PrP^c sowohl an BACE als auch an APP bindet und somit als Interaktionspartner agieren kann. Die Interaktion mit sAPP, einer prozessierten Form von APP, war dabei deutlich ausgeprägter als die Interaktion mit dem full-length-APP selbst. Der Grund hierfür ist möglicherweise eine Konformationsänderung von sAPP, die die Bindung von PrP^c erleichtert.

In vorangegangenen Arbeiten konnten bereits Interaktionen mit APP-ähnlichen Proteinen gefunden werden. So konnte eine Interaktion von PrP^c mit dem APP-ähnlichen Protein Aplp 1 gezeigt werden (Yehiely et al. 1997). Auch eine Interaktion von PrP^c mit A β , dem Spaltprodukt von APP, sowie PrP^c als Rezeptor für A β -42 im Hippokampus wurde beschrieben und ein möglicher Einfluss auf das Langzeitgedächtnis vermutet (Laurén et al. 2009). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Interaktion von PrP^c und BACE steht in Einklang mit der Arbeit von Whitehouse et al., in der eine inverse Korrelation von PrP^c-Konzentration und BACE-Aktivität gezeigt werden konnte, und eine Interaktion der beiden Proteine vermuten lässt (Whitehouse et al. 2013). In diesem Zusammenhang konnte in einer früheren Arbeit bereits eine Interaktion von PrP^c mit

einer Vorstufe des Enzyms BACE detektiert werden. Diese Vorstufe scheint durch die Interaktion mit PrP^c im Golgi-Apparat zu verharren, sodass die Expression von BACE letztlich inhibiert wird (Hooper und Turner 2008; Griffiths et al. 2011).

Eine andere Arbeit in diesem Bereich beschäftigte sich mit dem Zusammenhang zwischen PrP^c und Presenilin, der katalytischen Untereinheit des γ -Sekretase-Komplexes, die Teil der amyloiden Spaltung von APP ist. Hier konnte nachgewiesen werden, dass sich der Einfluss von Presenilin auf die Transkription von PrP^c auswirkt (Vincent et al. 2009). Dabei zeigte sich bei einem Anstieg der amyloiden intrazellulären Domäne (AICD), die durch die APP-Spaltung der γ -Sekretasen entsteht, eine Hochregulation der PrP^c-mRNA, was wiederum den amyloiden Spaltweg inhibiert, sodass sich eine Balance einstellt. Durch erhöhte A β -Konzentrationen bei AD und die Interaktion von A β -Oligomeren mit PrP^c kann diese Balance gestört werden, was eine unkontrollierte Produktion von A β zur Folge hat (Kellett und Hooper 2009).

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen somit alle einen Einfluss von PrP^c auf die amyloide Spaltung und gehen diesbezüglich konform mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Die hier gezeigten Interaktionen von PrP^c mit BACE und APP deuten auf einen Einfluss von PrP^c auf den amyloiden Spaltweg hin.

4.2 PrP^c hat keinen Einfluss auf die APP- und BACE-Expression

Um die Auswirkung der Interaktion von PrP^c mit APP und BACE genauer zu verstehen, wurde in dieser Arbeit ein direkter Einfluss der Interaktionen auf die Expression der beiden Proteine untersucht. Dies wurde sowohl im Zellmodell mit transienter Transfektion mit PRNP als auch im Mausmodell in Abhängigkeit von der PrP^c-Expression verglichen. Ein Einfluss von PrP^c auf die Expression der beiden Proteine konnte dabei weder im Zell- noch im Mausmodell gefunden werden. In einer vorangegangenen Arbeit mit transgenen Alzheimer-Mäusen bewirkte das Fehlen von PrP^c ebenfalls keine Veränderung der APP-Expression (Gimbel et al. 2010), was im Einklang mit unseren Ergebnissen steht.

4.3 PrP^c beeinflusst die Bildung der APP-Spaltprodukte

Die Proteolyse von APP erfolgt durch verschiedene Enzyme und bringt unterschiedliche Spaltprodukte hervor. Entscheidend bei der Entstehung von Morbus Alzheimer ist

dabei die Anreicherung von A β -Oligomeren, die toxisch wirken (Hardy et al. 1991). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob PrP^c einen Einfluss auf die Konzentration der APP-Spaltprodukte hat. Der Vorteil dieser Studie liegt im Gegensatz zu anderen Publikationen darin, dass hier die Rolle von PrP^c unter physiologischen Bedingungen und nicht anhand eines Alzheimer-Modells untersucht wurde. Dabei konnte im Zellmodell intra- und extrazellulär ein signifikanter Einfluss von PrP^c auf die A β -40-Konzentrationen detektiert werden, die sich nach transienter Transfektion mit PRNP im Schnitt um 25-30 % reduzierten. Zusätzlich wurden die Konzentrationen von sAPP β bei PrP^c-überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen verglichen. Hier konnten ebenfalls signifikante Verringerungen von sAPP β bei PrP^c-Überexpression detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt zum einen, dass PrP^c auch unter physiologischen Bedingungen die amyloide APP-Spaltung inhibiert und zum anderen, dass diese Hemmung nicht nur spezifisch bei A β , sondern auch bei anderen APP-Fragmenten stattfindet. Leider konnte in unseren Experimenten kein Einfluss auf A β -42 demonstriert werden, da die Konzentrationen im Zellmedium zu gering ausfielen um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

In der Arbeit von Parkin et al. konnte das A β -40-Level im Zellmedium von relativ artifiziellen APP-überexprimierenden SH-SY5Y Zellen durch eine PrP^c-Überexpression um 90 % gesenkt werden (Parkin et al. 2007). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gehen zwar in eine ähnliche Richtung, zeigen im Vergleich dazu jedoch eine deutlich geringere Reduktion der A β -40-Konzentrationen. Das liegt daran, dass es in dieser Arbeit darum ging, PrP^c unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Demzufolge ist ein Grund für die differenten Ergebnisse zum einen, dass bei den hier verwendeten Zellen keine APP-Überexpression induziert wurde und zum anderen, dass die Zellen bereits eine physiologische PrP^c-Expression zeigten.

