

Institut für Virologie der Technischen Universität München
Am Biederstein
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. V. Erfle)

Infektionsmodelle und Untersuchung der frühen Stadien der Prion-Infektion

Ingo Westner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. Schätzl
2. Univ.-Prof. Dr. V. Erfle

Die Dissertation wurde am 06.05.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Medizin am 10.12.2003 angenommen.

INHALT

1 EINLEITUNG 1

1.1 Humane spongiforme Enzephalopathien 1

1.2 Spongiforme Enzephalopathien im Tierreich 3

1.3 Von der „slow virus“- zur Prion-Hypothese 6

1.4 PrP^C und PrP^{Sc} 9

1.4.1 Struktur und Funktion von PrP^C 9

1.4.2 Struktur und „Funktion“ von PrP^{Sc} 11

1.5 Konversionshypthesen 14

1.5.1 Die „*nucleated seed*“-Hypothese 15

1.5.2 Die Heterodimer-Hypothese 16

1.6 Prionerkrankungen-verursachende Mutationen 18

1.7 vCJD 21

1.8 Speziesbarriere und „Strain“-Eigenschaften des Prions 22

1.8.1 Der Einfluss der Speziesbarriere auf die Übertragbarkeit von Prionerkrankungen 22

1.8.2 „*Strains*“ 22

1.9 „Conformational Diseases“ (Konformationskrankheiten) 24

1.10 Aufgabenstellung 27

2 MATERIAL 28

3 METHODEN 30

3.1 Sicherheitsvorkehrungen 30

3.2 Zellkultur 31

3.2.1 Zellen 31

3.2.2 Gewebekultur 32

3.2.3 Zellklonierung mittels Endpunkttitration 33

3.2.4 Kryokonservierung 34

3.2.4.1 Das Einfrieren von Zellen 34

3.2.4.2 Das Auftauen von Zellen 34

3.2.5	Wachstumskurven	34
3.3	Methoden zur PrP ^{Sc} -Herstellung für die Infektion.....	35
3.3.1	Präparation der Inokula	35
3.3.1.1	Überstände.....	35
3.3.1.2	Zellysate.....	35
3.3.1.3	Hirnhomogenate.....	36
3.3.2	PrP ^{Sc} -Inokulation.....	36
3.3.2.1	Inokulation mit Zellkultur-Überstand.....	36
3.3.2.2	Inokulation mit PrP ^{Sc} -Zellysaten.....	36
3.3.2.3	Infektion mit Hirnhomogenaten aus prion-infizierten Mäusegehirnen.....	37
3.4	Methoden zur Charakterisierung von PrP ^C und PrP ^{Sc}	38
3.4.1	Herstellung des Zellysats	38
3.4.2	Konzentrationsbestimmung der Proteine.....	39
3.5	Methoden zur elektrophoretischen Proteinauftrennung (SDS-PAGE)	40
3.5.1	Das Gelsystem.....	40
3.5.2	Probenvorbereitung und Referenzproben.....	41
3.5.2.1	Proteingrößenstandard.....	41
3.5.2.2	Kontrollen.....	41
3.5.3	Elektrophoresebedingungen	41
3.6	Westernblot-Analyse	42
3.6.1	Elektrotransfer auf Nitrozellulose- bzw. PVDF-Membranen (Blotting)	42
3.6.2	Färbung mit Poinceau-S	42
3.6.3	Blocken der Membran	43
3.6.4	Immunfärbung.....	43
3.6.5	Waschen und zweite Immunreaktion.....	44
3.6.6	Chemolumineszenz (ECL und ECLplus).....	44
3.6.7	„Stripping“ und „Reprobing“	45
3.7	Methoden zur Untersuchung der Apoptose-Induktion und Zytotoxizität	46
3.7.1	DNA-Fragmentationsassay	46
3.7.2	<i>In situ</i> Messung von Apoptosevorgängen (<i>TUNEL</i>).....	46
3.7.3	XTT-Proliferationstest.....	47
3.8	Methoden zur <i>in situ</i> Darstellung der Prion-Infektion	48
3.8.1	Immunfluoreszenz.....	48
3.8.2	Elektronenmikroskopie	48
3.8.2.1	Probenvorbereitung.....	48
3.8.2.2	Fixierung für Standard-EM.....	48

3.8.2.3	Fixierung und Färbung für Immuno-EM.....	49
3.9	Verwendete Puffer und Lösungen	50
3.9.1	Allgemeine Pufferlösungen	50
3.9.2	Puffer und Gele für die Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	51
3.9.3	Westernblot	53
3.9.4	Elektronenmikroskopie	54
3.9.4.1	Lösungen Standard-EM.....	54
3.9.4.2	Lösungen Immuno-EM.....	54
4	ERGEBNISSE	55
4.1	Charakterisierung persistierend PrP^{Sc}-infizierter Zellpopulationen.....	55
4.1.1	Bestimmung der Infektionsrate persistierend infizierter ScMHM2-Zellen.....	55
4.1.2	Vergleich von PrP ^C und PrP ^{Sc} -Expression in prion-infizierten Zellen.....	57
4.1.3	Stabilität der Infektion	59
4.1.3.1	Zeitkinetik.....	59
4.1.3.2	DMSO / chemische Chaperone	61
4.1.4	Zelluläre Proteine prion-infizierter Zellen im Vergleich mit uninfizierten Zellen	64
4.1.4.1	bNOS-Expression in ScMHM2-Zellen	64
4.1.4.2	Messung der Tyrosinphosphorylierung.....	65
4.1.4.3	Bestimmung der 14-3-3-Expression	67
4.1.4.4	Bestimmung der NSE- Expression.....	67
4.2	Infektion von kultivierten murinen Zellen mit Prionen	69
4.2.1	Reinfektion.....	69
4.2.1.1	Reinfektion vorher persistierend prion-infizierter Zellen mit Zelllysaten.....	69
4.2.1.2	Nachweis von <i>de novo</i> synthetisiertem PrP ^{Sc}	70
4.2.1.3	Bestimmung der Effektivität des Infektionsverfahrens und der Reinfektionsrate	71
4.2.1.4	PK-Resistenz des PrP ^{Sc} reinfizierter Zellen.....	71
4.2.2	<i>De novo</i> -Infektion.....	74
4.2.2.1	Infektion mit verschiedenen Prionenstämmen.....	74
4.2.2.2	Infektion von MHM2-Zellen.....	75
4.2.2.3	Effizienz der Infektion mit Gehirnhomogenaten	75
4.2.2.4	Infektion von GT1-Zellen	76
4.2.3	Erwerb von Detergens-Unlöslichkeit und PK-Resistenz von PrP ^{Sc} im Zeitverlauf.....	78
4.2.4	Subklonierung von <i>de novo</i> -infizierten Zellklonen.....	79
4.2.5	Vergleich von detergenslöslicher und -unlöslicher PrP-Fraktion.....	80
4.3	Morphologische Veränderungen von MHM2-Zellen nach Infektion mit PrP^{Sc}-Zelllysat	81
4.3.1	Ultrastrukturelle Veränderungen prion-infizierter Zellen	81

4.3.1.1	Morphologie uninfizierter MHM2-Zellen	82
4.3.1.2	Zellen unmittelbar nach Infektion mit Prionen.....	83
4.3.1.3	Zwölf bis 24 Stunden nach Infektion mit Prionen	84
4.3.1.4	MHM2-Zellen zwei bis drei Tage nach Inokulation mit Prionen.....	86
4.3.2	Verfolgung der Stadien der „ <i>early infection</i> “ mittels Immuno-EM	88
4.3.2.1	Fünfzehn Minuten nach Infektion.....	88
4.3.2.2	Dreißig Minuten nach Infektion	89
4.3.2.3	Sechzig Minuten nach Infektion	90
4.3.3	Vitalitätsuntersuchung von N2a-Zellen nach Infektion mit Prionen.....	91
4.3.3.1	Apoptose von N2a-Zellen nach Inokulation mit prionhaltigem Zellysat	91
4.3.3.2	Vitalitätsassay.....	92
5	DISKUSSION	93
5.1	Persistierend mit PrP ^{Sc} infizierte Zelllinien	93
5.1.1	Das chimäre MHM2 Prionprotein.....	93
5.1.2	Charakteristische Eigenschaften persistierend prion-infizierter Zellen	94
5.1.2.1	PrP ^{Sc} -Produktion in ScMHM2-Zellen.....	94
5.1.2.2	ScMHM2-Zellen können über viele Passagen persistierend infiziert bleiben.....	95
5.1.2.3	Einfluss chemischer Chaperone auf die Stabilität der Infektion.....	97
5.1.3	Expression zellulärer Markerproteine in ScMHM2-Zellen.....	98
5.1.3.1	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (bNOS)	98
5.1.3.2	Proteinphosphorylierung prion-infizierter MHM2-Zellen	99
5.1.3.3	14-3-3-„ <i>assay</i> “	100
5.1.3.4	Schlussfolgerung	101
5.2	Infektion mit Prionen	102
5.2.1	Reinfektionsexperimente als Vorstufe der <i>de novo</i> -Infektion	102
5.2.2	GT1- und MHM2-Zellen sind unterschiedlich gut infizierbar.....	103
5.2.3	<i>De novo</i> -Infektion von MHM2-Zellen mit Zellysaten und Hirnhomogenaten	103
5.2.4	Kinetik neuinfizierter Zellen: PrP-Intermediate	105
5.2.5	<i>In situ</i> -Verfolgung der frühen Infektionsstadien	109
5.3	Morphologische Veränderungen in prion-infizierten Zellen	110
6	ZUSAMMENFASSUNG	112
	LITERATURVERZEICHNIS	114
	ANHANG	123
	Abkürzungen	123

Eigene Veröffentlichungen.....	124
Publikationen	124
Kongressbeiträge	124
Danksagung	125
Lebenslauf	126

1 Einleitung

Krankheiten lassen sich im allgemeinen auf verschiedene Art und Weise systematisieren. Man kann sie – nur um einige wichtige Kriterien zu nennen – nach Ätiologie, Pathomechanismus oder Symptomatik einteilen. Bis vor einigen Jahren waren übertragbare Krankheiten immer auf das Vorhandensein nukleinsäurehaltiger Erreger zurückzuführen. Eine erst jüngst näher erforschte Gruppe von Erkrankungen lässt sich jedoch nicht ohne weiteres in dieses Schema einordnen. Die Erreger dieser Krankheiten verursachen seltene, aber tödlich verlaufende, neurodegenerative Erkrankungen bei Tier und Mensch, die sich auf andere Individuen – selbst über bestimmte Speziesgrenzen hinaus – übertragen lassen (Weissmann, 1996; Prusiner, 1998).

Bis zur Mitte der sechziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts konnten nur wenige Erkenntnisse über die Natur dieser Erreger gewonnen werden. Erste klinische Symptome treten äußerst spät nach Infektion auf, die Krankheiten schreiten nach ihrem Ausbruch aber rasch voran und enden immer tödlich. Der Symptomkomplex beinhaltet ein weites Spektrum klinischer und pathologischer Symptome. Man vermutete als Ursache zunächst eine ungewöhnliche Art von Viren und bezeichnete die Krankheiten als “*slow-virus-diseases*” (Sigurdsson, 1954).

Gemeinsam ist allen Krankheitsbildern eine spongiforme Enzephalopathie: Die lichtmikroskopische Untersuchung des zentralen Nervensystems (ZNS) zeigt einen Verlust von Neuronen und schwammartig durchlöchernde Hirnareale. Elektronenmikroskopisch ist schon vorher eine intrazelluläre Vakuolisierung der Neuronen zu sehen. Die fortschreitende Degeneration wird nicht von inflammatorischen Zellen begleitet, sondern geht mit einer Aktivierung der Astrocyten einher, die eine typische Antwort auf Gehirnverletzungen ist (reaktive Gliose). Variabel bei den einzelnen Syndromen ist der Befund von amyloiden Plaques, der auf Proteinablagerungen, die einen hohen Gehalt an β -Faltblattstruktur haben, zurückzuführen ist. (Bessen, 1996) In einigen Fällen beobachtet man im Lichtmikroskop eine Schwellung der Neuronen, Mikroglie und eine abnormale Dendritenbildung (Weber und Aguzzi, 1997a).

1.1 *Humane spongiforme Enzephalopathien*

Als erste beschrieben Hans Gerhard Creutzfeldt und Alfons Jakob in den Jahren 1920 und 1921 insgesamt sechs Fälle bis dahin unerkannter herdförmiger Erkrankungen des ZNS. Die Inzidenz der nach ihren Entdeckern benannten Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (CJD) beträgt etwa 1:1.000.000 und ist weltweit relativ konstant. Der größte Teil der spongiformen Erkrankungen tritt sporadisch mit einem Altersgipfel im sechsten Lebensjahrzehnt auf, eine familiäre Häufung ist nur in zirka 10% der Fälle nachweisbar. Als Leitsymptom steht bei der sporadischen CJD der kognitive Abbau im Vordergrund, später kommt es zu visuellen und zerebellären Störungen, die sich vor allem in Gangataxien äußern. Seltener kommt es zu Zeichen einer Pyramidenbahnstörung und unwillkürlichen Bewegungen. Die neurologische Symptomatik schreitet rasch fort und führt nach einigen Monaten zum Tode.

In diese Gruppe von Erkrankungen wurden auch die hereditären Erkrankungen Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) (erstmalig 1928 und 1936 beschrieben) mit einer Prävalenz von 1:10⁷ (Rabenau, 1997) und die Tödliche Familiäre Insomnie (FFI) eingeteilt (Kretzschmar und Dahme, 1990).

1957 beschrieben Carleton Gajdusek und Vincent Zigas eine Krankheit des Fore-Stamms der Ureinwohner Papua-Neuguineas, die dort als Kuru bezeichnet wurde und die bei den Fore bis in die 60er Jahre die häufigste Todesursache darstellte (Kimberlin, 1992; Bessen, 1996). Zu den Erkrankten gehörten vor allem Frauen und Kinder. Die Betroffenen verloren zuerst ihre Koordinationsfähigkeit und zeigten zunehmend motorische Auffälligkeiten. Ungefähr ein Jahr nach ihrem Ausbruch führte die Krankheit zum Tod. Ursache für die hohe Inzidenz von Kuru war die dortige Tradition des rituellen endogenen Kannibalismus. Mit Beendigung dieser Praktik sank die Inzidenz für Kuru deutlich, obwohl nach wie vor einige Fälle auftreten, die wohl das obere Ende der Inkubationszeit markieren (Ironsides, 1998).

1.2 Spongiforme Enzephalopathien im Tierreich

Seit mehr als 250 Jahren ist aus dem Tierreich die so genannte Traberkrankheit bekannt und erforscht worden, die ein ähnliches histopathologisches Bild aufweist wie die humanen spongiformen Enzephalopathien. Es handelt sich um eine endemische Infektionskrankheit bei Schafen und Ziegen. Sie wird im englischen Sprachraum als Scrapie (*to scrape*: kratzen, wetzen) bezeichnet, weil sich die erkrankten Tiere z.B. an Pfosten aufscheuern. Die klassischen Scrapie-Symptome sind oben genannter Pruritus, Koordinationsstörungen und Gangataxie. Scrapie wird von Muttertieren auf die Nachkommen übertragen, aber auch horizontale Übertragungen sind beobachtet worden. Anscheinend spielt hierbei die infektiöse Plazenta eine Rolle. Bereits 1936 hatte man erkannt, dass Scrapie ein übertragbarer Erreger zugrunde liegen müsse. Damals kam es zu einem Scrapie-Ausbruch bei mehreren hundert Schafen nachdem die Tiere zuvor eine Enzephalitis-Impfung gegen die „*louping-ill*“-Krankheit erhalten hatten, wobei der Impfstoff mit dem Scrapie-Erreger kontaminiert war (Bessen, 1996).

Die bei weitem bekannteste und nicht nur aufgrund der hohen Fallzahl wichtigste Erkrankung dieser Art stellt die Bovine Spongiforme Enzephalopathie, die kurz als BSE oder „Rinderwahnsinn“ bezeichnet wird, dar.

BSE ist eine durch den Menschen verursachte Erkrankung. Grundlage für die Infektion ist die Verfütterung aufgearbeiteter, prion-infizierter Tierkadaver an Wiederkäuer. Im November 1986 erstmalig beobachtet (Wells *et al.*, 1987), breitete sich BSE epidemieartig in Großbritannien aus. In den Folgejahren stieg die Zahl der erkrankten Kühe dramatisch an und erreichte in den Jahren 1992 und 1993 ein Maximum. Aufgrund des Verbots der Verfütterung unzureichend inaktivierten Tiermehls sanken die Fallzahlen in den folgenden Jahren.

Inzwischen treten in England nur noch vereinzelt Neuerkrankungen auf (siehe Abbildung 1). In mehreren EU-Ländern, unter anderem auch in Deutschland, wurden nach Einführung geeigneter Testverfahren seit Herbst 2000 ebenfalls BSE-positive Rinder identifiziert. Im Jahr 2000 wurden 7 Rinder als BSE-positiv bestätigt, bis Ende Dezember 2002 kamen weitere 231 Fälle hinzu.