Zur Überprüfung unserer *in vitro*-Ergebnisse diente ein Mausmodell. Diese *in vivo*-Untersuchungen ermöglichten eine Aussage bei komplettem Fehlen von PrP^c, die auf Grund der physiologischen Expression von PrP^c im Zellmodell *in vitro* nicht möglich war. Die verwendeten Mäuse im Alter von 3 und 15 Monaten waren Prnp^{0/0}-Mäuse der Zürich I-Mauslinie (Bueler et al. 1992). Auch hier konnte ein Einfluss von PrP^c auf den amyloiden Spaltweg nachgewiesen werden. Es zeigten sich unabhängig vom Alter signifikant geringere A β -40-Konzentrationen bei den Wildtyp-Mäusen im Vergleich

zu den $Prnp^{0/0}$ -Mäusen. Um diese Ergebnisse noch weiter zu untermauern, entschlossen wir uns, Messungen im Gehirngewebe von PrP^c -überexprimierenden Tg-35-Mäusen durchzuführen. Dabei fanden wir bei den überexprimierenden Mäusen im Vergleich mit den Wildtyp-Mäusen noch geringere Konzentrationen an $A\beta$ -40. Dieser Einfluss wurde zuvor auch in einem weiteren Mausmodell (Edinburgh I-Mauslinie) gezeigt, sodass dieser Effekt unabhängig von der Mauslinie zu sein scheint (Parkin et al. 2007).

Auch Untersuchungen mit Proben von AD-Gehirnen konnten zeigen, dass die gemessenen PrP^c -Konzentrationen invers mit den $A\beta$ -Konzentrationen korrelieren (Whitehouse et al. 2013), was mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen in Einklang steht.

Um zu klären, ob PrP^c möglicherweise eine Art Weichensteller der APP-Spaltung darstellt und eine Inhibition des amyloiden Spaltweges die Induktion des nicht amyloiden Spaltweges bedeutet, wurde in dieser Arbeit zusätzlich der Einfluss von PrP^c auf $sAPP\alpha$ untersucht.

Dafür wurden die $sAPP\alpha$ Konzentrationen in PrP^c -überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen untersucht. Auch hier konnten geringere $sAPP\alpha$ -Konzentrationen in PrP^c -überexprimierenden Zellen gemessen werden. Diese Ergebnisse könnten auf eine unspezifische Inhibition der APP-Spaltung durch PrP^c hindeuten.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zum Einfluss von PrP^c auf die Konzentrationen der APP-Spaltprodukte sind in Abbildung 20 im Modell dargestellt. Es existieren insgesamt 4 potentielle Bindungsstellen über die PrP^c Einfluss auf die APP-Spaltung nehmen kann: PrP^c bindet an APP, BACE1, die Amyloid-Domäne sowie das APP-Spaltprodukt $sAPP$ (Abb. 20). Beim amyloiden Spaltungsweg können insbesondere die ersten drei Interaktionsstellen Einfluss auf die Prozessierung von APP haben und die Generierung von $A\beta$ inhibieren.