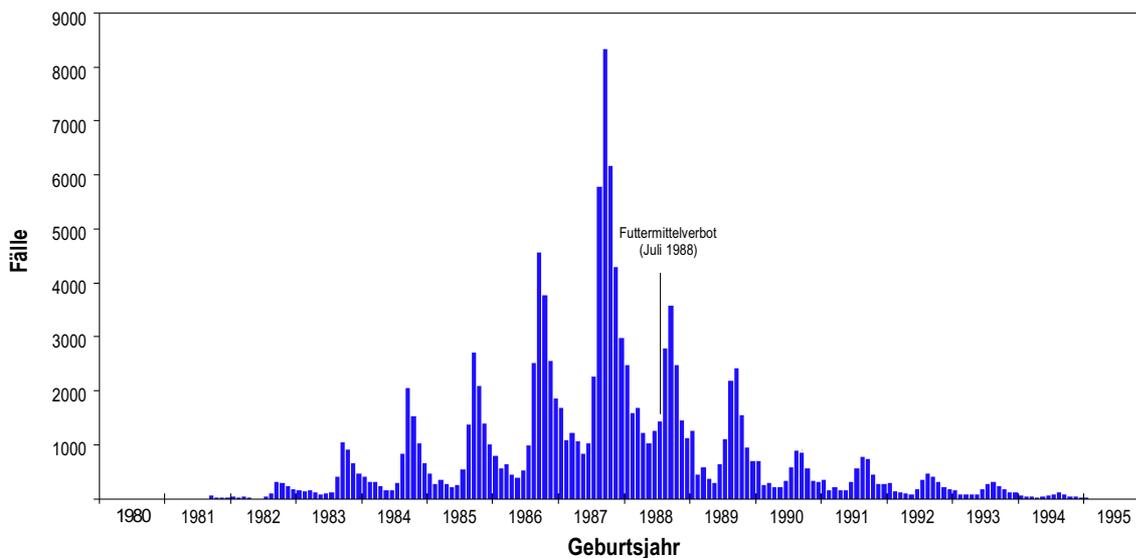


Abbildung 1: Abhängigkeit bestätigter BSE-Fälle vom Geburtsdatum (=Alter) der Tiere. Aus der Abbildung geht hervor, dass die Mehrzahl der infizierten Tiere in der 2. Hälfte des Jahres 1987 geboren wurde. Mit dem Verbot von Tiermehl als Futtermittel sank die Inzidenz der infizierten Tiere signifikant. (Quelle: Department of Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA))

Tabelle 1: Zum Zeitpunkt 31. Dezember 2002 bestätigte BSE-Fälle nach Bundesländern (Quelle: Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, 2003)

Bundesland	2000	2001	2002	gesamt
<i>Baden-Württemberg</i>	-	12	11	23
<i>Bayern</i>	5	59	27	91
<i>Berlin</i>	-	-	-	-
<i>Brandenburg</i>		3	4	7
<i>Bremen</i>	-	-	-	-
<i>Hamburg</i>	-	-	-	-
<i>Hessen</i>	-	3	2	5
<i>Mecklenburg-Vorpommern</i>	-	2	4	6
<i>Niedersachsen</i>	1	17	27	45
<i>Nordrhein-Westfalen</i>	-	2	2	4
<i>Rheinland-Pfalz</i>	-	4	6	10
<i>Saarland</i>	-	1	-	1
<i>Sachsen</i>	-	4	4	8
<i>Sachsen-Anhalt</i>	-	4	4	8
<i>Schleswig-Holstein</i>	1	12	14	27
<i>Thüringen</i>	-	2	1	3
Bundesrepublik Deutschland	7	125	106	238

Eine weitere übertragbare spongiforme Enzephalopathie (*Transmissible Spongiforme Encephalopathy*, TSE) ist bei Zuchtnerzen beschrieben worden, die so genannte *Transmissible Mink Encephalopathy* (TME). Übertragen wird sie vermutlich durch Scrapie-infiziertes Schaffleisch. TME war noch vor BSE die erste übertragbare spongiforme Enzephalopathie, für die der Mensch aufgrund unsachgemäßer Fütterungspraktiken verantwortlich ist.

Ein weiterer Verwandter der Scrapie-Erkrankung ist die *Chronic Wasting Disease* (CWD) einiger Hirscharten Nordamerikas, die Ende der sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts in Colorado, USA entdeckt wurde. CWD ist die einzige bisher bekannte Prionerkrankung, die bei frei lebenden Tieren vorkommt. In den Jahren 2001 und 2002 hat sich die CWD massiv ausgebreitet und hat eine Prävalenz von 1-15% bei frei lebenden Hirschen und von über 50% bei Zuchttieren (Williams, 2002, Peters *et al.*, 2000).

1.3 Von der „slow virus“- zur Prion-Hypothese

Hadlow erkannte 1959 als erster einen Zusammenhang zwischen Scrapie und Kuru aufgrund der ähnlichen neuropathologischen Veränderungen (Hadlow, 1959). Es konnte gezeigt werden, dass auch Kuru eine auf Primaten übertragbare Enzephalopathie darstellt. Man postulierte damals ein Virus bzw. virusartiges Agens für diese beiden Erkrankungen, das sich jedoch genaueren Untersuchungen entzog und beschrieb den Erreger nach seinen Eigenschaften als „slow virus“, da er sehr klein sein musste und ungewöhnlich resistent gegen konventionelle Inaktivierungsmethoden für Mikroorganismen und Viren war. Eine sichere Abtötung des Erregers lässt sich erst durch Autoklavierung bei mehr als 134°C für 1 Stunde oder durch Verwendung von 1-2 M NaOH erreichen. Die aktuellen Richtlinien des Robert-Koch-Instituts zur Dekontamination von prionhaltigem Material sind in den nachfolgenden Tabellen angegeben.

Tabelle 2: Wirksamkeit verschiedener bei der Aufbereitung von Medizinprodukten eingesetzter Verfahren zu Dekontaminierung von Instrumenten bzw. Inaktivierung von Prionen (Bundesgeshbl. 4/2002: 376-394).

Mindestens partiell wirksame Verfahren/Mittel	Unwirksame Verfahren/Mittel
Sorgfältige (insbesondere alkalische) Reinigung*	Alkohol
1 M NaOH* mindestens 1 h, 20°C	Aldehyde; Formaldehyd-Gas
2,5–5% NaOCl* mindestens 1 h; 20°C	Ethylenoxid-Gas
(mindestens 20.000 ppm Chlorgehalt)	H ₂ O ₂
≥4M GdnSCN* mindestens 30 Minuten; 20°C	Phenole
Dampfsterilisation	Iodophore
	HCl
	Trockene Hitze
	UV-Strahlung
	Ionisierende Strahlung

*Auf die Notwendigkeit einer sorgfältigen Nachspülung zur Entfernung schädlicher Rückstände wird ausdrücklich hingewiesen.

Tabelle 3: Generelles Vorgehen bei der Aufbereitung von Medizinprodukten auf der Grundlage der Anlage zur Richtlinie für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention „Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten“ vom November 2001, Bundesgesundheitsblatt S 1115–1126: a) Thermostabile (dampfsterilisierbare) Medizinprodukte; b) Thermolabile (nicht dampfsterilisierbare) Medizinprodukte (Bundesgeshbl. 4/2002: 376-394).

a) Thermostabile (dampfsterilisierbare) Medizinprodukte		
<i>1. Nichtfixierende Vorbehandlung/Vorreinigung</i>		
Medizinprodukte der Gruppen Semikritisch A, Kritisch A und B1 Direkter Kontakt mit ZNS, Augenhintergrund, eröffnetem lymphatischen Gewebe möglich (bzw. aus Gründen der Praktikabilität alle Instrumente)	Medizinprodukte der Gruppen Semikritisch A und Kritisch A¹ Kein direkter Kontakt mit ZNS, Augenhintergrund, eröffnetem lymphatischen Gewebe	
<i>2. Optimierte (validierte) maschinelle, alkalische Reinigung/Desinfektion², ggf. Ultraschallbehandlung³</i>	<i>2. Optimierte, standardisierte manuelle Reinigung/Desinfektion (z.B. auch pH-neutral) möglich, ggf. Ultraschallbehandlung</i>	
<i>3. Dampfsterilisation bei 134°C; Haltezeit mind. 5 Minuten</i> Ggf. Dampfsterilisation bei 134°C, Haltezeit 18 Minuten, insbesondere in HNO-, Augenheilkunde und Neurochirurgie, insbesondere wenn maschinelle alkalische Reinigung nicht zuverlässig möglich ist	<i>Dampfsterilisation bei 121°C; Haltezeit mind. 20 Minuten möglich</i>	
<p>¹Gemäß der Definitionen der Anlage zur Richtlinie für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention "Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten" vom November 2001, ²z.B.: vorspülen, alkalisch reinigen (pH >10, bei erhöhter Temperatur, z.B. 55°C), zwischenspülen, thermisch desinfizieren/nachspülen, ³Beachtung der Angaben der Hersteller der Medizinprodukte und der geeigneten Reiniger.</p>		
b) Thermolabile (nicht dampfsterilisierbare) Medizinprodukte		
Semikritisch B1 Definitionsgemäß kein direkter Kontakt mit ZNS, Augenhintergrund, eröffnetem lymphatischen Gewebe	Kritisch C1 Kein direkter Kontakt mit ZNS, Augenhintergrund, eröffnetem lymphatischen Gewebe, Ileum	Bestimmungsgemäßer direkter Kontakt mit ZNS, Augenhintergrund, eröffnetem lymphatischen Gewebe, Ileum
<i>1. Nichtfixierende Vorbehandlung/Vorreinigung</i>		
<i>2. Optimierte, standardisierte manuelle Reinigung/Desinfektion (z.B. auch pH-neutral), ggf. Ultraschallbehandlung</i>	<i>2. Optimierte maschinelle, alkalische Reinigung/Desinfektion, ggf. Ultraschallbehandlung</i>	
<i>3. Ggf. geeignete Sterilisation oder abschließende Desinfektion (auch unter Einbeziehung von Aldehyden nach nichtfixierender Reinigung)</i>	<i>3. Geeignete Sterilisation</i>	Die erneute Anwendung dieser Medizinprodukte ist im Detail zu klären (Risikoanalyse); in der Regel Wiederverwendung nur, wenn keine operationstechnisch gleichwertigen Einwegprodukte verfügbar sind
Z.B. flexibles Endoskop, (endoskopisches Zusatzinstrumentarium: s. thermostabile Medizinprodukte Gruppe Kritisch B!)		
<p>¹Gemäß der Definitionen der Anlage zur Richtlinie für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention "Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten" vom November 2001.</p>		

In den 60er Jahren zeigten Tikvah Alper *et al.*, dass der Scrapie-Erreger auch weitgehend resistent gegen ionisierende und UV-Strahlung ist. Sie kamen zu dem Schluss, dass der Erreger wohl keine Nukleinsäure enthalten könne (Alper *et al.*, 1966; Alper *et al.*, 1967).

Aufgrund der Datenlage schlugen Gibbons und Hunter 1967 vor, dass das Scrapie-Agens wohl die dreidimensionale Struktur eines allgemeinen Membranbestandteils verändere (Gibbons und Hunter, 1967). Ein neurotropes „*slow virus*“ erschien ihnen vor allem aufgrund der Resistenz gegen radioaktive Strahlung nicht plausibel. Auch ein Protein (im speziellen ein Nucleohiston) oder ein selbstreplizierendes Polysaccharid zogen sie in Betracht, favorisierten aber schließlich die Hypothese, dass es sich um eine Teilstruktur der Zellmembran handeln müsse, die für ein sterisches Rearrangement der Zellmembran verantwortlich sei.

Der Mathematiker J.S. Griffith führte in der gleichen Zeitschrift (Griffith, 1967) aus, dass der Erreger durchaus ein Protein sein könne, ohne grundlegende molekularbiologische Erkenntnisse zu verletzen. Er konnte gleich drei Modelle für ein aminosäurebasiertes Agens anführen, a) eine Art „Inducer“-Protein für ein inaktives zelluläres Gen - analog zum Jacob-Monod-Modell, b) die Benutzung eines bereits vorhanden zellulären Replikationsmechanismus des Wirts durch den Erreger und c) einen Selbstreplikationsmechanismus durch Di- bzw. Oligomerisation eines Proteins, welches als infektiöses Agens andere Proteine bindet, und konvertieren kann oder sie analog zu einem Kristallisationskeim (er benutzt im Originaltext „Kondensationskeim“) polymerisiert. Griffith selbst schien Möglichkeit c) am plausibelsten, da diese keinen komplizierten zellulären Mechanismus voraussetzt.

Griffiths Modell bildete letztlich die Grundlage für die „*protein only*“-Hypothese Stanley Prusiners, der diese Idee nicht nur aufgriff, sondern erweiterte und experimentell untermauerte (Prusiner, 1982).

1.4 Pr^{PC} und Pr^{PSc}

Zwischen 1980 und 1982 gelang es Stanley Prusiner, das Scrapie-Agens aus Präparaten infizierter Hamsterhirne aufzureinigen (Prusiner, 1982; Bolton *et al.*, 1982; Prusiner *et al.*, 1982). Es handelte sich um ein relativ proteaseresistentes Protein, das er aufgrund seines Molekulargewichts nach Proteinase K-Behandlung als PrP 27-30 bezeichnete. Prusiner bezeichnete den Scrapie-Erreger aufgrund der ausgeprägten Resistenz gegen chemisch-physikalische Inaktivierungsversuche, der Sensitivität gegenüber Inaktivierungsstrategien gegen Eiweiße und des offensichtlichen Fehlens von Nukleinsäuren als „*proteinaceous infectious agent*“ und prägte als Kurzform den Begriff „Prion“ (Prusiner, 1982).

Nach Bestimmung der N-terminalen Nukleinsäuresequenz durch Prusiner konnten Oesch *et al.* und Chesebro *et al.* zeigen, dass die PrP-mRNA-Konzentration in gesunden und Scrapie-erkrankten Tieren gleich ist (Chesebro *et al.*, 1985). Die anschließende Suche nach dem physiologischen Genprodukt von PrP 27-30 war 1985 erfolgreich und gipfelte in der Entdeckung von Pr^{PC}. Pr^{PC} wird von einem Exon kodiert (Oesch *et al.*, 1985; Basler *et al.*, 1986). Pr^{PC} (C = „*cellular*“) stellte sich als das zelluläre Gegenstück zum Scrapie-Erreger Pr^{PSc} (Sc = „*Scrapie*“) heraus (Pan *et al.*, 1992).

1.4.1 Struktur und Funktion von Pr^{PC}

Pr^{PC} ist ein Sialoglykoprotein (Bolton *et al.*, 1985, Endo *et al.*, 1989), welches mittels eines C-terminalen GPI-Ankers an die Zelloberfläche gebunden ist. (Stahl *et al.*, 1987). Physiologisch kommt Pr^{PC} in der Zelle zum einen als Pr^{PC}-I mit einer Größe von 33-35 kDa vor. Zudem existiert ein 25-27 kDa schweres Pr^{PC}-II, welches zwischen den Aminosäuren 112 bis 138 proteolytisch verkürzt ist. Im Gegensatz zu PrP 27-30 ist Pr^{PC} nicht proteaseresistent.

Es wird in einer gleich bleibenden Menge vor allem in den Neuronen des zentralen Nervensystems gebildet, während es bei der Gehirnentwicklung einer starken Regulation unterliegt (Kretzschmar *et al.*, 1986). Die Pr^{PC}-Synthese erfolgt im endoplasmatischen Retikulum. Nach der Prozessierung im Golgiapparat wird das Protein an die Zelloberfläche transportiert, an die es mittels seines GPI-Ankers gebunden ist. Man fand kürzlich auch zwei Transmembranformen von Pr^{PC}, bei welchen der N-Terminus bzw. C-Terminus ins Cytosol gerichtet ist (Hegde *et al.*, 1998). Es gibt Hinweise, dass sich Pr^{PC} in so genannten „*rafts*“ (cholesterinreichen Mikrodomänen) der Zellmembran anreichert (Naslavsky *et al.*, 1997; Shyng *et al.*, 1993; Taraboulos *et al.*, 1995; Vey *et al.*, 1996). Pr^{PC} tritt wahrscheinlich durch diese cholesterinreichen Mikrodomänen wieder in die Zelle ein, wo es zirkuliert bzw. proteolytisch zu Pr^{PC}-II abgebaut wird (Kaneko *et al.*, 1997a).

Riek *et al.* konnten als erste ein NMR-Strukturmodell des C-terminalen Bereichs des murinen Pr^{PC} ab Aminosäure 121 erstellen, welches mit den computergestützten Strukturvorhersagen annähernd übereinstimmte (Riek *et al.*, 1996). Die Tertiärstruktur von Pr^{PC} 121-231 weist allerdings nicht die vier vorhergesagten α -Helices auf, sondern nur drei, deren räumliche Orientierung stark vom Computermodell abweicht.

Zwei kurze Abschnitte von PrP^C haben eine β -Faltblattstruktur. Man vermutete in diesem Abschnitt den Ausgangspunkt der Konformationsänderung von den Helices zum Faltblatt.

Das N-terminale Segment mit den Aminosäuren 23-108 enthält fünf charakteristische, hochkonservierte Oktapeptidmuster, so genannte „Oktarepeats“, die aufgrund ihrer hohen Flexibilität einer Strukturbestimmung nicht zugänglich waren.

Donne *et al.* zeigten am Hamster-PrP^C, dass sich dessen Struktur nur geringfügig vom murinen Prion unterscheidet. Die α -Helix B umfasst 6, Helix C 10 Aminosäuren mehr (Donne *et al.*, 1997). 1997 konnten Riek *et al.* fast gleichzeitig mit James und Donne ein Strukturmodell des Volllängen-PrP^C vorlegen, welches die zuvor gefundenen Modelle weitestgehend bestätigte (Riek *et al.*, 1997; James *et al.*, 1997). Bemerkenswert an der Prion-Struktur war die Erkenntnis, dass das Segment 121-231 eine autonome Faltungseinheit darstellt.

Die Struktur des N-terminalen Bereichs (Aminosäuren 23-120) konnte nicht weiter in seiner Struktur bestimmt werden. Man muss davon ausgehen, dass er hochflexibel ist und keine bleibende Konformation annimmt. Die Funktionalität dieses histidinreichen Oktarepeat-Bereiches ist Gegenstand jüngster Forschung. Es gibt Hinweise darauf, dass dieser Abschnitt bei physiologischem pH Cu²⁺-Ionen bindet und Peroxidase-Aktivität besitzt (Kramer *et al.*, 2001; Kretzschmar *et al.*, 2000).

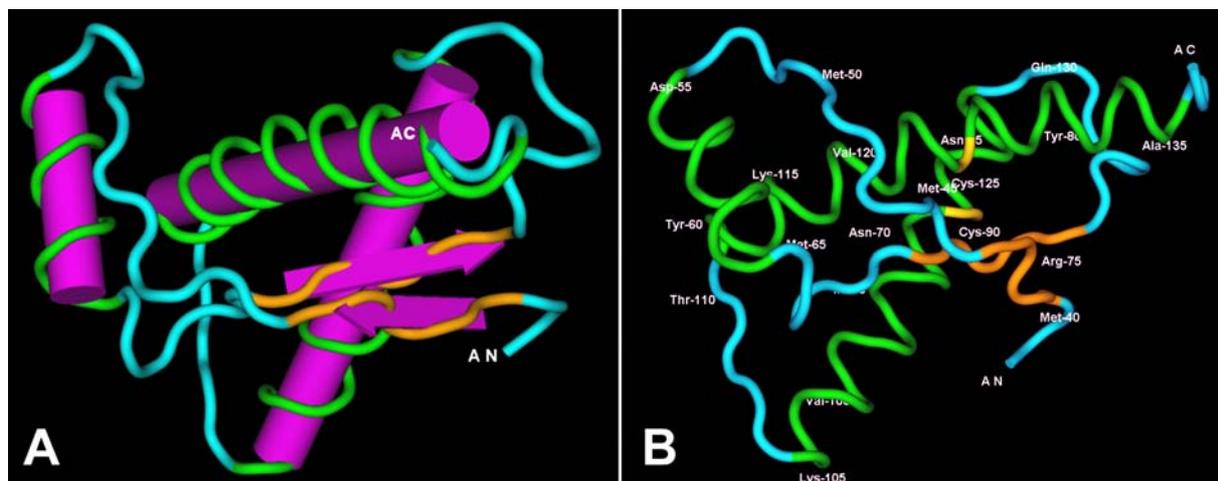


Abbildung 2: NMR-Strukturmodell des PrP^C des syrischen Hamsters, Aminosäuren 90-231: Grün: α -helikale Bereiche. Orange: β -Faltblattstrukturen. AC: C-Terminus. AN: Aminoterminus. (A) Die Zylinder und Pfeile markieren die helikalen Domänen bzw. den Bereich der antiparallelen Faltblätter. (B) Darstellung des Proteinbackbones mit Angabe der jeweils zehnten Aminosäure. Gelb markiert die beiden Cysteine, die eine Disulfidbrücke bilden. Zugrundeliegende Daten: Donne *et al.*, 1997. Generiert mit Cn3D.

Während und nach der Translation der PrP^C-kodierenden mRNA erfolgen eine Reihe von Modifikationen am synthetisiertem Polypeptid, die in Tabelle 4 zusammengefasst sind:

Tabelle 4: Posttranslationale Modifikationen von PrP^C

<i>Posttranslationale Modifikationen von PrP^C</i>
Abspaltung eines 22 Aminosäuren langen Signalpeptids
Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen an Position 179 und 214
Glykosylierung der Asparaginreste an Position 181 und 197
Bindung eines GPI-Ankers am C-Terminus (AS-Position 231)

1.4.2 Struktur und „Funktion“ von PrP^{Sc}

PrP 33-35 wird durch Proteasen bis auf einen proteaseresistenten Kern (PrP 27-30) verdaut. Im Unterschied zu PrP^C fehlt PrP 27-30 (PrP^{Sc}) der N-terminale Bereich bis zur Aminosäure 90. Der Abschnitt 90-120 ist gegen Proteolyse geschützt, was auf einen maßgeblichen strukturellen Unterschied zu PrP^C hindeutet (Prusiner, 1998).

Schon länger bekannt ist, dass ein großer Teil des Proteins (>50%) im Gegensatz zu PrP^C in β -Faltblattform vorliegt. Nur ca. 20% der Sekundärstruktur weisen α -helikalen Charakter auf (Riek *et al.*, 1997). Eine Strukturanalyse von PrP^{Sc} mittels Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie ist aufgrund der Unlöslichkeit dieser Isoform nicht möglich. Das Prion als kleinste infektiöse Einheit besteht zum Großteil, vielleicht auch ausschließlich aus PrP^{Sc}-Untereinheiten. Das Verhältnis PrP^{Sc} zu infektiöser Einheit beträgt in etwa 10^5 zu 1 (McKinley *et al.*, 1986).

Vor kurzem konnten Wille *et al.* mit Hilfe von Elektronenkristallographie ein PrP^{Sc}-Modell eines 2D-Kristalls, bestehend aus N-terminal trunkierten PrP (PrP 27-30), erstellen. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Teile der PrP^{Sc}-Struktur aus parallelen β -Faltblättern bestehen (Abbildung 3, A und E). Im vorgeschlagenen Modell formen mehrere PrP^{Sc}-Untereinheiten ein planares Oligomer, das Grundlage für eine fibrilläre Struktur von Prionaggregaten sein könnte (Wille *et al.*, 2002).

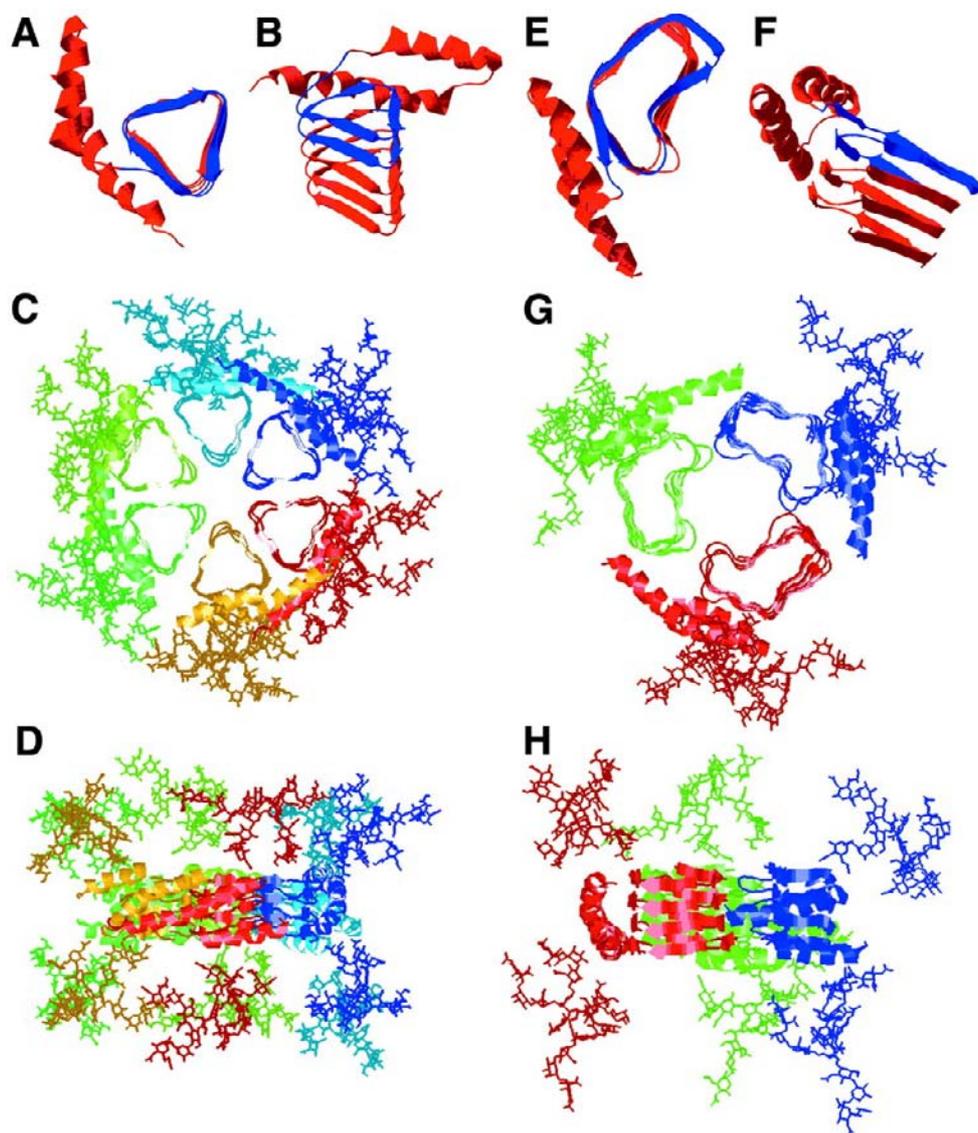


Abbildung 3: PrP^{Sc}-Strukturmodelle anhand elektronenkristallographischer Daten: **A** und **B**: Draufsicht und Seitenansicht von PrP 27-30 mit einer linksgängigen β -Helix. **C** und **D**: Draufsicht und Seitenansicht eines Oligomers mit linksgängiger β -Helix. **E** und **F**: Draufsicht und Seitenansicht von PrP 27-30, das mit einer rechtsgängigen β -Helix modelliert wurde. **G** and **H**: Oligomermodell bestehend aus rechtsgängigem β -helikalem PrP 27-30 Wille *et al.*, 2002.

Sowohl PrP^C als auch PrP^{Sc} stellen somit zwei in ihren Eigenschaften völlig unterschiedliche Produkte desselben Gens dar. Bis jetzt gibt es keinen Hinweis auf ein Vorläuferprotein („*precursor*“), alternatives „*Splicing*“ oder eine Verschiebung des Leserahmens. Dem stehen die unterschiedlichen Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc} gegenüber, die in der folgenden Tabelle zusammengefasst sind:

Tabelle 5: Biochemische Unterschiede zwischen PrP^C und PrP^{Sc}

<i>PrP^C</i>	<i>PrP^{Sc}</i>
Labil/hoher <i>turnover</i> (kurze Verweildauer in der Zelle; $t_{1/2}$ ca. 3 h)	Stabil/niedriger <i>turnover</i> (lange Verweildauer in der Zelle; $t_{1/2}$ >14 h)
proteasesensitiv	relativ proteaseresistent (aus PrP 33-35 wird PrP 27-30)
durch PIPLC (Phospho-Inositol-Lipase C) von der Zellmembran ablösbar	nicht durch PIPLC ablösbar (vermutlich in intrazellulären Aggregaten)
löslich in Detergentien	unlöslich in Detergentien
keine Aggregation	Aggregation in Gegenwart von Detergens
überwiegend α -helikale-Struktur	hauptsächlich β -Faltblatt-Struktur
nicht toxisch	toxisch für Zellen
nicht infektiös	infektiös
physiologisches Produkt des PrP-Gens	pathologische Isoform

1.5 Konversionshypothesen

Experimente bestätigten, dass die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} einem posttranslationalen Prozess unterliegt, der vor der Prion-Ablagerung in Lysosomen erfolgt (Basler *et al.*, 1986; Borchelt *et al.*, 1990; Taraboulos *et al.*, 1990; Caughey *et al.*, 1991). Gabizon zeigte, dass die Sekundärstruktur von PrP 27-30 eng mit der Infektiosität von Scrapie zusammenhängt (Gabizon *et al.*, 1987). Aufgrund der vorliegenden Daten formulierte Prusiner 1992 die Hypothese, dass sich PrP^C und PrP^{Sc} möglicherweise nur durch ihre sterische Konformation unterscheiden (Prusiner, 1992).

Die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} setzt eine physische Assoziation der beiden Isoformen voraus. Wie Priolas und Prusiners Untersuchungen zur Speziesbarriere zeigen (Priola und Chesebro, 1995; Prusiner *et al.*, 1990), muss dabei ein direkter Kontakt zwischen der pathologischen und der physiologischen Form erfolgen. Auch durch *in vitro*-Konversionsexperimente mit gereinigtem PrP^{Sc} gab es eindeutige Hinweise, dass PrP^{Sc} mit PrP^C unmittelbar interagiert und als Matrize („*template*“) für das zu konvertierende PrP^C dient (Raeber *et al.*, 1992).

Für diesen bis jetzt ungeklärten Konversionsvorgang gibt es im wesentlichen zwei Modelle: a) die „*nucleated seed*“-Hypothese (Kristallisationskeim-Hypothese) und b) die Heterodimer-Hypothese.

1.5.1 Die „nucleated seed“-Hypothese

Die „nucleated seed“-Hypothese oder Kristallisationskeim-Hypothese stützt sich vor allem auf Experimente im zellfreien System und setzt bereits aggregiertes PrP^{Sc}-Polymer als „template“ voraus. Basierend auf Gajduseks Vorstellung (Gajdusek, 1989), dass sich PrP^{Sc} in einem autokatalytischen Prozess gleich dem Vorgang einer Kristallbildung aneinander lagert, schlug die Arbeitsgruppe um Lansbury vor, dass auch die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} einer Kristallisation ähnelt, bei der ein PrP^{Sc}-Polymer den Kristallisationskeim bildet (Come *et al.*, 1993). PrP^C polymerisiert am wachsenden PrP^{Sc}-Keim und wird dabei in PrP^{Sc} umgewandelt. Der Vorgang führt zur Bildung von Fibrillen und Amyloidablagerungen. Einige Argumente sprechen jedoch gegen diese Hypothese: Der Vorgang verläuft sehr ineffizient und benötigt zudem eine beträchtliche Menge an PrP^{Sc} als Kristallisationskeim (Ironside, 1998).

In neueren Experimenten konnte dieser langsame Kristallisationsprozess durch intermittierendes Sonifizieren beschleunigt werden (Saborio *et al.*, 2001; Soto *et al.*, 2002). Bis jetzt konnte – nicht zuletzt aufgrund der geringen Ausbeute – die Infektiosität dieses „synthetischen“ PrP^{Sc} nicht bewiesen werden.

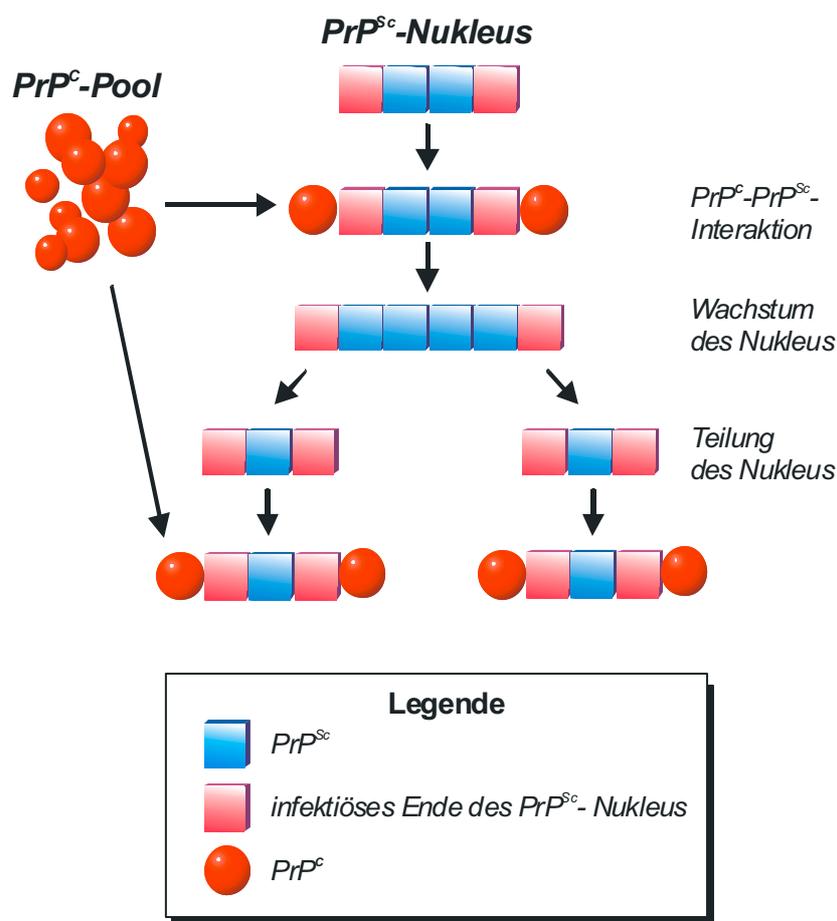


Abbildung 4: „Nucleated seed“-Hypothese: PrP^C aus dem endogenen PrP^C-Pool lagert sich an die infektiösen Enden des PrP^{Sc}-Nukleus und wird zu PrP^{Sc} konvertiert. Der Nukleus wächst und teilt sich.

1.5.2 Die Heterodimer-Hypothese

Voraussetzung für dieses Modell ist der unmittelbare physikalische Kontakt der jeweils als Dimere vorliegenden Moleküle PrP^C und PrP^{Sc} (in idealisierter Form). Als PrP^C-Bindungsstelle könnten die Aminosäurereste 97-167 fungieren (Riek *et al.*, 1997). Das mit PrP^C in Wechselwirkung tretende PrP^{Sc} induziert eine Veränderung der Sekundärstruktur von PrP^C, die zu einer Reduktion des α -Helixanteils führt. Gleichzeitig erhöht sich der Anteil der β -Faltblattstruktur signifikant (von 3% auf 43%).

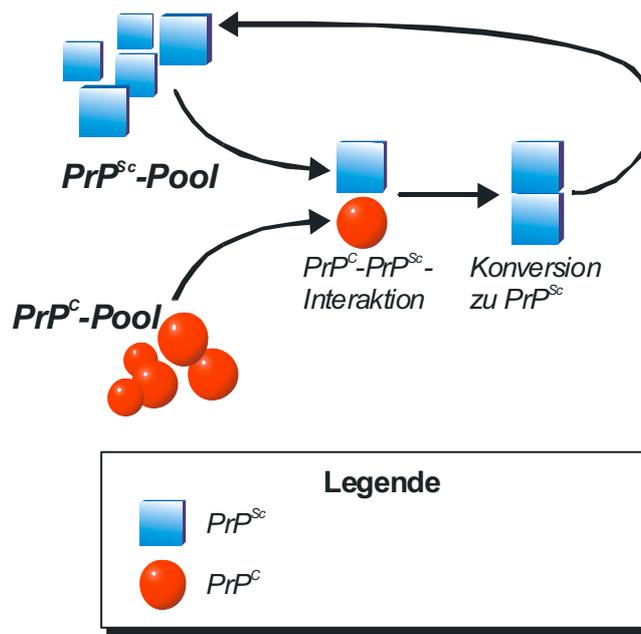


Abbildung 5: „Template“-Modell: PrP^C aus dem endogenen PrP^C-Pool bildet mit einem PrP^{Sc}-Molekül ein Heterodimer. PrP^C wird zu PrP^{Sc} konvertiert und erhöht den PrP^{Sc}-Pool.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Konversion über eine oder mehrere Zwischenstufen abläuft. Für die Intermediate wurde die Bezeichnung PrP* vorgeschlagen.



Abbildung 6: Heterodimer-Hypothese (Lundberg *et al.*, 1997).

Experimente legen den Schluss nahe, dass ein bis jetzt noch nicht identifiziertes „Protein X“ bei der Konversion unmittelbar beteiligt ist und im Sinne eines Chaperons hilft, die Energiebarriere zur Umfaltung zu überwinden. „Protein X“ scheint auch neben *Prn-p*-Sequenz und Prion-„strain“ eine wichtige Position im Hinblick auf die Speziesbarriere zu haben (Telling *et al.*, 1995). Als geeignete Interaktionsstellen könnten die Aminosäurereste zwischen den Positionen 160-180 und 205-231 fungieren, wie Kaneko *et al.* durch Aminosäuresubstitution feststellten (Kaneko *et al.*, 1997b).

Das neu gebildete PrP^{Sc} multimerisiert und entwickelt sukzessive mit der Größe des Aggregats seine charakteristischen Eigenschaften (Post *et al.*, 1998). Für diese Hypothese spricht das graduelle Auftreten von Unlöslichkeit, gefolgt von PK-Resistenz und Amyloidbildung.

Der letztlich aus diesem Vorgang folgende Zelltod ist ein sehr komplexer, bis jetzt unverstandener Mechanismus. In Experimenten fand man durch PrP-Fragmente induzierte Zellschädigung. Ein synthetisches Peptid, bestehend aus den Aminosäuren 106-126 des Prionproteins, verursacht in kultivierten Hippocampuszellen morphologische Veränderungen, die letztlich zum Zelltod führen (Tagliavini *et al.*, 1993, Forloni *et al.*, 1993, Brown *et al.*, 1996). Lin *et al.* konnten durch *in vitro*-Experimente durch die Bildung von Ionenkanälen in Lipiddoppelmembranen nachweisen, die eventuell eine Veränderung des Ionengleichgewichts (vor allem durch Ca²⁺-Einstrom) Apoptosevorgänge triggern können (Lin *et al.*, 1997). Experimente mit persistierenden Zelllinien (Schatzl *et al.*, 1997) und Scrapie-infizierten Mäusen konnten Apoptose-typische Vorgänge wie Vakuolisierung, DNA-Fragmentation und Zelluntergänge bestätigen (Kretzschmar *et al.*, 1997).

Daude *et al.* arbeiteten mit einem Zellkultursystem, bei dem es zur spontanen Umwandlung von PrP^C in eine proteaseresistente Isoform kommt. Sie beobachteten Zwischenstufen, die PrP während der Konversion durchläuft. So erwirbt PrP^C sehr rasch hydrophobe Eigenschaften. Im Lauf von Stunden kommt es zur Unlöslichkeit und zur Resistenz gegen Proteasen (Daude *et al.*, 1997).