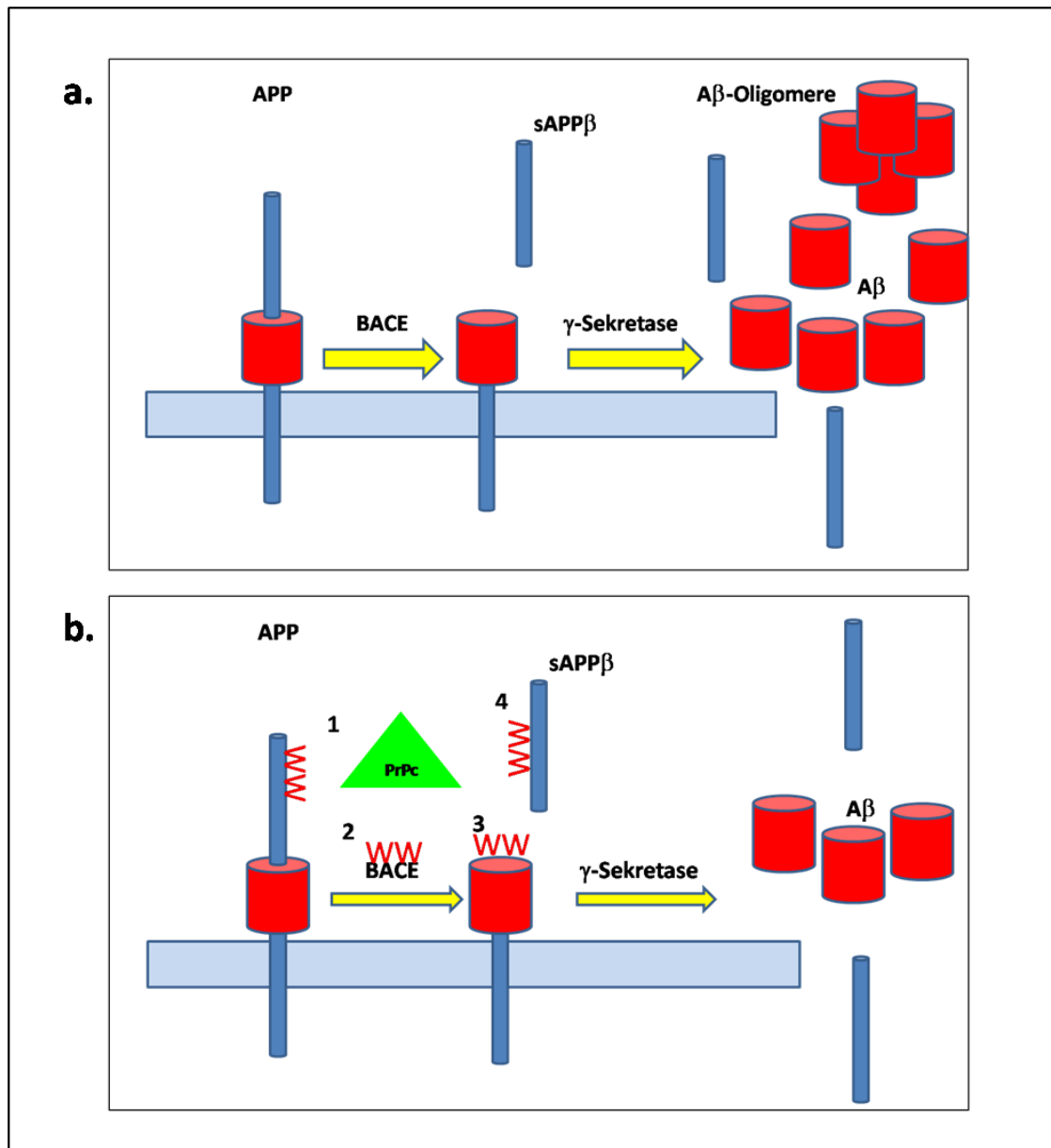


Abbildung 20: Einfluss von PrP^c auf die APP-Spaltung im Modell (eigene Abbildung). a.: Ohne den regulierenden Einfluss von PrP^c werden durch BACE und die γ -Sekretase vermehrt APP-Spaltprodukte wie APP β und A β produziert. b.: Gezeigt sind die 4 möglichen Bindungsstellen von PrP^c. Durch die Interaktion mit BACE (2) und die schwache Interaktion mit APP (1) werden der amyloide Spaltweg und möglicherweise die γ -Sekretase-Spaltung (3) gehemmt, was verringerte Konzentrationen von sAPP β und A β zur Folge hat.

Die hier vorgestellten Ergebnisse konnten PrP^c nicht als Weichensteller der APP-Spaltung detektieren. Dennoch ist eine protektive Funktion von PrP^c bei der Amyloid-Entstehung durch die unspezifische Inhibition und die daraus resultierenden verringerten A β -40-Konzentrationen zu vermuten. Ein möglicher Grund für die Reduktion aller hier gemessenen APP-Spaltprodukte durch eine PrP^c-Überexpression könnte darin

liegen, dass auch PrP^c physiologisches Substrat der α -Sekretase ist (Cissé et al. 2005) und somit möglicherweise eine kompetitive Hemmung der APP-Spaltung resultiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Reihe von Experimenten und Daten für eine Rolle von PrP^c bei der Bildung der APP-Spaltprodukte sprechen. Welche Konsequenzen dieser Einfluss bei der Entstehung amyloider Plaques bei AD aber hat, wird in der Literatur immer noch kontrovers diskutiert.

Eine Kolo-kalisation von PrP^c und A β kommt in nahezu allen amyloiden Plaques vor. So wurde demnach ein möglicher Zusammenhang zwischen PrP^c und der Entstehung von Morbus Alzheimer vermutet (Schwarze-Eicker et al. 2005). Laurén et al. konnten im Jahr 2009 PrP^c als β -Oligomer-Rezeptor identifizieren. Die Interaktion von PrP^c und A β bewirkte einen Verlust der synaptischen Plastizität und somit eine deutliche Verschlechterung des Langzeitgedächtnisses (Laurén et al. 2009). Diese Aussage wurde 2010 von Balducci et al. teilweise widerlegt. Sie zeigten ebenfalls, dass PrP^c mit A β -Oligomeren interagiert, diese Interaktion jedoch keine Auswirkung auf die kognitive Leistung von PrP^c-Knockout-Mäusen und PrP^c-exprimierenden Mäusen im Vergleich hat. Allein die A β -Oligomere waren in dieser Studie, unabhängig von PrP^c, verantwortlich für die Verschlechterung der kognitiven Funktionen der Mäuse (Balducci et al. 2010).

Auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der genannten Studien ist von einer funktionellen Verbindung von PrP^c und A β auszugehen. Wie genau die Interaktion von PrP^c mit A β -Oligomeren aussieht und inwieweit PrP^c bei der Entstehung der AD eine Rolle spielt, ist durch die hohe Komplexität des APP-Metabolismus und die Vielzahl der diskutierten Funktionen der Spaltprodukte immer noch nicht ausreichend geklärt.

4.4 PrP^c interagiert mit Tau und p-Tau

Hyperphosphoryliertes Tau Protein (p-Tau) kommt in neurofibrillen Bündeln vor, die neben A β -Plaques ein weiteres Charakteristikum der AD bilden. Immunzytochemische Analysen konnten bereits eine Kolo-kalisation von p-Tau und PrP^c bei Patienten mit GSS zeigen (Ishizawa et al. 2002). Eine Interaktion von PrP^c mit Tau konnte bei transfizierten CHO-Zellen ebenfalls mittels Immunzytochemie gezeigt werden (Han et al.

2006). Ob und inwieweit PrP^c in die Regulation des Tau- und p-Tau-Metabolismus involviert ist, ist aber nicht geklärt.

In dieser Arbeit konnte mittels Immunpräzipitation eine Interaktion zwischen PrP^c und Tau bzw. PrP^c und p-Tau (Thr181 und S396) gezeigt werden. Eine Interaktion von PrP^c und Tau war bereits bekannt (Han et al. 2006), wogegen die Interaktionen von PrP^c und den phosphorylierten Formen durch uns erstmals gezeigt werden konnten.