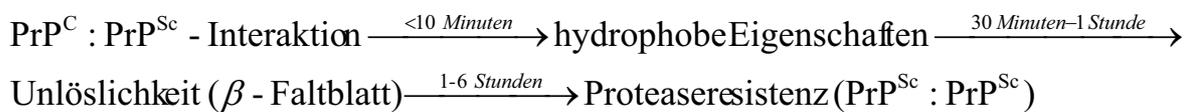


Abbildung 7: Änderung der biochemischen Eigenschaften bei der Konvertierung von PrP^C zu PrP^{Sc} im Zellkultursystem (Daude *et al.*, 1997).

Gegenteilige Daten belegen, dass sich die C-terminale Domäne von PrP^{C/Sc} extrem rasch faltet. Dieses Modell spricht gegen Zwischenschritte mit PrP*-Intermediaten (Wildegger *et al.*, 1999).

Markierungsexperimente gaben einen Hinweis darauf, dass PrP^{Sc} vor dem Einschleusen in Endosomen gebildet wird. Anscheinend wird nur mit einem GPI-Anker ausgestattetes PrP^C in PrP^{Sc} umgewandelt, die PrP-Konversion erfolgt aller Wahrscheinlichkeit nach erst nach der Verankerung an der Zelloberfläche. Weiteren Daten zufolge scheint die Bildung von PrP^{Sc} in Caveolin-reichen Domänen der Plasmamembran stattzufinden (Taraboulos *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997a ; Vey *et al.*, 1996).

1.6 Prionerkrankungen-verursachende Mutationen

Bereits vor Erstellung des Pr^{PC}-Strukturmodells stellte sich heraus, dass bestimmte Mutationen des *Prn-p*-Gens die Disposition für die Entstehung einer Prionkrankheit dramatisch erhöhen. Ebenso sind die Inkubationszeiten verringert. Die erste Mutation beschrieben Hsiao *et al.* für das Codon 102, bei dem die Substitution von Phenylalanin durch Leucin bei transgenen Mäusen ein Krankheitsbild auslöst, welches dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) ähnelt (Hsiao *et al.*, 1990). Anscheinend beeinflussen diese Aminosäureaustausche die Stabilität der α -Helices an kritischen Stellen des Protein-Backbones.

In der untenstehenden Tabelle und Abbildung sind die wichtigsten *Prn-p*-Mutationen bzw. -Insertionen und Deletionen mit ihren korrelierenden Phänotypen dargestellt.

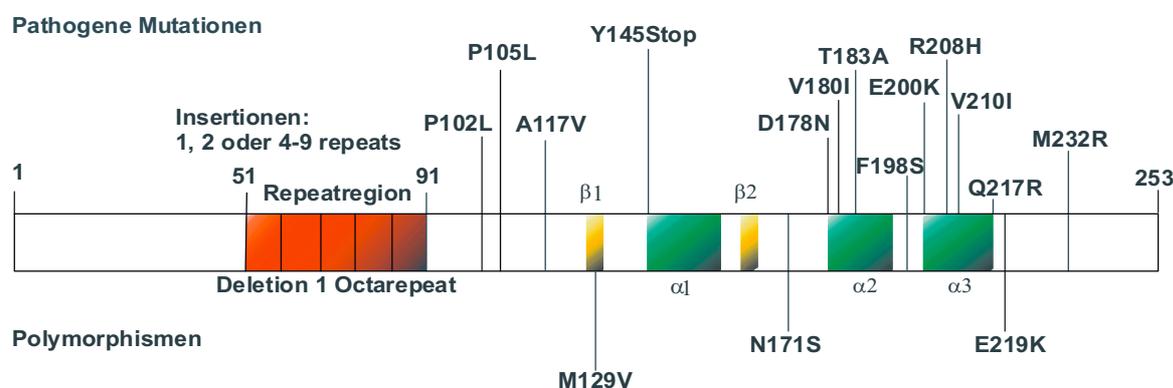


Abbildung 8: *Prn-p*-Mutationen und -Polymorphismen. Gelb: Bereich der β -Faltblätter, grün: α -helikaler Bereich, rot: Oktarepeatregion (nach: Wadsworth *et al.*, 1999).

Tabelle 6: *Prn-p*-Mutationen und Phänotyp (nach Weber *et al.*, 1997a).

Prionerkrankung	<i>Prn-p</i>-Mutation (Häufigkeit)
„klassische“ genetische Creutzfeldt-Jacob-Erkrankung (CJD)	178 (am dritthäufigsten) 200 (häufigste Mutation), 208, 210, 180, 180+232
tödliche fatale Insomnie (FFI, thalamische Form)	178 + Methionin an Codon 129 des mutierten Allels
Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) mit Ataxie und variablen spongiformen Veränderungen	102 (am zweithäufigsten), 117
„gemischte“ Syndrome von CJD und GSS	Insertionen im Oktarepeatbereich (Codon 51-91) 145 (Stoppcodon)
GSS mit Neurofibrillenbildung	198, 117
GSS mit spastischer Paraparese	105

Die Zahl der Oktarepeats spielt offensichtlich eine Rolle bei der Ausprägung der Symptome. Im N-terminalen Bereich des Prionproteins kommen bis zu neun zusätzliche Oktarepeats vor, die man bevorzugt bei Mischformen von CJD und GSS findet. Harris Experimente mit transgenen Mäusen, die bis zu neun zusätzliche Oktarepeats trugen, ergaben, dass es – abhängig von der exprimierten PrP^C-Konzentration – zu spontanen neurologischen Veränderungen kommt (Chiesa *et al.*, 1998). Spätestens nach 214 Tagen werden alle transgenen Mäuse von der Symptomatik erfasst, die zu fortschreitenden Verhaltensveränderungen – ähnlich einer Scrapie-Erkrankung – führt und tödlich ist. In Hirnbiopsien fand man atrophische Veränderungen des Cerebellum und Zellverlust, aber keine spongiformen Veränderungen. Im cerebellären Gewebe waren mittels Immunfärbung Zeichen einer Gliose und Astrocytose nachweisbar. Vorhandene PrP-Ablagerungen führten nicht zu Amyloidbildung, zeigten aber typische Eigenschaften der PrP^{Sc}-Isoform: Unlöslichkeit in Detergentien, Resistenz gegenüber sehr niedrigen Proteinase K-Konzentrationen und bestehende Membranassoziation nach PIPLC-Behandlung.

Harris kommt zu dem Ergebnis, dass bei genetisch verursachten Prionerkrankungen mutiertes, unlösliches PrP über Jahre hinweg zu – für die Zelle toxischen – Konzentrationen akkumuliert. Dieser Sachverhalt wäre eine Erklärung für das späte Einsetzen der Symptomatik hereditärer Prionerkrankungen, obwohl irreguläres PrP bereits vor Geburt gebildet wird (Manson *et al.*, 1992). Möglicherweise erwirbt das akkumulierte PrP erst im Lauf der Zeit PrP^{Sc}-Eigenschaften, die es krankheitsauslösend machen.

Aus diesen Beobachtungen lassen sich also drei verschiedene Pathomechanismen als Ursache für TSE-Erkrankungen ableiten: Zum einen sind dies die genetischen Formen, in welchen Mutationen im PrP-Gen destabilisierend auf PrP^C wirken und sich durch spätes Einsetzen der Symptomatik und ein rasche Verschlechterung auszeichnen. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die autosomal dominant weitergegebene FFI mit 100% Penetranz (Weber *et al.*, 1997a).

Die bei weitem am häufigsten auftretenden TSE-Fälle beim Menschen beruhen wahrscheinlich auf spontanen Umwandlungen von PrP^C zu PrP^{Sc}, die zu einem ähnlichen Krankheitsbild wie dem der Keimbahnmutationen führen.

Die infektiös-erworbene Form stellt die dritte Variante der Prionerkrankungen dar, die beim Menschen durch ärztliche Eingriffe, wie Dura-Mater-Transplantationen oder Behandlung mit kontaminiertem humanem Wachstumshormonen (hGH) sowie dem oben aufgeführten endogenem Kannibalismus verursacht wurde.

Tabelle 7: Prionerkrankungen und Pathomechanismen (Prusiner, 1998).

Manifestation	Erkrankung	Wirt	Pathomechanismus
<i>familiär</i>	fCJD	Mensch	Keimbahnmutation
	GSS	Mensch	
	FFI	Mensch	
<i>sporadisch</i>	sCJD	Mensch	somatische Mutationen oder spontane Konversion von PrP ^C in PrP ^{Sc}
<i>infektiös-erworben</i>	Kuru	Mensch	Kannibalismus
	iCJD	Mensch	Übertragung durch hGH, Dura-mater-Transplantate usw.
	vCJD	Mensch	Infektion durch Rinderprionen
	Scrapie	Schaf	Infektion des genetisch suszeptiblen Schafs
	BSE	Rind	Infektion durch Prion-kontaminiertes Tiermehl
	TME	Nerz	Infektion durch Schaf- oder Rinderprionen
	Exotic ungulate encephalopathy	Kudu, Nyala, Oryx	Infektion durch Prion-kontaminiertes Tiermehl
	FSE	Katzen	Infektion durch Prion-kontaminiertes Rind- oder Tiermehl
<i>unbekannt</i>	CWD	Maultierhirsch, Elch	unbekannt

1.7 vCJD

1996 diagnostizierte man in Großbritannien bei zehn Patienten eine atypische Form der Creutzfeldt-Jacob-Krankheit, die daraufhin als v- oder nv- („variant“ bzw. „new variant“) CJD bezeichnet wurde. Sie unterscheidet sich von den sporadischen und familiären Formen durch einen frühen Erkrankungsbeginn; in der Regel sind die Erkrankten jünger als 40 Jahre, in einem Fall ist die Erkrankung eines zwölfjährigen Mädchens beschrieben. Die Symptome äußern sich in einer Änderung des psychosozialen Verhaltens, es kommt zu Ataxie und Dysästhesien, während bei der sporadischen CJD eher die Demenz im Vordergrund steht. Typisch für vCJD ist der unmerkliche Beginn und der über Jahre protrahierte Verlauf bis zum Tod. Das *Prn-p*-Gen von vCJD-Erkrankten weist keine Mutationen oder Insertionen auf. Alle bisher Erkrankten sind jedoch homozygot für Methionin an Codon 129. Auch das histologische Bild unterscheidet sich von der sporadischen und familiären CJD. In allen Fällen zeigen sich lichtmikroskopisch floride Plaques (Collinge und Rossor, 1996, Hill *et al.*, 1997b).

Tabelle 8: Verteilung des Codon-129-Polymorphismus in der Normalbevölkerung und bei CJD-Erkrankten (Ironsides, 1998).

<i>Polymorphismus Codon 129</i>	<i>normale Bevölkerung</i>	<i>sporadische CJD</i>	<i>vCJD</i>
M/M	37%	80%	100%
V/V	13%	12%	--
M/V	50%	8%	--

Anhand der vorliegenden Daten kam man zu dem Schluss, dass es sich um Befunde handelt, die eher zum infektiös erworbenen Formenkreis der Prionerkrankungen gehören. Erste biochemische Hinweise lieferten Proteinmuster Vergleiche zwischen den elektrophoretisch aufgetrennten PrP^{Sc}-Fraktionen einzelner Spezies (Collinge *et al.*, 1996; Raymond *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997a; Bruce *et al.*, 1997). Die im Westernblot detektierten PrP-Banden unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht und Mengenverteilung ihrer Glykoformen von den „klassischen“ humanen TSEs. Sie ähnelten mehr den Banden, die man bei experimentell mit BSE infizierten Makaken findet (Lasmezas *et al.*, 1996).

1.8 Speziesbarriere und „Strain“-Eigenschaften des Prions

1.8.1 Der Einfluss der Speziesbarriere auf die Übertragbarkeit von Prionerkrankungen

Wie bereits seit längerem bekannt ist, lassen sich Prionerkrankungen von einer Spezies auf eine andere manchmal nur sehr ineffizient und in vielen Fällen gar nicht übertragen. Man spricht von einer „Speziesbarriere“ (Pattison, 1965). Im Zusammenhang mit dem Ausbruch von BSE in England Mitte der 80er Jahre und dem nachfolgenden Auftreten von vCJD beim Menschen wurde die Hypothese geäußert, dass BSE und vCJD ursächlich zusammengehören. Aus diesem Grund wurde der Aspekt der Speziesbarriere zu einem zentralen Thema der Prionenforschung.

Die Übertragbarkeit von Prionen vom Rind auf den Menschen wurde experimentell mit Versuchen an transgenen Mäusen (homozygot für humanes oder bovines *Prn-p* und „knockout“ für murines *Prn-p*) bestätigt. Die Maus mit dem bovinen *Prn-p* zeigt keine Speziesbarriere gegenüber BSE-Prionen (Scott *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1999).

Drei Faktoren scheinen für die Ausprägung der Speziesbarriere verantwortlich zu sein: (1) Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von Prion-Donor und Prion-Empfänger, welche die Konformation bedingt, die für die „Passgenauigkeit“ beim Kontakt PrP^C (Substrat):PrP^{Sc} (*template*) verantwortlich ist. Die „de novo“ gebildeten Prionen besitzen die Primärstruktur des Empfänger-PrP-Gens, nicht die der inokulierten PrP^{Sc}-Moleküle (Prusiner, 1998; Bockman *et al.*, 1987). Bereits zwei Aminosäuresubstitutionen an Schlüsselpositionen verhindern eine effektive Konversion, wie z.B. im Falle der Speziesbarriere zwischen Hamster und Maus. (2) Die Speziespezifität des oben erwähnten „Protein X“, das die PrP^{Sc}-Bildung ermöglicht bzw. beschleunigt. (3) Die so genannten Prion-„strains“ (Stämme), welche sich durch mehr oder weniger definierte Eigenschaften auszeichnen, die auf die neu synthetisierten Prionen übertragen werden. Im folgenden Abschnitt soll auf diese „strains“ genauer eingegangen werden (Hill *et al.*, 1997a, Bruce *et al.*, 1997).

1.8.2 „Strains“

Bereits 1965 beschrieb Ian Pattison zwei im Hinblick auf das klinische Erscheinungsbild unterschiedliche Phänotypen der Scrapie-Erkrankung bei Ziegen. Er konnte durch Inokulation von Hirngewebe in gesunde Tiere nachweisen, dass sich die Symptome weiter passagieren ließen und dieselben Eigenschaften beibehielten (Pattison, 1965; Pattison und Jones, 1968).

Befürworter der Theorie, dass es sich bei Prionerkrankungen doch um die Infektion mit nukleinsäurehaltigen Erregern handelt, führen diese Weitergabe von Eigenschaften, die im Prion kodiert sein müssten als Hauptargument gegen die „protein only“-Hypothese an. Bis jetzt konnten sie jedoch keinen Beweis auf das

Vorhandensein spezifischer Nukleinsäuren erbringen. Die „*strain*“-Eigenschaften lassen sich nach den Erkenntnissen der letzten Jahre durchaus mit ihrer Verankerung im PrP^{Sc}-Molekül postulieren:

Richard Bessen und Dick Marsh beschrieben in mehreren Veröffentlichungen 1991, 1994 und 2000 zwei Formen der *Transmissible Mink Encephalopathy* (TME), denen sie analog ihrer Symptomatik die Beschreibungen „*hyper*“ (HY) und „*drowsy*“ (DY) zuordneten (Marsh *et al.*, 1991; Bessen und Marsh, 1994; Bartz *et al.*, 2000). Ihre Untersuchungen zeigten unterschiedliche biologisch-physikalische Eigenschaften des isolierten PrP^{Sc} der beiden Krankheitsformen, obwohl dieselbe Primärstruktur zugrunde liegt. Die „*strains*“ HY und DY unterscheiden sich nach Proteinase K (PK)-Behandlung und elektrophoretischer Auftrennung in ihren molaren Massen um 1-2 kDa, entsprechend 8-15 Aminosäuren. DY erweist sich als Proteinase K-sensitiver als HY. Die Abnahme der Infektiosität korreliert mit dem proteolytischen Abbau. Bessen schlug vor, die „*strain*“-Eigenschaften an der dreidimensionalen Struktur des Prions festzumachen.

Im Verlauf der letzten Jahre konnten 20 solcher „*strains*“ isoliert werden, die sich durch Weitergabe ihrer charakteristischen Eigenschaften auszeichnen. Zum „*fingerprinting*“ von „*strains*“ benutzt man unter anderem die Beschreibung des Läsionsprofils des infizierten und erkrankten Gehirns, die klinische Symptomatik, die Resistenz gegenüber Proteinase K und das Glykosylierungsmuster von PrP^{Sc} (Collinge *et al.*, 1996).

1.9 „Conformational Diseases“ (Konformationskrankheiten)

Blickt man über den Horizont der spongiformen Enzephalopathien, findet man eine Reihe weiterer Erkrankungen sowohl des zentralen Nervensystems als auch anderer Organe, die aufgrund ihres Pathomechanismus und der biophysikalischen Eigenschaften durchaus Ähnlichkeiten mit den Prionerkrankungen haben: Robin Carrell und David Lomas schlugen vor, diesen Formenkreis von Erkrankungen als „*Conformational Diseases*“ zu bezeichnen (Carrell und Lomas, 1997). Es gibt neben CJD, FFI oder GSS noch eine Reihe weiterer Krankheiten, die mit Aggregation von Proteinen und Fibrillenbildung einhergehen. Alle diese Proteine weisen eine geringe Stabilität ihrer Tertiärstruktur auf. Diese Eigenschaft der begünstigten Konformationsveränderung bedingt vielfach sogar die Funktionalität des Proteins, wie das folgende Beispiel zeigt:

Hämoglobin (Hb) macht durch Aufnahme und Abgabe von Sauerstoffmolekülen eine physiologische Konformationsänderung durch, die reversibel ist. Eine Mutation im codierenden Gen, welche zu einem Aminosäureaustausch von Glutamin gegen Valin an Codon 6 der β -Kette von Hämoglobin führt, verursacht eine unphysiologische Konformationsänderung, infolge derer die Hb-Moleküle bei niedriger Sauerstoffsättigung spiralförmig polymerisieren, Fibrillen bilden und die O_2 -Bindungskapazität des Hämoglobins stark absinkt. Der Phänotyp dieser Krankheit wird als Sichelzellenanämie bezeichnet, da die Erythrozyten eine charakteristische Sichelform bilden. Andere Hämoglobinmutationen bewirken einen Symptomkomplex, der als „*unstable haemoglobin inclusion-body haemolysis*“ bezeichnet wird.

Die Familie der „Serpine“, eine Gruppe von Proteaseinhibitoren (zu denen u.a. α_1 -Antitrypsin, Antithrombin, C_1 -Inhibitor und der Fibrinolyseinhibitor zählen), deren Mitglieder strukturell ähnlich aufgebaut sind, können durch Konformationsänderung ihre zugehörigen Proteasen nach dem Prinzip einer „Mausefalle“ blockieren. Der Pathomechanismus der Z-defizienten Variante von α_1 -Antitrypsin beruht auf einem Absinken des Plasmaspiegels dieses Inhibitors, verursacht durch eine gehemmte Sekretion und Akkumulation des Proteins in Hepatozyten.

Weitere Krankheiten, wie die „*Antithrombin deficiency thromboembolic disease*“ (durch Abwesenheit von C_1 -Inhibitor verursachte Angioödeme) sollen hier nur namentlich erwähnt werden. Sie basieren alle auf dem gleichen Prinzip: Eine Konformationsänderung des Proteins führt zu dessen Funktionsverlust und/oder Sekretionsstörung. Es kommt zu Aggregation und Fibrillenbildung. Die Serpine können nach Ausbildung von β -Faltblättern nicht nur mit ihresgleichen aggregieren, sondern auch die β -Struktur anderer Proteine mit einbeziehen und heterogene Komplexe bilden. Über die Toxizität der Fibrillen gibt es keine definitive Aussage. Die Bildung unlöslicher Membranstrukturen stellt das eigentliche Risiko für die Zelle dar. Wachsen diese Makrostrukturen an, lassen sie sich mittels einer Färbung mit Kongorot (das in die β -Struktur interkaliert) mikroskopisch sichtbar machen.

Im ZNS gibt es außer den Prion-assoziierten Syndromen noch weitere Krankheiten, von denen jede durch die Fehlfaltung eines anderen Proteins verursacht wird. In Gehirnen von Morbus Parkinson-Erkrankten lässt sich fibrilläres α -Synuclein in Lewykörperchen der betroffenen Hirnareale nachweisen (Lansbury, Jr., 1997). Missgefaltetes Huntingtin ist ein pathologischer Marker für die Diagnose von Chorea Huntington. Auslöser der Krankheit ist das Vorhandensein so genannter Glutamin-„repeats“ in diesen Proteinen, eine Expansion der Aminosäure Glutamin in ihrer Sequenz. Erreicht die Zahl der Glutaminmoleküle durch Mutation von Generation zu Generation eine kritische Länge von 37-41 Wiederholungen, kommt es durch die Ausbildung von β -Faltblättern in diesen Bereichen zu intermolekularen Zusammenlagerungen. Perutz *et al.* betrachten diese Phänomene, die auch in anderen Erkrankungen, die mit Fibrillenbildung einhergehen, als ursächlich für die Entstehung von Krankheiten wie Chorea Huntington (Perutz *et al.*, 1994; Perutz, 1995).

Tabelle 9: Beispiele für Erkrankungen des ZNS mit Aggregation von Proteinen und Fibrillenbildung (nach Carrell *et al.* 1997)

<i>Aggregation und Fibrillenbildung</i>	
Chorea Huntington	<i>Erhöhte Zahl von Glutamin-Repeats</i>
Spinozerebelläre Ataxie	
Dentato-rubro-pallido-Luysian Atrophy	
Machado-Joseph Atrophy	
M. Alzheimer	<i>Bildung von β-Amyloid-Protein</i>
Familäre Amyloid-Polyneuropathie	
Down-Syndrom	

Analog verläuft der zentrale Prozess für die Entstehung der Alzheimer'schen Krankheit. Die Bildung eines 42 Aminosäuren langen Peptids mit β -Faltblatt-Struktur durch Herausspaltung aus dem *Membrane-Precursor-Proteins* (APP) führt zur Bildung neurotoxischer Fibrillen (Oltersdorf *et al.*, 1989; Davis-Salinas und Van Nostrand, 1995). Wie bei der Creutzfeldt-Jacob-Erkrankung kommt es bei Morbus Alzheimer sowohl zu sporadischen Formen, die die Mehrzahl der Fälle darstellen, als auch durch bestimmte Mutationen zu familiärer Häufung.

Carrells Vorschlag, diese Krankheiten, die sich durch so verschiedenartige Phänotypen darstellen, als „*Conformational Diseases*“ zu gruppieren, hilft, ihren Pathomechanismus besser zu verstehen und somit gemeinsame Strategien für ihre Behandlung zu entwickeln. Ein Ansatz ist es, Medikamente zu finden, welche die Selbstassoziation der pathologischen Isoformen und somit das Fortschreiten der Krankheiten verhindern (Carrell *et al.*, 1997).

Einzigartig bei den Erkrankungen des Prion-Formenkreises ist im Gegensatz zu den oben angeführten „verwandten“ Konformationskrankheiten die Übertragbarkeit der Krankheit. Gerade im Fall von BSE und dem Auftreten von vCJD kommt es zu einer oralen Übertragung des Pathogens.

Aufgrund der Tatsache, dass die Inkubationszeit für vCJD bei geschätzten 10-30 Jahren liegt, lässt sich bis jetzt noch nicht absehen, wie viele Menschen davon betroffen sein werden. So ist die Aufklärung der Funktionsweise des Prionproteins und dessen pathologischer Isoform von großer Bedeutung, da sie einen bisher neuen, unbekanntem Pathomechanismus darstellt.

1.10 Aufgabenstellung

Zielsetzung war es, eine prion-infizierte Linie muriner Neuroblastomzellen im Hinblick auf Stabilität der Prion-Infektion und Expression zellulärer Markerproteine zu untersuchen.

In Infektionsexperimenten sollten Methoden für Reinfektion und Neuinfektion muriner neuronaler Zelllinien etabliert werden. Dazu sollte die Infektionseffizienz der Inokula aus Zell- und Hirnhomogenaten untersucht werden und verschiedene Erregerstämme verwendet werden.

Bis jetzt ist über die zellulären Abläufe in den frühen Stadien der Prion-Infektion wenig bekannt. Mit Hilfe proteinbiochemischer und molekularbiologischer Methoden sowie durch Elektronenmikroskopie sollten die zellulären Veränderungen neuronaler Zelllinien in den ersten Stadien nach Inokulation mit Prionen verfolgt werden.

2 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Kits und Geräte wurden von folgenden Firmen bezogen:

Tabelle 10: Geräte

<i>Beckman</i>	Ultrazentrifuge
<i>BIO-RAD</i>	Blotvorrichtung für SDS-Gele, Spannungsversorgungen, ELISA-Reader
<i>Canon</i>	Phasenkontrastmikroskop
<i>Eppendorf</i>	Tischzentrifuge, Kühlzentrifuge, Wärmeblock, Mikropipetten
<i>Gilson</i>	Mikropipetten
<i>Heräus</i>	Sterilbank (<i>Laminar-Flow-Hood</i>), Brutschrank, Zentrifugen, Wasserbad
<i>Hoefer</i>	PAGE-Gelvorrichtung
<i>JEOL</i>	Elektronenmikroskop JEOL 100-CX
<i>Leica</i>	Konfokalmikroskop
<i>Protec</i>	Entwicklermaschine
<i>VWR</i>	Probenschüttler

Tabelle 11: Enzyme, Enzyminhibitoren und Kits

<i>Amersham</i>	ECL-Kit, Molecular Weight Marker
<i>Bayer</i>	Trasyolol
<i>Boehringer Mannheim</i>	APS, Pefabloc, Protease K, TUNEL-Kit, NGF, sonstige Enzyme

Tabelle 12: Chemikalien, Lösungsmittel, sonstiges Material

<i>Ilford</i>	Fotopapier
<i>Kodak</i>	Röntgenfilme
<i>Merck</i>	Natriumcitrat, SDS, Poincaurot, Tris-HCl, sonstige verwendete Chemikalien
<i>Pierce</i>	Coomassie Plus Protein Assay Reagent
<i>Schleicher & Schuell</i>	Nitrozellulosemembran, PVDF-Membran
<i>Serva</i>	Ammoniumperoxidisulfat (APS), Polyacrylamid, Trichloresigsäure, Tetramethylethylendiamin (TEMED)

<i>Sigma</i>	Phenazinmethosulfat, Trypanblau, Triton X-100
<i>Stratagene</i>	Glogos II Autoradiographiemarker
<i>Whatman</i>	Filterpapier

Tabelle 13: Material für Zellkultur

<i>GibcoBRL</i>	Antibiotika (Penicillin, Streptomycin), DMEM, MEM, Fetal Calf Serum (FCS), Fetal Horse Serum (FHS), Glutamin
<i>Millipore</i>	Einwegfilter
<i>Nunc, Falcon</i>	Plastikwaren (Kulturschalen, Kunststoffpipetten, Kryoröhrchen etc.)

Tabelle 14: Verwendete Software

<i>Adobe</i>	Photoshop 5, 5.5 und 6, Acrobat Writer 5.5
<i>Micrografx</i>	Micrografx Designer 9
<i>Microsoft</i>	MS Word 8-10, MS Excel 8-10
<i>National Center for Biotechnology Information (NCBI)</i>	CN3D 4.1

3 Methoden

3.1 Sicherheitsvorkehrungen

Wie Studien aus den 60er Jahren zeigten, ist der Scrapie-Erreger resistent gegen ionisierende und UV-Strahlung (Alper *et al.*, 1966; Alper *et al.*, 1967; Chatigny und Prusiner, 1980) und lässt sich durch konventionelle Inaktivierungsmethoden für Mikroorganismen und Viren nicht hinreichend abtöten. Prio-nen lassen sich erst durch Autoklavierung bei mehr als 134°C für 1 Stunde oder durch Verwendung von 1-2 M NaOH (abhängig vom Ausgangs-Titer) inaktivieren.

Alle Behältnisse, Arbeitsgeräte, Puffer und Elektrophoresegele, Zell- und Gehirnmateriale sowie sonstige Materialien, die mit Scrapie-Material in Kontakt kamen, wurden nach den etablierten Sicherheitsrichtlinien, die für Scrapie-Abfälle gelten (unter Kapitel 1.3 beschrieben), dekontaminiert und entsorgt.

Die PrP^{Sc}-Präparation aus Mäusegehirnen wurde ausschließlich unter einer sterilen Sicherheitswerkbank (*Laminar-Flow-Hood*) durchgeführt. Nach Möglichkeit wurden Einwegmaterialien benutzt, die in speziellen Behältern gesammelt und danach autoklaviert wurden. Wiederverwendbare Glasmaterialien, Gelkammern, etc. wurden in 2 M Natriumhydroxidlösung dekontaminiert und danach – falls möglich – sterilisiert.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Zellen

Für die Zellkulturexperimente wurden hauptsächlich drei Zelllinien verwendet: Zur Verfügung standen neuronale Neuroblastomzellen der Maus (N2a). N2a-Zellen stammen von einem spontanen Tumor in A/J-Mäusen (einem PrP^{a/a}-Stamm) ab (Klebe und Ruddle, 1969). Die Zellen waren persistierend mit dem Scrapie-Stamm RML (*Rocky-Mountain-Laboratories*) infiziert (ScN2a) (Butler *et al.*, 1988). Aus den ScN2a-Zellen wurden die chimären Maus-Hamster-Zellen (ScMHM2) durch stabile Transfektion mit einem Konstrukt, das zur Expression eines Prionproteins führte, in welchem die Aminosäuresequenz 94-131 des murinen Prion-Leserahmens mit der des syrischen Hamsters ausgetauscht wurde, entwickelt (Scott *et al.*, 1992).

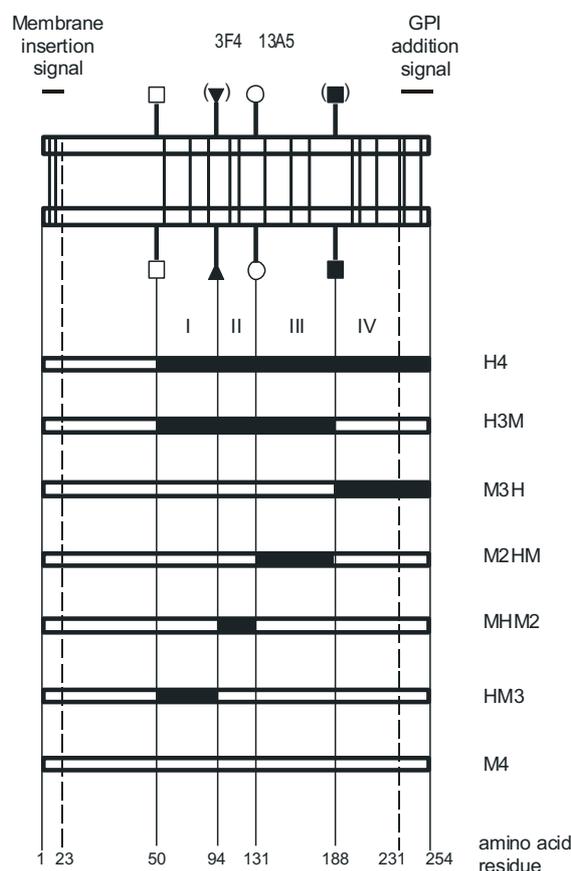


Abbildung 9: Von Scott *et al.* hergestellte chimäre Maus-Hamster *Prn-p*-Konstrukte. Nur das MHM2-Konstrukt resultiert in einem funktionsfähigen PrP-Protein, das in ScN2a-Zellen infizierbar ist und einen proteaseresistenten Phänotyp zeigt.

In der Arbeitsgruppe von Dr. Schätzl wurden uninfizierte N2a-Zellen mit diesem Konstrukt stabil transfiziert. Diese Zellen werden im Folgenden als MHM2 bzw. 3F4-Zellen bezeichnet. Das in diesen Zellen exprimierte Prionprotein unterscheidet sich im Bereich der Aminosäuren 94-131 durch das 3F4-Epitop von

der murinen Form und kann daher mit einem gegen das 3F4-Epitop gerichteten monoklonalen Antikörper (Kascsak *et al.*, 1987) spezifisch vom murinen Wildtyp-PrP unterschieden werden.

Des Weiteren wurden GT1 Zellen aus dem murinen Hypothalamus (Wetsel *et al.*, 1993), die persistierend mit Maus-Prionen infiziert worden waren (Schatzl *et al.*, 1997), verwendet. Im Gegensatz zu den oben angeführten Neuroblastomzellen zeigen mit PrP^{Sc} infizierte GT1 Zellen deutliche neurodegenerative Veränderungen, die den ZNS-Veränderungen prion-infizierter Tiere und Menschen ähneln.

Die oben angeführten Zelllinien lagen sowohl in nicht (PrP^C) als auch in infizierter Form (PrP^C/PrP^{Sc}) vor und konnten daher sowohl als Donor- als auch als Akzeptorzellen (bzw. als nicht infizierte Negativkontrollen) verwendet werden.

Tabelle 15: Übersicht über die verwendeten Zellen

Zelltyp	im Text verwendete Abkürzung	Herkunft
Neuroblastomzellen	N2a	Prusiner, SF
permanent mit Scrapie (RML- <i>strain</i>) infizierte Neuroblastomzellen	ScN2a	Prusiner, SF
Neuroblastomzellen, stabil transfiziert mit 3F4-Konstrukt	MHM2 / 3F4-Zellen	Schätzl
Scrapie-infizierte (<i>bulk</i> , RML- <i>strain</i>) Neuroblastomzellen, stabil transfiziert mit 3F4-Konstrukt	ScMHM2	Scott/Prusiner, SF
Hypothalamuszellen	GT1	Mellon
permanent mit Scrapie (RML- <i>strain</i>) infizierte Hypothalamuszellen	ScGT1	Schätzl

3.2.2 Gewebekultur

Für die Zellkulturen wurden Plastikpetrischalen in verschiedenen Größen (d = 90 mm, F = 64 cm²; d = 60 mm, F = 28 cm²; d = 35 mm, F = 10 cm²) verwendet. Um eine größere Ausbeute an Prionprotein als Infektionsmaterial zu erhalten, wurden Zellen zuweilen auch in Schalen mit einem Durchmesser von 18 cm (F = 254 cm²) gezüchtet. Als Nährmedium für die (Sc)N2a-Zellen und (Sc)MHM2-Zellen diente Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) von Gibco mit einem Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS, 30 Min. bei 56°C inaktiviert), 5 ml 200 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin. Die GT1-Zellen benötigten zum optimalen Wachstum Modified Eagle's Medium (MEM) mit einem Zusatz von 10% fetalem Pferdeserum (FHS, 30 Min. bei 56°C inaktiviert), 5 ml 200 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin. Bei einigen Versuchen wurde zusätzlich 100 ng/ml NGF (*Nerve-Growth-Factor*) zugegeben, um das Wachstum der GT1-Zellen zu stimulieren.

Die Zellen wurden unter 5% CO₂ bei 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von über 90% im Brutschrank gehalten. Bei Bedarf wurde das Kulturmedium gewechselt, was bei den schnell wachsenden MHM2- und

N2a-Zellen jeden zweiten bis dritten Tag der Fall war. Die GT1-Zellen wurden dagegen bis zu einer Woche ohne Medienwechsel gehalten. In jedem Fall wurden die Kulturen regelmäßig und vor jedem Medienwechsel mit einem Phasenkontrastmikroskop auf eventuelle mikrobiologische Kontaminationen untersucht.

Um die adhärennten Zellen von ihrem Substrat zu lösen, wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit PBS (pH 7,2) gewaschen. Danach wurden sie mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin und 0,02% (w/v) EDTA in PBS von der Oberfläche der Kulturschalen abgelöst. Die Zellen in Trypsin-Lösung wurden in frischem Medium resuspendiert und entsprechend der gewünschten Verdünnung (zwischen 1:20 bis 1:2) auf neuen Kulturplatten ausgesät.

3.2.3 Zellklonierung mittels Endpunkttitration

Für die Untersuchung der Infektionseffizienz, der Stabilität der Prion-Infektion im Hinblick auf chemische Chaperone, von zellulären Veränderungen nach Infektion sowie von Zeitkinetikstudien, war es notwendig, möglichst homogene Zellkulturen heranzuziehen. Die Methode der Wahl hierfür ist das Klonieren der Zellen. Da die „*cloning efficiency*“ der verwendeten Zelllinien unbekannt war, und das Zellsystem durch die Infektion mit PrP^{Sc}-Lysaten um einen weiteren Parameter verändert wird, wurden die Zellen in einer Verdünnungsreihe ausgesät (=Endpunkttitrationsverfahren).

Zuvor trypsinierte Zellen wurden in einer Neubauer-Kammer ausgezählt und auf eine Konzentration von 2×10^4 Zellen/ml eingestellt. Davon wurden $12 \times 100 \mu\text{l}$ auf eine mit je $100 \mu\text{l}$ Medium/Loch beschickten 96-Loch-Platte pipettiert, was eine durchschnittliche Zellkonzentration von 10^3 Zellen/Loch ergab. Die Ausgangskonzentration wurde schrittweise um den Faktor 5 verdünnt, so dass jeweils 12 Löcher der Mikrotiterplatte in absteigender Reihenfolge mit folgenden Konzentrationen beschickt wurden: 200, 40, 8, 1,6 und 0,32 Zellen/Loch. Mittels dieser als Endpunkttitration bezeichneten Methode, war es möglich, in jedem Fall eine Verdünnung zu erreichen, bei der theoretisch eine Zelle pro Loch vorhanden, die nachwachsende Kolonie also klonalen Ursprungs war.