Um diesem Phänomen genauer nachzugehen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von Tau und drei phosphorylierten Formen (S396, Thr181, S199) bei Prnp^{0/0}-Mäusen im Alter von 3 und 15 Monaten untersucht. Dabei konnte im Western blot keine veränderte Expression von Tau und phosphoryliertem Tau (p-Tau) detektiert werden. Ein direkter Einfluss von PrP^c auf die Tau-Expression scheint somit nicht zu bestehen. Es zeigte sich auch bei der Untersuchung der einzelnen Hirnregionen (Kortex, Hippokampus und Zerebellum) sowohl bei den WT- als auch bei den Prnp^{0/0}-Mäusen unter physiologischen Bedingungen kein Unterschied.

Die folgende Tabelle fasst die neuen Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit zu Tau und den verschiedenen p-Tau-Formen noch einmal zusammen:

Tau-Form	Untersuchtes Gewebe	Ergebnis
<u>Tau</u>	<ul style="list-style-type: none"> - HEK-293-Zellen - Gehirnhomogenate von Wildtyp- und Prnp^{0/0}-Mäusen im Alter von 3 und 15 Monaten in Kortex, Hippokampus und Zerebellum - Gehirnhomogenate von Wildtyp- und Prnp^{0/0}-Mäusen im Alter von 3 und 15 Monaten 	<ul style="list-style-type: none"> - Es zeigte sich eine Interaktion mit PrP^c - Es zeigten sich unabhängig von Alter und Gewebe im Western-Blot keine Expressionsunterschiede - Im MSD-elektrochemilumineszenz-basierten Assay zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression

p-Tau Thr181 (Phosphorylierung an Threonin 181)	- HEK-293-Zellen - Gehirnhomogenate von Wildtyp- und Prnp ^{0/0} -Mäusen im Alter von 3 und 15 Monaten	- Es zeigte sich eine Interaktion mit PrP ^c - Es zeigten sich unabhängig vom Alter im Western-Blot keine Expressionsunterschiede
p-Tau S396 (Phosphorylierung an Serin 396)	-HEK-293-Zellen - Gehirnhomogenate von Wildtyp- und Prnp ^{0/0} -Mäusen im Alter von 3 und 15 Monaten	-Es zeigte sich eine Interaktion mit PrP ^c -Es zeigten sich unabhängig vom Alter im Western-Blot keine Expressionsunterschiede
p-Tau S199 (Phosphorylierung an Serin 199)	Gehirnhomogenate von Wildtyp- und Prnp ^{0/0} -Mäusen im Alter von 3 und 15 Monaten in Kortex, Hippokampus und Zerebellum	Es zeigten sich unabhängig von Alter und Gewebe im Western-Blot keine Expressionsunterschiede
p-Tau Thr231 (Phosphorylierung an Threonin 231)	Gehirnhomogenate von Wildtyp- und Prnp ^{0/0} -Mäusen im Alter von 3 und 15 Monaten	Im MSD-elektrochemilumineszenz basierten Assay zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression

Tabelle 6: Untersuchungsergebnisse der Tau-Formen

Anders könnte es unter pathologischen Bedingungen sein: ein möglicher Zusammenhang zwischen Prionenerkrankungen, PrP^c und Tau wurde in der Literatur bereits vermutet. So konnte in einer vorangegangenen Arbeit bereits gezeigt werden, dass sich die Tau-Konzentrationen bei Scrapie-infizierten Hamstern signifikant erhöhten und das

phosphorylierte Tau während des Scrapie-Krankheitsverlaufes verändert ist (Wang et al. 2010). Auch konnte akkumuliertes p-Tau in von vCJK betroffenen Gehirnen gefunden werden (Giaccone et al., 2008). In einer weiteren Studie wurde bei Tau-überexprimierenden Zellen eine verringerte Expression von PrP^c an der Zelloberfläche gezeigt (Canu et al., 2011). Der Einfluss von Tau bewirkte dabei eine Aggregation und Akkumulation von PrP^c im Zellkörper. Die Proteinstruktur und die Glykosylierung von PrP^c zeigten sich jedoch unverändert.

Die beschriebenen Studien und die in dieser Arbeit gezeigte Interaktion von phosphoryliertem Tau und PrP^c lassen, insbesondere unter pathologischen Bedingungen, einen möglichen Einfluss von PrP^c auf den Tau-Metabolismus vermuten und bedürfen weiterer Untersuchungen in diesem Bereich.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Interaktionen von PrP^c mit Proteinen, die wesentlich an der Pathogenese der AD beteiligt sind, näher zu untersuchen. Da in vorangegangenen Studien bisher vorwiegend die Rolle des PrP^c an einem genveränderten Alzheimer-Mausmodell beschrieben wurde, sollte in dieser Studie der Einfluss von PrP^c unter physiologischen Bedingungen analysiert werden. Dabei standen die Interaktionen von PrP^c mit BACE, APP und dessen Spaltprodukte sowie Tau und p-Tau im Fokus. Eine Interaktionsstudie mittels Immunpräzipitation belegte eine Interaktion von PrP^c mit APP, sAPP, BACE1, Tau und verschiedenen p-Tau-Isoformen.

Durch kurzzeitige Transfektion mit PRNP wurde nach 48 Stunden die PrP^c-Expression in den Zelllinien HEK-293 und SH-SY5Y um das 2-3fache hochreguliert. Dieses Modell diente dazu, den möglichen Einfluss der PrP^c-Expression auf die Expression der AD-relevanten Proteine zu analysieren. Bei der Untersuchung der APP-Spaltprodukte konnten im ELISA nach PrP^c-Überexpression signifikant verringerte Konzentrationen von A β -40, sAPP β und sAPP α detektiert und so eine mögliche Inhibition der APP-Spaltung durch PrP^c vermutet werden. Ein direkter Einfluss von PrP^c auf die Expression von APP und BACE konnte jedoch nicht gezeigt werden. Um die im Zellmodell erlangten Erkenntnisse weiterführend zu untersuchen, wurden Gehirnhomogenate aus Prnp^{0/0}-Mäusen mit Wildtyp-Mäusen unterschiedlichen Alters miteinander bezüglich ihrer Proteinexpression verglichen. Auch hier konnte kein Unterschied in der Expression von APP und BACE detektiert werden. Es zeigten sich aber bei Prnp^{0/0}-Mäusen signifikant höhere A β -40-Konzentrationen, die unabhängig vom Alter der Mäuse waren und den inhibierenden Einfluss von PrP^c auf die APP-Spaltung nahelegen.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit neue Erkenntnisse über den Einfluss von PrP^c auf den Metabolismus AD-relevanter Proteine unter physiologischen Bedingungen gewonnen. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Journal of Alzheimer's Disease veröffentlicht (Schmitz M. et al. 2014).

6. Literaturverzeichnis

Aguzzi A, Sigurdson CJ (2004): Antiprion immunotherapy: to suppress or to stimulate? *Nat Rev Immunol* 4, 725-736.

Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC (1967): Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214, 764-766.

Balducci C, Beeg M, Stravalaci M, Bastone A, Scip A, Biasini E, Tapella L, Colombo L, Manzoni C, Borsello T, Chiesa R, Gobbi M, Salmona M, Forloni G (2010): Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 2295–2300.

Bayer TA, Cappai R, Masters CL, Beyreuther K, Multhaup G (1999): It all sticks together--the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 4 (6), 524-528.

Becker T (2005): BSE, Creutzfeldt-Jakob & Co. [http://daten.didaktikchemie.uni-bayreuth.de/umat/bse/prion.htm#Das Prion-Protein](http://daten.didaktikchemie.uni-bayreuth.de/umat/bse/prion.htm#Das%20Prion-Protein) (Stand: 20.09.2010; abgerufen am 12.04.2013 um 13:00 Uhr).

Behrens A, Aguzzi A (2002): Small is not beautiful: antagonizing functions for the prion protein PrP(C) and its homologue Dpl. *Trends Neurosci* 25, 150-154.

Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985): The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 101 (4), 1371-1378.

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72, 248-254.

Brini M, Miuzzo M, Pierobon N, Negro A, Sorgato MC (2005): The prion protein and its paralogue Doppel affect calcium signaling in Chinese hamster ovary cells. *Mol Biol Cell*. 16, 2799-2808.

Brown DR (2001): Copper and prion disease. *Brain Res Bull*. 55, 165-173.

Brown DR, Harris DA (2003): Copper and zinc cause delivery of the prion protein from the plasma membrane to a subset of early endosomes and the Golgi. *J Neurochem*. 87, 353-363.

Brown DR, Nicholas RS, Canevari L (2002): Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J Neurosci Res*. 67, 211-224.

Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretschmar HA (1997): Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol*. 146, 104-12.

Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C (1993): Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347.

Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, De Armond SJ, Prusiner SB, Aguet M., Weissmann C. (1992): Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577-582.

Cabral AL, Lee KS, Martins VR (2002): Regulation of the cellular prion protein gene expression depends on chromatin conformation. *J Biol Chem.* 277, 5675-5682.

Caetano FA, Beraldo FH, Hajj GN, Guimaraes AL, Jürgensen S, Wasilewska-Sampaio AP, Hirata PH, Souza I, Machado CF, Wong DY, De Felice FG, Ferreira ST, Prado VF, Rylett RJ, Martins VR, Prado MA (2011): Amyloid-beta oligomers increase the localization of prion protein at the cell surface. *J Neurochem* 117, 538-553.

Cai H, Wang Y, Mc Carthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC (2001): BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci* 4, 233-234.

Canu N, Filesi I, Pristerà A, Ciotti MT, Biocca S (2011): Altered intracellular distribution of PrPC and impairment of proteasome activity in tau overexpressing cortical neurons. *J Alzheimers Dis.* 27(3): 603-613.

Caughey BW, Dong A, Bath KS, Ernst D, Hayes SF, Caughey WS (1991): Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30, 7672-7680.

Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R (2002): Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. 21, 3317-3326.

Choi SH, Kim IC, Kim DS, Kim DW, Chae SH, Choi HH, Choi I, Yeo JS, Song MN, Park HS (2006): Comparative genomic organization of the human and bovine PRNP locus. *Genomics* 87, 598-607.

Cissé MA, Sunyach C, Lefranc-Jullien S, Postina R, Vincent B, Checler F (2005): The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. *J Biol Chem.* 280 (49), 40624-40631.

Cisse M, Mucke L (2009): Alzheimer's disease: A Prion Protein connection. *Nature* 457 (7233), 1090-1091.

Cohen SN, Chang ACY, HSU L (1972): Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 69 (8), 2110-2114.

Colciaghi F, Borroni B, Pastorino L, Marcello E, Zimmermann M, Cattabeni F, Padovani A, Di Luca M (2002): alpha-Secretase ADAM10 as well as alphaAPPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. *Mol Med.* 8 (2), 67-74.

Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S, O'Dowd G, Bowery BJ, Boyce S, Trumbauer ME, Chen HY, et al. (1999): Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* 90, 1-13.

de Silva E, Stumpf MP (2005): Complex networks and simple models in biology. *J R Soc Interface* 22, 419-430.

Dominguez D, Tournoy J, Hartmann D, Huth T, Cryns K, Deforce S, Serneels L, Camacho IE, Marjaux E, Craessaerts K, et al (2005): Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J Biol Chem* 280, 30797-30806.