In wöchentlichem Abstand wurden $100 \mu\text{l}$ Medium aus den Vertiefungen abpipettiert und durch frisches Medium ersetzt. Nach zirka zwei bis drei Wochen waren unter dem Mikroskop Kolonien erkennbar. Das Medium der entsprechenden Probenlöcher wurde entfernt, die Löcher zweimal mit $200 \mu\text{l}$ PBS gewaschen und danach mit $50 \mu\text{l}$ Trypsin 5 Min. im Brutschrank inkubiert. Danach konnten die Zellen in $100 \mu\text{l}$ Medium mit der Pipette aufgenommen, in 24-Loch-Platten überführt und solange weitergezüchtet werden, bis sie passagiert werden konnten. Sobald die Klone (in mehreren Schritten) auf 9 cm-Platten wuchsen, wurde ein Aliquot kryokonserviert, der Rest wurde für die entsprechenden Experimente verwendet.

3.2.4 Kryokonservierung

3.2.4.1 Das Einfrieren von Zellen

Vorab wurde eine Gefrierlösung nach folgendem Rezept angesetzt: 40% (v/v) Kulturmedium, 50% (v/v) FCS und 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) als Gefrierschutzmittel. Die zu konservierenden Zellen wurden nach dem Absaugen des Mediums zweimal mit kaltem (4°C) PBS gewaschen, dann wurde 1 ml Trypsin hinzugegeben und durch rasches Schwenken verteilt. Das überständige Trypsin wurde abgesaugt, und die Schalen wurden für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden 5 ml Gefrierlösung in die Schalen pipettiert und die Zellen durch vorsichtiges Spülen von der Oberfläche gelöst. Nach dem Resuspendieren wurde sofort je 1 ml in bereitgestellte Kryogefäße gegeben und die Zellen wurden in einer Polystyrol-Box bei -70° C für 24 h abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.4.2 Das Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen wurden nach der Entnahme aus dem Stickstofftank in einem auf 37° C vorgeheizten Wasserbad aufgetaut und unter einer *Laminar-Flow-Hood* geöffnet. Um die Bestandteile des Einfriermediums möglichst rasch von den Zellen zu trennen, wurde der Inhalt in mit 9 ml FCS gefüllte Zentrifugenröhrchen vorsichtig überschichtet und bei 150 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden daraufhin in Petrischalen in geeigneter Dichte ausgesät. Nach einer Erholungsphase von zwei bis drei Tagen konnten die Zellen für weitere Versuche verwendet werden.

3.2.5 Wachstumskurven

Nach Trypsinierung und Ablösen der Zellen von der Kulturschale wurden die Zellen sorgfältig in PBS resuspendiert und ein Aliquot von 500 µl mit gebrauchsfertigem Trypanblau im Verhältnis 1:1 gefärbt. Die Probe wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette am Rand einer vorbereiteten Neubauer-Zählkammer aufgebracht und durch den Kapillareffekt in die Kammer gezogen. Im Phasenkontrastmikroskop unter 20-facher Vergrößerung wurden in jeweils vier Quadranten die Gesamtzahl der lebenden und toten Zellen ausgezählt. Lebende Zellen erschienen im Mikroskop aufgrund der intakten Zellmembran ungefärbt, tote Zellen nahmen den Farbstoff auf. Die daraufhin errechneten Zellkonzentrationen pro ml wurden in eine Tabellenkalkulation (*Microsoft Excel*) eingetragen und graphisch dargestellt.

3.3 Methoden zur PrP^{Sc}-Herstellung für die Infektion

3.3.1 Präparation der Inokula

3.3.1.1 Überstände

Permanent mit PrP^{Sc} infizierte ScMHM2-Zellen wurden auf 9-cm-Petrischalen gezüchtet. Nachdem ein mittlerer Dichtegrad der Zellen erreicht war (ca. $1-5 \times 10^5$ Zellen), wurden zwei Tage alte Überstände abpipettiert, in 50 ml sterilen Kunststoffröhrchen (Falcon) gesammelt und bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Die Petrischalen wurden mit frischem Medium beschickt, erneut in den Brutschrank gestellt, und der Vorgang wie beschrieben wiederholt, bis die Zellen konfluent waren und abzusterben begannen.

Insgesamt wurden so ca. 500 ml „verbrauchtes“ Medium gesammelt und nach dem Auftauen durch einen $0,2 \mu\text{m}$ Einwegfilter (Millipore) mit einer Vakuumpumpe in ein steriles Glasgefäß gefiltert. Diese Flasche wurde im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Daraus ließen sich nach Zugabe von frischem DMEM im Verhältnis 1:1 und 1:2 die gewünschten Ausgangskonzentrationen für die Inokulation herstellen.

3.3.1.2 Zellysate

Um eine hohe PrP^{Sc}-Konzentration und konstante Bedingungen für die Infektion zu gewährleisten, mussten Zellen mit stabiler PrP^{Sc}-Expression verwendet werden. Voraussetzung für ein stabiles Infektions-„System“ war die Möglichkeit, das Inokulum nach der Infektion von *de novo* produziertem PrP^{Sc} differenzieren zu können.

Dazu wurden persistierend infizierte ScMHM2-Zellen gewählt, die in Petrischalen von 9 bzw. 18 cm Durchmesser gezüchtet wurden, bis sie ein konfluentes Stadium erreicht hatten. Die Zellen wurden zuerst zweimal in 10 ml kaltem PBS gewaschen. In die 9 cm-Schalen wurde 1 ml Trypsin, in die 18 cm-Schalen 2 ml Trypsin pipettiert. Die Petrischalen wurden kurz geschwenkt um das Trypsin besser zu verteilen, und der Überstand wurde mit einem Sauger abgenommen. Die Zellen wurden 5 Min. im Brutschrank inkubiert, um eine optimale Trypsinwirkung zu erreichen. Danach wurden sie mit 2 bzw. 4 ml sterilem PBS vom Kunststoffträger abgespült und in vorbereitete sterile 15 ml Kunststoffröhrchen (Falcon) gefüllt. Die Zellen wurden ohne weitere Zusätze sofort bei -20°C tiefgefroren. Zum mechanischem Aufbrechen der Zellwände wurden die geschlossenen Röhrchen in einer Halterung befestigt, für 5 Minuten rasch in flüssigem Stickstoff getaucht und nach dem Herausholen im Wasserbad rasch auf 42°C erwärmt, bis die Lösung vollständig aufgetaut war. Dieser Vorgang wurde jeweils fünfmal wiederholt und die Lysate wurden in einem Hochleistungsschallgerät unter ständiger Kühlung bei 4°C zweimal 5 Min. beschallt. Das so gewonnene Homogenat wurde durch Zugabe von frischem Zellkulturmedium in den für die Experimente benötigten Konzentrationen von 5, 10, 20 und 50 % (v/v) Inokulum (in 2 ml DMEM) angesetzt.

3.3.1.3 Hirnhomogenate

Bei -80°C gelagerte Mäusegehirne (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. M. Groschup/BFA Tübingen), die mit den Prionstämmen 79A und mausadaptiertem BSE infiziert worden waren, wurden unter sterilen Bedingungen aufgetaut und unter der *Laminar-Flow-Hood* in einer Petrischale mit einem Einwegskalpell grob zerkleinert. Die Stücke wurden in 10% (w/v) PBS aufgenommen und in ein 15 ml Kunststoffröhrchen (Falcon) überführt. Die Suspension wurde 20 x mit einer 16 Gauge-Hohnadel in eine sterile Kunststoffspritze gesogen und in das Röhrchen zurückgepresst. Dieser Vorgang wurde mit absteigenden Nadelgrößen bis 24 Gauge wiederholt um ein möglichst feines Homogenat herzustellen. Anschließend wurde das Homogenat in 2 ml Kryoröhrchen abgefüllt und bei -20°C gelagert. Für Infektionsversuche wurde ein entsprechendes Aliquot aufgetaut und mit DMEM auf 1% (v/v) bzw. 2% (v/v) eingestellt.

3.3.2 PrP^{Sc}-Inokulation

3.3.2.1 Inokulation mit Zellkultur-Überstand

Zu infizierende N2a-Zellen wurden von einer konfluenten 9 cm-Petrischale abtrypsiniert und im Verhältnis 1:10 in neue Schalen passagiert, um zu gewährleisten, dass sie sich in der Wachstumsphase befinden. Nachdem die Zellen zwei Tage lang mit DMEM mit Zusätzen gefüttert worden waren, wurden im Folgenden je drei Schalen täglich mit Inokulum (wie unter Kapitel 3.3.1.1 beschrieben) beschickt.

29 Tage nach Infektionsbeginn wurden die Schalen in 1 ml Lysispuffer lysiert. Das Lysat wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 2 Min. bei 13000 U/min zentrifugiert. Das Pellet, bestehend aus Membranstücken, DNA und weiterem zellulärem Debris wurde verworfen und der Überstand mit den gelösten Proteinen weiterverarbeitet. Jeweils 100 μl postnukleärer Überstand wurden zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet. 400 μl des Lysats wurden sofort nach der Lyse und Zugabe der Proteaseinhibitoren Pefabloc und Trasylol eingefroren.

500 μl Lysat wurden 30 Min. lang mit 20 μg Proteinase K/ml Lysat bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde der Verdau mit je 10 μl Pefabloc und Trasylol gestoppt, und die Proben bei -20°C tiefgefroren. Die spätere Analyse erfolgte mittels Westernblot.

3.3.2.2 Inokulation mit PrP^{Sc}-Zelllysaten

Für die Infektion mit Zelllysaten wurden N2a-Zellen und GT1-Zellen verwendet. Die Kulturen wurden je nach Versuchsanordnung in 6-Loch-Platten (zur Verfolgung der frühen Infektionsstadien mittels EM), 5 cm- und 9 cm-Schalen unter der Verwendung von *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (mit Glutamin und 10 % fetalem Kälberserum) angezchtet, bis sie subkonfluent waren.

Dann wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Um die Zellen etwas „auszuhungern“ wurden sie eine Stunde lang mit 2 ml *Modified Eagle's Medium* (MEM, ohne FCS und weitere

Zusätze) bei 37°C inkubiert. Danach wurde das in 2 ml DMEM entsprechend verdünnte Inokulum (siehe Kapitel 3.3.1.2) zugegeben, und die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert.

Die verwendeten GT1-Zellen konnten maximal eine Stunde mit Inokulum inkubiert werden. Für die Infektion der robusteren N2a-Zellen erwiesen sich zwei Stunden als optimale Inokulationszeit. Danach wurde das Inokulationsmedium abgesaugt und ohne Waschen normales DMEM mit 10% FCS zugegeben.

Viele dieser „*bulk*“-infizierten Zellen starben im Verlauf des ersten Tages *post infectionem*; die überlebenden Zellen wuchsen in den ersten 5 Tagen nach der Infektion sehr langsam und zeigten deutliche Vakuolenbildung. Zellyse und Analyse durch Westernblot erfolgten daher frühestens nach 10 Tagen. Der cytotoxische Effekt wurde auch durch „*mock*“-Inokulum (Zellysat aus uninfizierten Zellen) hervorgerufen, die Vakuolisierung war jedoch gering.

Sollte eine klonale Selektion im Hinblick auf infizierte Zellen erfolgen, wurden die Zellen nach der entsprechenden Inokulationszeit von der Schale abtrypsiniert und gemäß oben stehendem Protokoll auf 96-*well*-Platten (siehe Kapitel 3.2.3) ausgesät.

Für die Verfolgung der frühen Infektionsstadien mittels EM wurden die Zellen in den definierten Zeitabständen abtrypsiniert und nach dem untenstehenden Protokoll für Standard- und Immuno-EM fixiert (siehe Kapitel 3.3.2.3).

3.3.2.3 Infektion mit Hirnhomogenaten aus prion-infizierten Mäusegehirnen

Die Infektion mit PrP^{Sc}-Hirnhomogenaten erfolgte analog zu Kapitel 3.3.2.2. Anstelle des Zellysats wurde in 2 ml DMEM entsprechend verdünntes Inokulum – in der Regel 1% Hirnhomogenat (Herstellung: siehe Kapitel 3.3.1.3) – direkt (ohne Entfernen des MEM) zugegeben, und die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert.

Im Vergleich zu den Inokulationen mit Zellysat erwies sich das Hirnhomogenat (PrP^{Sc}-Homogenat und „*mock*“-Homogenat) als weitaus toxischer für die Zellen. Das Medium wurde nach 3 Stunden entfernt und die Zellen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen. Danach wurde frisches DMEM auf die Platten gegeben.

Die infizierten Zellen wurden wie in den oben stehenden Kapiteln in den anschließenden Untersuchungen weiterverarbeitet.

3.4 Methoden zur Charakterisierung von PrP^C und PrP^{Sc}

3.4.1 Herstellung des Zelllysats

Für die elektrophoretische Auftrennung zellulärer Proteine wurden die Zellen zuerst zweimal mit kaltem PBS gewaschen und nach gründlichem Abpipettieren der Flüssigkeit 10 Minuten lang mit 1 ml Lysispuffer behandelt. Das erhaltene Lysat wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und die Zelltrümmer 2 Minuten bei 13000 U/min in der Tischzentrifuge sedimentiert. Das Pellet, bestehend aus Membranen, DNA und weiterem zellulärem Debris wurde verworfen.

Aufgrund ihrer identischen Primärstruktur lassen sich PrP^C und PrP^{Sc} einer Spezies nicht unter denaturierenden Bedingungen mit den verfügbaren Antikörpern unterscheiden. Alle Testprinzipien basieren daher auf ihren unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften. PrP^{Sc} ist im Gegensatz zu PrP^C in Detergentien (z.B. 1% Sarkosyl) unlöslich und resistent gegen limitierten Proteinase K-Verdau. Je nach erforderlicher Versuchsanordnung erfolgte die Separation der beiden Isoformen durch einen Zentrifugationsschritt in Gegenwart von Sarkosyl und/oder eine Behandlung mit PK. Die Herstellung der Zelllysate ist in Tabelle 16 zusammengefasst.

Das PrP^{Sc}-haltige Sediment wurde anschließend in TNE aufgenommen und resuspendiert, mit Probenpuffer versetzt und kurz vor dem Auftragen auf das Gel 5 Min. in einem Heizblock bei 95°C denaturiert.

Tabelle 16: Aufbereitung der Zellysate zur Unterscheidung von PrP^C und PrP^{Sc} in ScN2a-Zellen.

Prinzip	PrP^C-Nachweis	PrP^{Sc}-Nachweis	PrP^{Sc}-Nachweis	PrP^{Sc}-Nachweis
Eigenschaften des gewonnenen PrP	sowohl natives, lösliches, PK-sensitives Protein (PrP ^C) als auch Scrapie-Isoform (PrP ^{Sc})	Unlöslichkeit	PK-Resistenz	Unlöslichkeit und PK-Resistenz: Scrapie-Isoform (PrP ^{Sc} entspricht PrP 27-30)
Unlöslichkeit		Sedimentation in Gegenwart von 1% Sarkosyl durch UZ (100.000 x g für 1 h)		Sedimentation in Gegenwart von 1% Sarkosyl durch UZ (100.000 x g für 1 h) Solubilisierung des Pellets in PBS
Protease-resistenz			1 µl 0,5% PK (= 10µg PK/ml Lysat) bei 37°C für 30 Min.	
Blockierung der Proteindegradation	5 mM Trasylol + 0,5 mM Pefabloc			
Fällung	Fällung in Methanol 12 h bei -20°C		Fällung in 10 ml Methanol 12 h bei -20°C	
Gewinnung des Pellets	Zentrifugation 30 Minuten, 4000 rpm		Zentrifugation 30 Min., 4000 rpm	
Solubilisierung	Aufnahme des Pellets in TNE			
Lagerung	Einfrieren bei -20°C			

3.4.2 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Zur Proteinbestimmung wurde der Bradford-Test, der auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine beruht, verwendet (Bradford, 1976).

Dazu wurden 50 µl Probe in nicht denaturierendem, seifenfreiem Puffer (z.B. TNE) mit 1,5 ml Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce) gut gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten erfolgte die photometrische Messung gegen den Leerwert (50 µl Lösungsmittel + 1,5 ml Coomassie Plus) bei 595 nm. Die gemessenen Extinktionen wurden anschließend auf Proteinkonzentrationen umgerechnet.

3.5 Methoden zur elektrophoretischen Proteinauftrennung (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde das Verfahren nach Lämmli (Laemmli, 1970) verwendet, das mit Tris-Glycin-Puffern in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidsystem arbeitet. SDS denaturiert die Proteine – vor allem, wenn sie zuvor mit Mercaptoethanol reduziert wurden – und bildet mit ihnen negativ geladene Komplexe mit einem konstanten Ladungs- zu Masse-Verhältnis (1,4 g SDS/g Protein in 1% SDS-Lösungen), die in der Polyacrylamidmatrix nach ihrem Stokes-Radius (und somit nach ihrer Größe) getrennt werden. Für die Molekulargröße der zu untersuchenden Proteine erwies sich eine Konzentration von 12,5% Acrylamid im Trenngel als optimal.

3.5.1 Das Gelsystem

Die Gel-Lösungen wurden aus den im Abschnitt „Puffer“ (Kapitel 3.9.2) angegebenen Chemikalien gemischt. Zur Verwendung kam hauptsächlich das Tall-Mighty-Small-System von Hoefer. Zum Gießen der Gele wurden jeweils vier Sätze – bestehend aus einer Glasplatte und einer Keramikrückwand (10 x 12 cm) mit Abstandshaltern (0,75 mm bzw. 1,5 mm Stärke) – zusammengefügt und durch Wachspapier voneinander getrennt in einer Gussform angeordnet. Zuerst wurde das Trenngel mittels einer Glaspipette blasenfrei bis ca. 2 cm unter den Oberrand der Form eingefüllt und mit H₂O-gesättigtem N-Butanol (Merck) bedeckt. Nach vollständiger Polymerisation (ca. 2 h) wurde das Butanol vorsichtig dekantiert und das Sammelgel überschichtet. Zuletzt wurde pro Einzelform ein Teflonkamm eingesetzt, dessen Zinken die späteren Auftragslöcher für die Proben formten. Nach der Polymerisation des Sammelgels (2 h) wurden die Gele entweder sofort verwendet oder in feuchte Papiertücher gewickelt und in zugeschweißten Plastikfolien im Kühlschrank bei 4°C bis zu einer Woche aufbewahrt.

Zur Verwendung des Gels wurde der Kamm zwischen den Platten herausgezogen, und die Auftragslöcher vorsichtig mit destilliertem Wasser gespült, um vorhandene Gelreste zu entfernen. Anschließend wurde die Gelanordnung mittels Kunststoffklammern in die Elektrophoresekammer eingespannt und Kathoden- und Anodenkammer mit dem Laufpuffer gefüllt. Luftblasen an den Elektroden und der Gelkammer wurden mit einer Pipettenspitze entfernt.