Donne DG, Viles JH, Groth D, Mehlhorn I, James TL, Cohen FE, Prusiner SB, Wright PE, Dyson HJ (1997): Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP (29–231): The N terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13452-13457.

Edenhofer F, Rieger R, Famulok M, Wendler W, Weiss S, Winnacker EL (1996): Prion protein PrP^C interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J Virol.* 70, 4724-4728.

Fournier JG, Escaig-Haye F, Billette de Villemeur T, Robain O, Lasmezas CI, Deslys JP, Dormont Brown PD (1998): Distribution and submicroscopic immunogold localization of cellular prion protein (PrP^C) in extracerebral tissues. *Cell Tissue Res* 292, 77-84.

Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, Fox M, Mattson MP (1999): Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem* 67, 1882-1896.

Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M (1966): Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209, 794-796.

Giaccone G, Mangieri M, Capobianco R, Limido L, Hauw JJ, Haik S, Fociani P, Bugiani O, Tagliavini F (2008): Tauopathy in human and experimental variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol. Aging* 29, 1864-1873.

Gimbel DA, Nygaard HB, Coffey EE, Gunther EC, Laurén J, Gimbel ZA, Strittmatter SM (2010): Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J Neurosci.* 30 (18): 6367-6374.

Glockshuber R, Hornemann S, Riek R, Billeter M, Wider G, Wüthrich K (1996): Dreidimensionale Struktur einer Domäne des Prion-Proteins aufgeklärt. *Spektrum der Wissenschaft* Sept. 96, 16-18.

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR (2000): Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett.* 482, 257-260.

- Griffith JS (1967): Self-replication and scrapie. *Nature* 215, 1043-1044.
- Griffiths HH, Whitehouse IJ, Baybutt H, Brown D, Kellett KA, Jackson CD, Turner AJ, Piccardo P, Manson JC, Hooper NM (2011): Prion Protein Interacts with BACE1 Protein and Differentially Regulates Its Activity toward Wild Type and Swedish Mutant Amyloid Precursor Protein. *J. Biol. Chem.* 286, 33489–33500.
- Gustke N, Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Meyer HE, Goedert M, Mandelkow E (1992): The Alzheimer-like phosphorylation of tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs. *FEBS Lett.* 307 (2), 199-205.
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, Selkoe DJ (1992): Amyloid b-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322-325.
- Hadlow WJ (1959): Scrapie and kuru. *Lancet* 2, 289-290.
- Han J, Zhang J, Yao H, Wang X, Li F, Chen L, Gao C, Gao J, Nie K, Zhou W, Dong X (2006): Study on interaction between microtubule associated protein tau and prion protein. *Sci China C Life Sci* 49, 473-479.
- Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarentino A, Borchelt DR, Teplow D, Hood L, Burlingame A, et al. (1989): Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys.* 274, 1-13.
- Hardy J, Allsop D (1991): Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 12 (10), 383-388.
- Harris DA (2003): Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br Med Bull.* 66, 71-85.
- Hilbich C, Mönning U, Grund C, Masters CL, Beyreuther K (1993): Amyloid-like properties of peptides flanking the epitope of amyloid precursor protein specific monoclonal antibody 22C11. *J Biol Chem* 268, 26571-26577.
- Hooper NM, Turner AJ (2008): A new take on prions: preventing Alzheimer's disease. *Trends Biochem Sci.* 33, 151-155.
- Horiuchi M, Yamazaki N, Ikeda T, Ishiguro N, Shinagawa M (1995): A cellular form of prion protein (PrP^C) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *J Gen Virol* 76, 2583-2587.
- Hornshaw MP, Mc Dermott MR, Candy JM (1995): Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochemical and Biophysical research communications.* 207, 621-629.
- Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G (1999): Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as b-Secretase. *Mol. Cell Neurosci.* 14 (6), 419-427.

Ishizawa K, Komori T, Shimazu T, Yamamoto T, Kitamoto T, Shimazu K, Hirose T (2002): Hyperphosphorylated tau deposition parallels prion protein burden in a case of Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome P102L mutation complicated with dementia. *Acta Neuropathol* 104, 342-350.

Jakob A (1921): Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Dtsch Z Nervenheilkd* 70, 132-146.

Johnston JA, Liu WW, Todd SA, Coulson DT, Murphy S, Irvine GB, Passmore AP (2005): Expression and activity of beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 33, 1096-1100.

Kellett KA, Hooper NM (2009): Prion protein and Alzheimer disease. *Prion*. 3, 190-194.

Knight RS, Will RG (2004): Prion diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75 (Suppl 1), 36-42.

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

Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T (1999): Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400, 225-226.

Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, He K, Melnikova T, Wen H, Chiang HC, Xu G, Koliatsos VE, Borchelt DR, Price DL, Lee HK, Wong PC (2005): BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci* 25 (50), 11693-11709.

Landolt HP, Glatzel M, Blättler T, Achermann P, Roth C, Mathis J, Weis J, Tobler I, Aguzzi A, Bassetti CL (2006): Sleep-wake disturbances in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*. 66, 1418-1424.

Laurén J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM (2009): Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457, 1128-1132.

Lee IY, Westaway D, Smit AF, Wang K, Seto J, Chen L, Acharya C, Ankener M, Baskin D, Cooper C, Yao H, Prusiner SB, Hood LE (1998): Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res*. 8, 1022-1037.

Leuba G, Saini K, Savioz A, Charnay Y (2000): Early-onset familial Alzheimer disease with coexisting beta-amyloid and prion pathology. *JAMA* 283, 1689-1691.

- Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, He K, Melnikova T, Wen H, Chiang HC, Xu G, Koliatsos VE, Borchelt DR, Price DL, Lee HK, Wong PC (2005): BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid- β amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci.* 25, 11693–11709.
- Locht C, Chesebro B, Race R, Keith JM (1986): Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 6372-6376.
- Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, Mancini GL, Castro RM, Ribeiro KC, 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, 11330-11339.
- Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, et al. (2001): Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's betasecretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 4, 231-232.
- Makrinou E, Collinge J, Antoniou M (2002): Genomic characterization of the human prion protein (PrP) gene locus. *Mamm Genome.* 13, 696-703.
- Mandel M, Higa A (1970): Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol.* 53 (1), 159-162.
- Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J (1992): The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development.* 115, 117-122.
- Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J (1994): 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol.* 8, 121-127.
- McKinley MP, Hay B, Lingappa VR, Lieberburg I, Prusiner SB (1987): Developmental expression of prion protein gene in brain. *Dev Biol.* 121, 105-110.
- Medori R, Tritschler HJ, LeBlanc A, Villare F, Manetto V, Chen HY, Xue R, Leal S, Montagna P, Cortelli P, et al. (1992): Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med.* 326, 444-449.
- Meyne F. (2008): Das zelluläre Prionprotein im Liquor cerebrospinalis von Patienten mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen. In: <http://hdl.handle.net/11858/00-1735-0000-0006-AFCE-3> (Stand: 05.10.2010; abgerufen am 13.05.2013 um 11:30 Uhr).
- Miranda A, Pericuesta E, Ramírez MÁ, Gutierrez-Adan A (2011): Prion Protein Expression Regulates Embryonic Stem Cell Pluripotency and Differentiation. *PLoS One.* 6 (4), e18422.

Mitteregger G, Vosko M, Krebs B, Xiang W, Kohlmannsperger V, Nölting 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.

Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C, Karunaratne A, Pasternak SH, Chishti MA, Liang Y, Mastrangelo P, Wang K, Smit AF, Katamine S, Carlson GA, Cohen FE, Prusiner SB, Melton DW, Tremblay P, Hood LE, Westaway D (1999): Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol.* 292, 797-817.

Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O (2000): Signal transduction through prion protein. *Science* 289, 1925-1928.

Nishida N, Tremblay P, Sugimoto T, Shigematsu K, Shirabe S, Petromilli C, Erpel SP, Nakaoka R, Atarashi R, Houtani T, Torchia M, Sakaguchi S, DeArmond SJ, Prusiner SB, Katamine S (1999): A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest.* 79, 689-697.

Oh ES, Savonenko AV, King JF, Fangmark Tucker SM, Rudow GL, et al. (2009): Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice. *Neurobiol Aging.* 30, 1238-1244.

Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, Oakley H, Younkin SG, Citron M, Vassar R, Disterhoft JF (2004): BACE1 Deficiency Rescues Memory Deficits and Cholinergic Dysfunction in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuron* 41 (1), 27-33.

Ohno M, Cole SL, Yasvoina M, Zhao J, Citron M, Berry R, Disterhoft JF, Vassar R (2007): BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 26, 134-145.

Ohsawa I, Takamura C, Morimoto T, Ishiguro M, Kohsaka S (1999): Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. *Eur J Neurosci* 11, 1907-1913.

Oidtmann B, Simon D, Holtkamp N, Hoffmann R, Baier M (2003): Identification of cDNAs from Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) coding for homologues to tetrapod prion proteins. *FEBS Lett.* 538, 96-100.

Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE (1993): Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90, 10962-10966.

Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, Poser S, Rojiani A, Streichemberger N, Julien J, Vital C, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar H (1999): Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 46, 224-233.

- Parkin ET, Watt NT, Hussain I, Eckman EA, Eckman CB, Manson JC, Baybutt HN, Turner AJ, Hooper NM (2007): Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 104, 11062-11067.
- Prado MA, Alves-Silva J, Magalhães AC, Prado VF, Linden R, Martins VR, Brentani RR (2004): PrPc on the road: trafficking of the cellular prion protein. *J Neurochem.* 88, 769-781.
- Prusiner, SB (1982): Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144.
- Puckett C, Concannon P, Casey C, Hood L (1999): Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet.* 49, 320-329.
- Rachidi W, Mangé A, Senator A, Guiraud P, Riondel J, Benboubetra M, Favier A, Lehmann S (2003): Prion infection impairs copper binding of cultured cells. *J Biol Chem.* 278, 14595-14598.
- Ramljak S, Asif AR, Armstrong VW, Wrede A, Groschup MH, Buschmann A, Schulz-Schaeffer W, Bodemer W, Zerr I (2008). Physiological role of the cellular prion protein (PrPc): protein profiling study in two cell culture systems. *J Proteome Res* 7, 2681-2695.
- Rieger R, Edenhofer F, Lasmézas CI, Weiss S (1997): The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med.* 3 (12), 1383-1388.
- Riemenschneider M, Klopp N, Xiang W, Wagenpfeil S, Vollmert C, Müller U, Förstl H, Illig T, Kretzschmar H, Kurz A (2004): Prion protein codon 129 polymorphism and risk of Alzheimer disease. *Neurology.* 63, 364-366.
- Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, Herms J, Buchholz C, Eckman CB, Korte M, Wolfer DP, Müller UC (2007): The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci.* 27 (29), 7817-7826.
- Rodolfo K, Hässig R, Moya KL, Frobert Y, Grassi J, Di Giamberardino L (1999): A novel cellular prion protein isoform present in rapid anterograde axonal transport. *Neuroreport.* 26, 3639-3644.
- Ross CA, Poirier MA (2004): Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med.* 10, 10-17.
- Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, Okada H., Hasegawa S., Miyamoto T., Noda T. (1996): Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380, 528-530.

Sarnataro D, Campana V, Paladino S, Stornaiuolo M, Nitsch L, Zurzolo C (2004): PrP(C) association with lipid rafts in the early secretory pathway stabilizes its cellular conformation. *Mol Biol Cell.* 15, 4031-4042.