3.5.2 Probenvorbereitung und Referenzproben

Die in TNE gelösten Proben wurden im Verhältnis 1:3 mit 4-fach-Probenpuffer versetzt und 10 Min. bei 95°C gekocht, um die Proteine vollständig zu denaturieren, eventuell vorhandene Proteasen zu inaktivieren und die Ausbildung von Tertiärstrukturen zu verhindern. Bis zur SDS-PAGE wurden die Proben kurz auf Eis gelagert und vor dem Auftragen kurz in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Mittels einer Mikropipette (Eppendorf) wurden die Proben in die Auftragslöcher eingebracht, freie Löcher wurden mit 1-fach konzentriertem Probenpuffer gefüllt, um eine homogene Ionenstärke zu garantieren.

3.5.2.1 Proteingrößenstandard

Zur Abschätzung des Molekulargewichts der zu untersuchenden Proben im Gel wurde der „*Rainbow coloured protein molecular weight marker*“ (Amersham) in einer Konzentration von 0,46 µg Marker/µl Probenpuffer beladen.

Die in Kapitel 3.9 („Verwendete Puffer und Lösungen“) Aufstellung in Tabelle 26 gibt Aufschluss über die Zusammensetzung und Molekulargewichte der Proteinmischung.

3.5.2.2 Kontrollen

Pro Gel wurden in der Regel mindestens zwei Kontrollen mit bekanntem Zelllysate (infizierte Zellen, sowohl mit als auch ohne PK-Verdau) aufgetragen, um einen Referenzwert bezüglich der Transfereffizienz, Immunreaktion und Proteinmenge zu erhalten.

Zusätzlich wurden, falls es die durchzuführenden Experimente erforderten, entsprechende Kontrolllysate aufgetragen.

3.5.3 Elektrophoresebedingungen

Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA bei RT.

Sobald die Lauffront den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte, wurde Gellauf beendet. Die Puffer wurden in einen speziellen Sammelbehälter für Scrapie-Abfälle abgegossen und das Gelsystem zerlegt. Die Glasplatte wurde vorsichtig mit Hilfe eines Skalpell vom Gel abgehoben. Anschließend wurde das Gel mit dem Skalpell ausgeschnitten und für den Elektrotransfer (Kapitel 3.6) vorbereitet.

3.6 Westernblot-Analyse

3.6.1 Elektrotransfer auf Nitrozellulose- bzw. PVDF-Membranen (Blotting)

Aufgrund der unterschiedlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften der Blotting-Membranen wurden sowohl PVDF-Membranen als auch Nitrozellulose-Membranen verwendet. Die Nitrozellulose-Membranen besitzen gegenüber PVDF-Membranen eine höhere Proteinbindungskapazität und wurden vor allem bei niedrigen Proteinkonzentrationen eingesetzt. Die kostenintensiveren PVDF-Membranen sind hingegen mechanisch stabiler und damit leichter handhabbar. Man erreicht bei ihrer Verwendung in der Immunfluoreszenzreaktion mit dem ECLplus-System der Firma Amersham eine höhere Sensitivität. Jedoch muss man beim Blotten mit einem Proteinverlust von 10-50% und einem unspezifischerem Hintergrund rechnen (Gultekin und Heermann, 1988). Zudem sind PVDF-Membranen um ein mehrfaches teurer.

Für den Elektrotransfer wurde eine dem Gelstück entsprechende Nitrozellulosemembran sowie sechs etwas größere Stücke Whatman-Papier zugeschnitten und in Transferpuffer äquilibriert. Aufgrund der Hydrophobizität der PVDF-Membranen wurden diese vor ihrer Verwendung mit reinem Methanol benetzt. Als Blotkammer kam die Halbtrockenzelle von Biorad zum Einsatz. Die Transfermembran wurde auf drei Lagen Whatman-Papier gelegt und darauf das angefeuchtete Gel luftblasenfrei platziert. Darüber wurden erneut drei Schichten äquilibriertes Filterpapier gelegt und verbliebene Luftblasen mit einer Plastikpipette vorsichtig ausgestrichen. Je nach Geldicke, Proteingröße und -konzentration wurde für 20 und 40 Min. mit Spannungen zwischen 15 und 20 Volt geblottet.

Nach dem Elektrotransfer der Proteine auf die Membran wurde die Blotvorrichtung zerlegt, das Gel mit einer stumpfen Pinzette von der Membran abgehoben und die Transfereffizienz überprüft. Waren noch Farbbanden der Marker oder die Lauffront im Gel zu sehen, wurde ein neues Gel hergestellt und der Transfer mit veränderten Parametern (Spannung, Transferzeit) wiederholt. Nach einem erfolgreichem Transfer wurde die Membran mit einer stumpfen Pinzette abgenommen und die nicht geblotteten Bereiche weggeschnitten.

Es ist wichtig, die Membran nach dem Blotten keinesfalls trocken werden zu lassen.

3.6.2 Färbung mit Ponceau-S

Nach erfolgtem Proteintransfer wurde die Membran zwei Minuten bei Raumtemperatur in einer Färbelösung aus 2% (w/v) Ponceaurot in 3% (v/v) Trichloressigsäure inkubiert. Mit dieser Färbung lassen sich Proteinbanden ab einer Konzentration von mehr als 50 ng pro Bande sichtbar machen.

Diese Färbung gab Aufschluss über die Qualität des Transfers und diente somit zur methodischen Kontrolle der allgemeinen Transfereffizienz, als auch zur Fehlererkennung innerhalb des geblotteten Probenguts.

Zudem fixiert die Trichloressigsäure die Proteine auf der Membran und verhindert ihr Auswaschen bei der nachfolgenden Immunfärbung. Die Poinceau-S-Färbung ist reversibel und verschwindet beim nachfolgenden Blocken der Membran (siehe unten).

3.6.3 Blocken der Membran

Vor der Immunfärbung des Blots müssen die unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch geeignete Puffer abgesättigt werden, um Hintergrundrauschen und Kreuzreaktion der Antikörper zu minimieren. Die Membranen wurden 45 Min. in Blockpuffer auf einem Schüttler bei Raumtemperatur geblockt und danach dreimal in TBST (Kapitel 3.9, Tabelle 19) gewaschen und nach jedem Waschvorgang kurz mit Aqua bidest. gespült.

3.6.4 Immunfärbung

Nach dem Entfernen des Blockpuffers wurden die Membranen mit der Proteinseite nach unten in Kunststoffschalen gelegt und mit entsprechend in TBST verdünnten Antikörper (gemäß Tabelle 17) inkubiert. Die Schalen wurden mit Frischhaltefolie gegen Verdunstung geschützt und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank oder mindestens 3 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 17: verwendete Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Ursprung</i>	<i>mono- / polyklonal</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Herkunft</i>
Anti-PrP-Antikörper					
RO-73	Kaninchen	polyklonal	1:7500	PrP ^C /PrP ^{Sc} Mo/Hu/Ham	S. Prusiner
3F4	Maus	monoklonal	1:10000	PrP ^C /PrP ^{Sc} Ham	Signet Laboratories Inc.
RA-5	Kaninchen	polyklonal	1:1500	PrP ^C /PrP ^{Sc} Mo/Ham	M. Groschup
RA 18/4	Kaninchen	polyklonal	1:1500	PrP ^C (N-term) Mo/Ham	M. Groschup
SAF-70	Maus	monoklonal	1:5000	PrP ^C /PrP ^{Sc} (C-term 150)	J. Grassi
Antikörper gegen zelluläre Markerproteine					
anti-NSE (ab951)	Kaninchen	polyklonal	1:7500	Neuronen-spezifische Enolase (46 kDa)	Chemicon International Inc.
anti-bNOS	Maus	monoklonal	1:2500	neuronale NO-Synthase	Transduction Laboratories
anti-Phosphotyrosin (PY20)	Maus	monoklonal	1:2000	Phosphotyrosin	Transduction Laboratories
anti-14-3-3	Kaninchen	polyklonal		14-3-3	Santa Cruz Biotechnologies

3.6.5 Waschen und zweite Immunreaktion

Nach dem Dekantieren der Erstantikörperlösung wurde die Membran fünfmal 5 Min. mit reichlich TBST gewaschen und zwischen den Waschvorgängen mit Aqua bidest. kurz abgespült, um nichtgebundene Antikörper zu entfernen.

Anschließend folgte die Inkubation des Blots mit dem entsprechend in TBST verdünntem Sekundärantikörper, der gegen das F_c-Fragment des Erstantikörpers gerichtet ist, für weitere 45 Min. bei Raumtemperatur auf einem Schüttler.

Die Membran wurde danach erneut fünfmal mit TBST und Aqua bidest. gewaschen, um den unspezifischen bzw. nicht gebundenen Zweitantikörper zu beseitigen.

3.6.6 Chemolumineszenz (ECL und ECLplus)

Zur Visualisierung der geblotteten Antigene wurde das auf Chemolumineszenz basierende ECL-System (bzw. das sensitivere ECLplus) verwendet. Im Gegensatz zum colorimetrischen System mit alkalischer Phosphatase (AP) ist ECL ca. 10 mal sensitiver. Die Nachweisgrenze liegt im Picogramm-Bereich. Zudem können sich die Membranen – wie in Kapitel 3.6.7 beschrieben – mehrmals mit verschiedenen Antikörpern gefärbt werden.

Die an den Zweitantikörper konjugierte Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol unter Freisetzung von Photonen. Die emittierte Strahlung wird durch die Belichtung eines Röntgenfilms detektiert und aus der Schwärzung des Films sich die vorhandene Antigenmenge quantifiziert.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden in der Dunkelkammer bei normalen Lichtbedingungen durchgeführt. Erst beim Auflegen des Blots auf den Röntgenfilm wurde die Beleuchtung abgeschaltet und nur ein Kodak-Safelight® angelassen.

Die Membran wurde zunächst zwischen zwei Lagen Filterpapier kurz getrocknet und dann exakt eine Minute im zuvor angesetzten ECL-Reagenz inkubiert. Anschließend wurde sie zwischen zwei Lagen Filterpapier gelegt, um überschüssiges ECL-Reagenz abzusaugen. Danach wurde sie auf ein Stück Frischhaltefolie platziert und faltenfrei eingeschlagen. Zur Belichtungskontrolle und Orientierung des Blots wurde zusätzlich ein selbstleuchtender Glogos II Autorad-Marker von Stratagene auf die Folie geklebt.

Es schloss sich eine Exposition der Membran auf einen Röntgenfilm (Kodak Biomax MR/X-OMAT) an. Die erste Exposition betrug in der Regel drei Minuten. Der Film wurde in einer Entwicklermaschine (Optimax TR) entwickelt. Es wurden nacheinander mehrere Expositionen durchgeführt. Die anhand von Erfahrungswerten ermittelten weiteren Expositionszeiten waren abhängig vom Resultat der ersten Entwicklung und umfassten Zeiträume zwischen zwei Minuten und mehr als sechs Stunden. Die Lichtemission des Substrats nahm logarithmisch ab und war bei ECL bereits nach ein bis zwei Stunden erschöpft. Das ECLplus System hatte eine um ein Vielfaches längere Lichtemission und konnte auch bei niedrigen Proteinkonzentrationen befriedigende Resultate liefern.

3.6.7 „Stripping“ und „Reprobing“

Für eine erneute Immundetektion mit einem anderen Erstantikörper müssen die bestehenden Antikörper-Antigen-Komplexe wieder gelöst werden. Dieser Vorgang wird als „*stripping*“ bezeichnet. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran 90 Min. lang bei 60°C in Stripping-Puffer (Tabelle 30) im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Membranen fünf Minuten lang mit TBST gewaschen und mit Aqua bidest. gespült. Der Waschvorgang wurde dreimal wiederholt; danach wurde wie oben beschrieben, die Membran mit 5% Milchpulver in TBST geblockt. Danach konnte eine erneute Immunreaktion mit einem anderen Antikörper („*reprobing*“) durchgeführt werden.

Bei jeder „*stripping*“-Reaktion wird allerdings die Proteinmenge auf der Membran beträchtlich verringert, so dass die Lichtausbeute bei der Chemolumineszenz deutlich sinkt. Dieser Vorgang konnte daher – abhängig von der auf der Membran gebundenen Proteinkonzentration – maximal drei- bis viermal wiederholt werden, danach sank die Proteinkonzentration auf der Membran meist unter die Sensitivitätsgrenze des ECL-Tests.

3.7 Methoden zur Untersuchung der Apoptose-Induktion und Zytotoxizität

3.7.1 DNA-Fragmentationsassay

Konfluente Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit je 1 ml hypotonem Lysis-B-Puffer aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden für 20 Min. bei 14000 x g sedimentiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen und mit 50 µg/ml RNase (DNase-frei, Boehringer-Mannheim) 2 h bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mit Phenol-Chloroform extrahiert und Phenolreste mit Chloroform-Isoamylalkohol (jeweils im Verhältnis 24:1) beseitigt. Die cytosolische DNA wurde mit 2,5 Volumen 96% Ethanol (v/v) mit 10% (v/v) 3 M Natriumazetat präzipitiert und 1 h bei 33000 x g sedimentiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden die Pellets in 70% Ethanol gewaschen und dann in 50 µl TE (pH 7,5) aufgenommen. Aliquots von jeweils 10 µl wurden auf ein vorbereitetes 1,9% Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einer UV-Kamera photographiert.

3.7.2 *In situ* Messung von Apoptosevorgängen (TUNEL)

Das Apoptoseverhalten der Zellen wurde mit dem „*In Situ Cell Detection Kit*“ von Boehringer Mannheim untersucht (*TdT-mediated dUTP nick end labelling – TUNEL*). Dieser erlaubt den direkten Nachweis von DNA-Fragmentation durch Markierung der Apoptose-induzierten DNA-Einzelstrangbrüche („*nicks*“). Durch eine terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) werden „*template*“-unabhängig Fluoreszenzfarbstoff-markierte Nucleotide an die 3'-OH-Enden der „*nicks*“ synthetisiert. Diese markierten Polymere können dann mittels Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie sowie Durchflußzytometrie erfasst und quantifiziert werden. Im Vergleich zum DNA-Fragmentationsassay (Kapitel 3.7.1) erwies sich das TUNEL-Verfahren als spezifischer und um das zehnfache sensitiver.

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit Trypsin von der Petrischale abgelöst und auf eine Konzentration von 10⁴/ml Medium eingestellt. 200 µl Zellsuspension wurden auf sterile Objektträger für Zellkultur pipettiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, und die Vertiefungen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen. Mit einem Skalpell wurden die auf den Glasplatten angeklebten Kunststoffrahmen und eventuelle Klebstoffreste entfernt. Die Objektträger wurden in frisch angesetzter Paraformaldehydlösung (4% in PBS, pH 7,4) 30 Min. bei Raumtemperatur fixiert und danach mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurden die Objektträger 2 Min. in einer Lösung aus 0,1% (w/v) Triton X-100 und 0,1% (w/v) Natriumcitrat auf Eis inkubiert. Danach wurden sie erneut zweimal mit PBS gewaschen und überschüssige Flüssigkeit mit einem Stück Filterpapier abgesaugt. Nach dem Hinzufügen von jeweils 50 µl TUNEL-Reagenz wurden die Objektträger mit Parafilm verschlossen und 60 Min. in einer Feuchtekammer bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden erneut dreimal mit PBS ge-

waschen, danach fixiert und eingedeckelt. Da das Signal der Lumineszenzreaktion sehr kurzlebig ist, mussten die so hergestellten Objektträger sofort nach ihrer Fixierung im Laserkonfokalmikroskop bzw. Fluoreszenzmikroskop fotografiert werden. Bei -20°C konnten sie maximal 24 Stunden aufbewahrt werden.

3.7.3 XTT-Proliferationstest

Zur Herstellung einer XTT-Stammlösung wurden 100 mg XTT in 100 ml auf 60°C vorgewärmtes PBS gelöst und in Portionen á 5 bei -20°C gelagert. Für eine 100 mM Phenanzinmethosulfat-Stammlösung wurde 1 g Phenanzinmethosulfat (PMS) in 32,6 ml PBS gelöst. Zum Gebrauch wurde diese auf eine Ausgangskonzentration von $1,25\ \mu\text{M}$ verdünnt. Für den Proliferationstest wurden die Zellen in 96-well Flachbodenplatten in einer Konzentration von $10^3/200\ \mu\text{l}$ Gesamtvolumen pro Vertiefung ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Pro Vertiefung wurden $40\ \mu\text{l}$ frisch angesetztes PMS/XTT (1:800) zugegeben, und die Platten erneut 2-4 h bei 37°C inkubiert. Lebende Zellen waren im Mikroskop durch eine kräftige orange Färbung zu erkennen. Die Mikrotiterplatten wurden direkt in einem ELISA-Reader mit dem Programm „easy fit“ eingelesen (Messfilter 450 nm, Referenzfilter 690 nm). Die Messwerte wurden als ASCII-Datei abgelegt, die in *Microsoft Excel* importiert und statistisch ausgewertet werden konnten (Roehm *et al.*, 1991).

3.8 Methoden zur in situ Darstellung der Prion-Infektion

3.8.1 Immunfluoreszenz

Zu untersuchende Zelllinien wurden in speziellen Objektträgern über Nacht angezchtet. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die einzelnen Auftragslöcher zweimal mit PBS gewaschen und danach die Zellen mit 10% Formalin in PBS 30 Min. bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde das Formalin entfernt und die Zellen 5 Min. lang durch Zugabe von 1% NH₄Cl in PBS *gequench*t. Anschließend erfolgte ein fünfminütiger Permeabilisierungsschritt in 0,5% Triton X-100 (in PBS). Zum Nachweis des PrP^{Sc} wurden die Zellen 5 Min. in 3 M Guanidinisothiocyanat (GdnSCN) denaturiert. Die Objektträger wurden dreimal mit PBS gewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden 30 Min. bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver in PBS geblockt.

Anschließend wurden die Objektträger 3 h bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper (z.B. 3F4 1:100 in 5% Milchpulver in PBS) inkubiert und dann die Proben sechsmal mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper („*Goat anti-rabbit*“ oder „*Goat anti-mouse*“, Boehringer-Mannheim, 1:50 im Blocking-Puffer) erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurden die Proben sechsmal mit PBS gewaschen und mit „*anti fading*“-Reagenz (5% N-Propylgallat in 100 mM Tris-HCl pH 9 und 70% (v/v) Glycerol) behandelt und dann mit einem Deckgläschen abgedeckt. Danach konnten die Zellen im Fluoreszenz- und/oder Laserkonfokalmikroskop untersucht werden.

3.8.2 Elektronenmikroskopie

3.8.2.1 Probenvorbereitung

Die Zelllinien wurden nach oben stehendem Protokoll infiziert und entsprechend weitergezchtet.

Zum definierten Zeitpunkt wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden zweimal vorsichtig mit kaltem PBS gewaschen. Bei 6-well-Platten wurden 500 µl, bei 5 cm-Platten wurde 1 ml Trypsin zugegeben, die Platte kurz geschwenkt und das Trypsin dann sofort abgenommen. Nach dreiminütiger Inkubation im Brutschrank, konnten die Zellen durch leichtes Beklopfen der Platte vom Träger abgelöst werden.