Schmitz M, Wulf K, Signore SC, Schulz-Schaeffer WJ, Kermer P, Bähr M, Wouters FS, Zafar S, Zerr I, (2014): Impact of the cellular prion protein on amyloid-beta and 3PO-Tau processing. *J. Alzheimers Dis.* 38, 551-565.

Schwarze-Eicker K, Keyvani K, Görtz N, Westaway D, Sachser N, Paulus W (2005): Prion protein (PrPc) promotes beta-amyloid plaque formation. *Neurobiol Aging.* 26, 1177-1182.

Seubert P, Oltersdorf T, Lee MG, Barbour R, Blomquist C, Davis DL, Bryant K, Fritz LC, Galasko D, Thal LJ, Lieberburg I, Schenk DB (1993): Secretion of b-amyloid precursor protein cleaved at the amino-terminus of the b-amyloid peptide. *Nature* 361, 260-263.

Shaked Y, Rosenmann H, Hijazi N, Halimi M, Gabizon R (2001): Copper Binding to the PrP Isoforms: a Putative Marker of Their Conformation and Function. *Journal of Virology* 75, 7872-7874.

Shyng SL, Huber MT, Harris DA (1993): A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 25, 15922-15928.

Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Ding DC, Li KW, Chen SF, Yang HI, Li H (2005): Overexpression of PrPC by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model. *J Neurosci.* 25, 8967-8977.

Silverman GL, Qin K, Moore RC, Yang Y, Mastrangelo P, Tremblay P, Prusiner SB, Cohen FE, Westaway D (2000): Doppel is an N-glycosylated, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. Expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp(0/0) mice predisposed to Purkinje cell loss. *J Biol Chem.* 275, 26834-26841.

Singer O, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Coufal NG, Gage FH, Verma IM, Masliah E (2005): Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci.* 8 (10), 1343-1349.

Spielhauser C, Schätzl HM (2001): PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J Biol Chem.* 276 (48), 44604-44612.

Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB (1987): Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51, 229-240.

Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner SB (1993): Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry.* 32, 1991-2002.

Strumbo B, Honchi S, Bolis LC, Simonic T (2001): Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett.* 508, 107-174.

Taraboulos A, Raeber AJ, Borchelt DR, Serban D, Prusiner SB (1992): Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol Biol Cell.* 3, 851-863.

Taylor DR, Watt NT, Perera WS, Hooper NM (2005): Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci.* 118, 5141-58.

Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rülicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC (1996): Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380, 639-642.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76 (9), 4350-4354.

Tsuchiya K, Yagishita S, Ikeda K, Sano M, Taki K, Hashimoto K, Watabiki S, Mizusawa H (2004): Coexistence of CJD and Alzheimer's disease: an autopsy case showing typical clinical features of CJD. *Neuropathology* 24, 46-55.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R et al. (1999): Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.

Vincent B, Sunyach C, Orzechowski HD, St George-Hyslop P, Checler F (2009): p53-Dependent transcriptional control of cellular prion by presenilins. *J Neurosci.* 29, 6752-6760.

Wang GR, Shi S, Gao C, Zhang BY, Tian C, Dong CF, Zhou RM, Li XL, Chen C, Han J, Dong XP (2010): Changes of tau profiles in brains of the hamster infected with scrapie strains 263 K or 139 A possibly associated with the alteration of phosphate kinases. *BMC Infect Dis* 10, 86.

Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975): A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 72 (5), 1858-1862.

Weise J, Crome O, Sandau R, Schulz-Schaeffer W, Bähr M, Zerr I (2004): Upregulation of cellular prion protein (PrPC) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. *Neurosci Lett.* 372, 146-150.

Whitehouse IJ, Miners JS, Glennon EB, Kehoe PG, Love S, Kellett KA, Hooper NM (2013): Prion Protein Is Decreased in Alzheimer's Brain and Inversely Correlates with BACE1 Activity, Amyloid- β Levels and Braak Stage. *PLoS One.* 8 (4), e59554doi: 10.1371/journal.pone.0059554.

Yehiely F, Bamborough P, Da Costa M, Perry BJ, Thinakaran G, Cohen FE, Carlson GA, Prusiner SB (1997): Identification of candidate proteins binding to prion protein. *Neurobiol Dis.* 3, 339-355.

Yoshida H, Terada S, Ishizu H, Ikeda K, Hayabara T, Ikeda K, Deguchi K, Touge T, Kitamoto T, Kuroda S (2010): An autopsy case of Creutzfeldt-Jakob disease with a V180I mutation of the PrP gene and Alzheimer-type pathology. *Neuropathology* 30, 159-164.

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

Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJ, Hopkins R, Smith DW, Heavens RP, Dawson GR, Boyce S, Conner MW, et al. (1995): beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81, 525-531.

Danksagungen:

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Inga Zerr für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Promotionsarbeit in der Abteilung Neurologie der Universitätsmedizin Göttingen bedanken.

Ein besonderer Dank geht an meinen Betreuer Dr. Matthias Schmitz, der mich von Anfang an zuverlässig und engagiert unterstützt hat. Seine Motivation und große Hilfsbereitschaft haben wesentlich zum Fortschritt und Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern im Prionenforschungslabor der Universitätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Inga Zerr.

Lebenslauf:

Ich wurde am 05.04.1986 in Braunschweig geboren. Von 1992 bis 1996 besuchte ich die Grundschule in Salzdahlum bei Wolfenbüttel und von 1996 bis 1998 die Orientierungsstufe Cranachstraße in Wolfenbüttel. Von 1998 bis 2005 besuchte ich das Gymnasium im Schloss in Wolfenbüttel, wo ich 2005 meine Hochschulreife erlangte. Im Sommersemester 2006 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen, welches ich am 07.12.2012 erfolgreich abschloss. Mit den Arbeiten zur vorliegenden Dissertation begann ich im Sommer 2009.