3.8.2.2 Fixierung für Standard-EM

Die besten Ergebnisse konnten erzielt werden, wenn die folgenden Arbeitsschritte konsequent auf Eis durchgeführt wurden:

Die mit Trypsin abgelösten Zellen wurden in 1 ml kaltem DMEM aufgenommen auf zwei Eppendorfgefäße verteilt (je 500 µl) und anschließend 3 Min. bei 3000 rpm sedimentiert.

Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, ohne das Pellet zu berühren. Danach konnte das Pellet in 0,1 mM Natrium-Cacodylat-Puffer aufgenommen werden. Die über Nacht fixierten Proben wurden in Natrium-Cacodylat-Puffer gewaschen und dann mit 1% (w/v) OsO₄ nachfixiert. Das Pellet wurde *en bloc* in 2,5% Uranylacetat gefärbt, in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und schließlich in Polybed 812 Epoxidharz (Polyscience) eingebettet.

3.8.2.3 Fixierung und Färbung für Immuno-EM

Die Färbung und Photographie der elektronenmikroskopischen Präparate wurde freundlicherweise von Dr. Lajos Laszlo (Eötvös University, Budapest) durchgeführt.

Mit Ausnahme des Nachfixierungsvorgangs mittels OsO₄ wurden die Proben für die Immunogoldmarkierung analog dem Verfahren für die Standard-Elektronenmikroskopie fixiert und eingebettet. Die Immunogoldfärbung wurde an 80-90 nm dicken Ultradünnschnitten, die an einem Nickelnetz gesammelt wurden, durchgeführt. Die Schnitte wurden vor der Antikörpermarkierung 10 Min. in 3% (w/v) GdnSCN in 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) denaturiert und danach mit PBS gewaschen. Zur Lokalisierung des Prionproteins wurde der Antikörper RO-73 in einer (1:100 verdünnt) verwendet. Kontrollschnitte wurden nach dem gleichen Verfahren behandelt, aber ohne Verwendung des RO-73-Antikörpers. Die Gegenfärbung erfolgte mit Uranylacetat und Bleicitrat.

Die fertigen Proben wurden im Elektronenmikroskop (JEOL 100-CX) untersucht und fotografisch dokumentiert.

3.9 Verwendete Puffer und Lösungen

3.9.1 Allgemeine Pufferlösungen

Tabelle 18: 1 x PBS (*Phosphate-buffered Saline*)

Substanz	Konzentration	Einwaage
NaCl	171 mM	10,0 g
KCl	3 mM	0,25 g
Na ₂ HPO ₄	10 mM	1,43 g
KH ₂ PO ₄	2 mM	0,25 g
Aqua bidest.		ad 1000 ml

Tabelle 19: 1 x TBST (*Tris-Buffered Saline TWEEN*)

Substanz	Konzentration	Einwaage
Tris-HCl pH 8,0 (1 M)	10 mM	10,0 ml
NaCl (5 M)	150 mM	30,0 ml
TWEEN-20	0,05% (v/v)	0,5 ml
Aqua bidest.		ad 1000 ml

Tabelle 20: 1 x Lysispuffer zur Proteinextraktion für Westernblots

Substanz	Konzentration	Einwaage
Tris-HCl pH 7,5 (1 M)	10 mM	1,0 ml
NaCl (5 M)	100 mM	2,0 ml
EDTA (0,5 M)	10 mM	2,0 ml
Triton X-100	0,5% (v/v)	0,5 ml
DOC	0,5% (w/v)	0,5 g
Aqua bidest.		ad 100 ml

Tabelle 21: 1 x Lysis-B Puffer zur DNA-Extraktion

Substanz	Konzentration	Einwaage
Tris-HCl pH 7,4 (1 M)	15 mM	1,5 ml
EDTA (0,5 M)	5 mM	1,0 ml
Triton X-100	0,5%	0,5 ml
Aqua bidest.		ad 100 ml

3.9.2 Puffer und Gele für die Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tabelle 22: 1 x Sammelgelpuffer (*Upper Gel Buffer*)

Substanz	Konzentration
Tris-HCl pH 6,8 (1 M)	0,25% (v/v)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,2% (w/v)

Tabelle 23: 1 x Trenngelpuffer (*Lower Gel Buffer*)

Substanz	Konzentration
Tris-HCl pH 8,8 (1 M)	0,75% (v/v)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,2% (w/v)

Tabelle 24: SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE), Acrylamidkonzentration : 5% Sammelgel, 12,5% Trenngel.

Substanz	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid-Bis-Acrylamidlösung (30:0,5)	2,5 ml	25,0 ml
Lower-Gel-Buffer (Tabelle 23)	-	30,0 ml
Upper-Gel-Buffer (Tabelle 22)	7,5 ml	-
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	10 µl	20 µl
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	50 µl	200 µl
Aqua bidest.	5,0 ml	5,0 ml
Endvolumen	15,0 ml	60,0 ml

Tabelle 25: 4-fach-Probenpuffer (4x SEB)

Substanz	Konzentration	Einwaage
Tris-HCl pH 6,8 (1 M)	90 mM	9,0 ml
Glycerin	30% (v/v)	30,0 ml
SDS, 20%	7% (v/v)	7,0 ml
2-Mercaptoethanol	20 % (v/v)	20,0 ml
Bromphenolblau	0,01% (w/v)	0,01 g
Aqua bidest.		ad 100 ml

Tabelle 26: Proteingrößenstandard „Rainbow coloured protein molecular weight markers“

Protein	Molekulargewicht (Dalton)	Farbe
Myosin	200.000	blau
Phosphorylase b	97.400	braun
Rinderserumalbumin	69.000	rot
Ovalbumin	46.000	gelb
Carboanhydrase	30.000	orange
Trypsininhibitor	21.500	grün
Lysozym	14.300	magenta

Tabelle 27: 1 x Elektrophoresepuffer

Substanz	Konzentration	Einwaage
Tris-HCl pH 8,2 (1 M)	25 mM	25,0 ml
Glycin	192 mM	23,0 g
SDS	0,1% (w/v)	1,0 g
Aqua bidest.		ad 1000 ml

3.9.3 Westernblot

Tabelle 28: 1 x Transferpuffer

Substanz	Konzentration	Einwaage
Tris (1M) pH 8,5	25 mM	25,0 ml
Glycin	192 mM	23,0 g
Methanol	10% (v/v)	100,0 ml
Aqua bidest.		ad 1000 ml

Tabelle 29: 1 x Blocking-Puffer

Substanz	Konzentration	Einwaage
Tris-HCl pH 8,0 (1 M)	10 mM	1,0 ml
NaCl (5 M)	150 mM	3,0 ml
TWEEN-20	0,05% (v/v)	0,05 ml
Magermilchpulver	5,0% (w/v)	5 g
Aqua bidest.		ad 100 ml

Tabelle 30: 1 x Stripping-Puffer für Nitrozellulose-Membranen

Substanz	Konzentration	Einwaage
Tris-HCl (1M) pH 6,7	62,5 mM	6,25 ml
SDS	2,0% (w/v)	2,0 g
2-Mercaptoethanol	100 mM	0,71 ml
Aqua bidest.		ad 100 ml

3.9.4 Elektronenmikroskopie

3.9.4.1 Lösungen Standard-EM

Tabelle 31: Stammlösung für Natrium-Cacodylat-Puffer

Substanz	Konzentration	Einwaage
Na-Cacodylat	0,4 M	21,4 g
Aqua bidest.		ad 250,0 ml

Tabelle 32: 0,2 M Natrium-Cacodylat-Puffer (pH 7,2)

Substanz	Konzentration	Einwaage
Na-Cacodylat-Stammlösung (0,4 M)	200 M	50,0 ml
HCl (0,2 M)	16 mM	8,0 ml
Aqua bidest.		ad 100,0 ml

Tabelle 33: 2,5% Glutaraldehyd-Puffer zur Fixierung (muss nach dem Ansetzen auf pH 7,2 eingestellt werden).

Substanz	Konzentration	Einwaage
Na-Cacodylat-Puffer (0,2 M)	100 mM	50,0 ml
Glutaraldehydlösung 25% (v/v)	2,5%	10,0 ml
Saccharose	30 mM	1,0 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	3 mM	44,1 mg
Aqua bidest.		40,0 ml

3.9.4.2 Lösungen Immuno-EM

Tabelle 34: 3,2% Paraformaldehyd-0,4% Glutaraldehyd-Fixierungslösung (muss nach dem Ansetzen auf pH 7,2 eingestellt werden)

Substanz	Konzentration	Einwaage
0,2 mM Na-Cacodylat-Puffer	100 mM	100,0 ml
16% Paraformaldehyd (v/v)	3,2% (v/v)	40,0 ml
8% Glutaraldehydlösung (v/v)	0,4% (v/v)	10,0 ml
CaCl ₂ x 2H ₂ O	3 mM	88,2 mg
Saccharose	30 mM	2,0 g
Aqua bidest.		50,0 ml

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung persistierend

PrP^{Sc}-infizierter Zellpopulationen

4.1.1 Bestimmung der Infektionsrate persistierend infizierter ScMHM2-Zellen

Scott *et al.* verwendeten bei der stabilen Transfektion des chimären MHM2-Konstrukts zuvor mit Scrapie infizierte, murine Neuroblastomzellen (ScN2a) (Scott *et al.*, 1992). Der infizierte Zellstamm wurde im Hinblick auf PrP^{Sc}- bzw. die ScMHM2-Expression nicht weiter klonal selektiert. Er bestand also aus einer Mischung von mehr oder weniger stark persistierend mit Prionen infizierten Zellen. Einige Zellen hatten ihre Infektion sicher auch mit der Zahl der Passagierungen verloren oder waren nie infiziert worden bzw. verloren das Transgen.

Es galt daher zuerst die Frage zu klären, zu welchem Prozentsatz diese Zellen prion-infiziert sind. Als weiterer Versuch war die Herstellung unterschiedlich stark PrP^{Sc}-exprimierender Zelllinien für die Untersuchung der Stabilität der Infektion und der Expression zellulärer Marker geplant. Als Technik bot sich hierzu die klonale Selektion und anschließendes Screening auf PrP^{Sc} mittels Westernblot an.

Eine persistierend infizierte ScMHM2 Zellpopulation wurde auf 10³ Zellen pro Loch einer 96 well-Mikrotiterplatte eingestellt. Die Zellen wurden im Endpunkttitrationsverfahren um den Faktor 5 pro Reihe verdünnt. In den folgenden Wochen konnte in einigen Löchern ein klonales Wachstum der Zellen beobachtet werden. Diese Zellen wurden dann über 24 well- und 4 cm-Platten auf jeweils zwei 9-cm-Schalen expandiert.

Auf diese Weise wurden 20 ScMHM2 Klone gezüchtet, von denen jeweils die Zellen einer Schale für spätere Verwendungszwecke kryokonserviert wurden und die der anderen Schale dem oben beschriebenen Prozess von Lyse, Proteinase K-Verdau und Westernblot-Präparation unterworfen wurden. Die PK-verdauten Proben sowie geeignete PrP^{Sc}-positive Kontrollen (mit und ohne PK-Verdau) wurden danach – eingestellt auf gleiche Zellzahl – auf 12,5%-ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Dann wurden die Gele mittels Westernblot auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Filter wurden mit den polyklonalen Anti-PrP-Antikörper RO-73 inkubiert und mittels ECL-Reaktion detektiert. Dieser Antikörper wurde gewählt, um die Gesamtmenge des PK-resistenten PrP nachzuweisen. Die untenstehende Abbildung (Abbildung 11) fasst das Ergebnis dieser Versuche zusammen.

Murines PrP^{Sc} zeigt im Westernblot ein klassisches Dreibandmuster: Die Schemazeichnung in Abbildung 10 zeigt das etwa 19 kDa große, unglykosylierte N-terminal trunkierte PrP^{Sc}. Die monoglykosylierte Form

liegt ein wenig unter 25 kDa, das Molekulargewicht der diglykosylierten PrP^{Sc}-Form liegt bei ca. 27-30 kDa. Zum Vergleich ist das zelluläre native PrP^C mit einer Größe von 32-35 kDa (diglykosylierte Form) dargestellt.

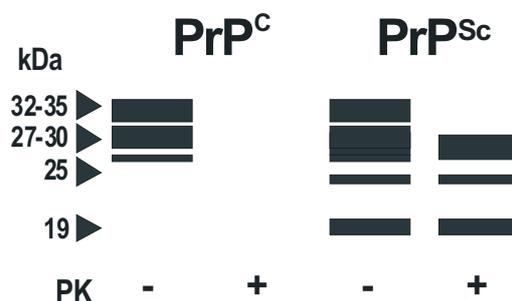


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Glykoformen von PrP^C und PrP^{Sc} mit und ohne Proteinasen K-Behandlung: Sowohl zelluläre (PrP^C) als auch die infektiöse Form (PrP^{Sc}) weisen ein Dreibandemuster auf, das aus dem di- mono- und unglykosylierten PrP besteht. PrP^C besitzt ein höheres Molekulargewicht (die diglykosylierte Form liegt bei 32-35 kDa) als das N-terminal trunkierte PrP^{Sc} (27-30 kDa). Durch PK-Verdau wird PrP^C vollständig abgebaut – die PrP^{Sc}-Isoform hingegen ist proteaseresistent.

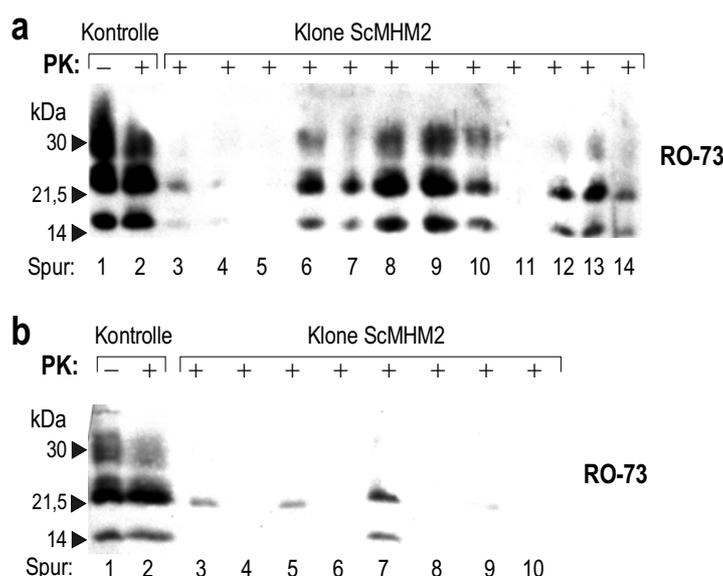


Abbildung 11a, b: Screening von 20 ScMHM2-Klonen auf PrP^{Sc}-Expression. Nach PK-Verdau ist das typische Dreibandemuster von PrP^{Sc} sichtbar: 70% der untersuchten Klone sind PrP^{Sc}-positiv (Spuren 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14 in Abbildung 11a und 3, 5, 7, 9 in Abbildung 11b). Das Expressionsmuster der Klone zeigt unterschiedliche PrP^{Sc}-Mengen. (Spuren 1 und 2: Kontrolle).

Von 20 untersuchten Klonen waren sechs PrP^{Sc}-negativ (Spuren 5, 11 in Abbildung 11a und 4, 6, 8, 10 in Abbildung 11b). Nicht alle Klone zeigten das typische Dreibandemuster für PrP^{Sc}-infizierte Zellen. Die Klone in den Spuren 3 und 4 in Abbildung 11a und 3, 5, 7 und 9 der Abbildung 11b zeigten ein schwach sichtbares bzw. inkomplettes Bandenmuster, wurden aber dennoch als Scrapie-positiv bewertet. Insgesamt waren 14 der 20 getesteten Klone im Westernblot Scrapie-positiv (Spuren 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14 in Abbildung 11a und 3, 5, 7, 9 in Abbildung 11b), was einer Infektionsrate von 70% der Ausgangszellen entspricht.

4.1.2 Vergleich von PrP^C und PrP^{Sc}-Expression in prion-infizierten Zellen

Die Intensität der Banden im Westernblot lässt einen gewissen Rückschluss auf die PrP^{Sc}-Konzentration der infizierten Zellen zu. Die Klone konnten dementsprechend in stark-, mittel- und schwach-exprimierend unterteilt werden. Vier Klone (Abbildung 11a, Spuren 6, 8,9 und Abbildung 11b, Spur 7) zeigten eine sehr starke, sieben eine mittlere (Abbildung 11a, Spuren 7, 10, 12, 13 und Abbildung 11b Spuren 3, 5, 9) und drei (Abbildung 11a, Spuren 3, 4, 14) eine schwache PrP^{Sc}-Expression.

Interessant waren diese Resultate im Hinblick auf die zelluläre PrP^C-Expression. 400 µl des oben gewonnenen Zelllysats eines jeden Klons wurden ohne Proteinase K-Verdau im Westernblot untersucht. Als Kontrolle diente ein Lysat aus RML-positiven Zellen (mit und ohne PK-Verdau). Den oben gefundenen drei sehr schwachen Klonen (aus den Spuren 3, 4 und 5 in Abbildung 11a) folgten zwei ausgewählte sehr starke Klone (Abbildung 11a, Spuren 8 und 9). Der Rest bestand aus drei mittelstark PrP^{Sc}-exprimierenden ScMHM2-Klonen (Abbildung 11a, Spuren 12-14). Abbildung 12 zeigt die PrP^C-Expression des 3F4-Konstrukts der ScMHM2-Klone (Blot der in Abbildung 11 gezeigten ScMHM2-Klone ohne PK-Verdau) im Vergleich mit einem Westernblot, der die korrespondierende PrP^{Sc}-Expression der gleichen Zellklone (Modifikation von Abbildung 11) zeigt.

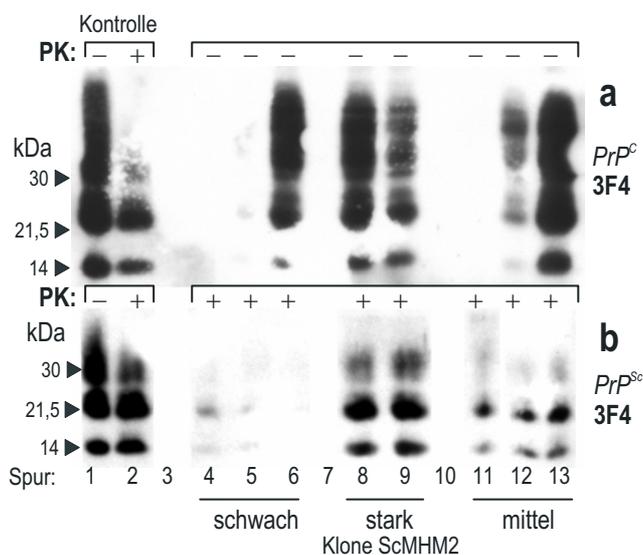


Abbildung 12: Vergleich der PrP^C-Expression von ScMHM2 Klonen mit ihrer PrP^{Sc}-Expression. Im unteren Bild ist der Westernblot aus Abbildung 11a (nur Banden 3, 4, 5, 8, 9, 12, 13, 14) nach PrP^{Sc}-Menge geordnet dargestellt. In Abbildung 12a) ist der entsprechende Zellklon aus b) ohne PK-Verdau gegenüber gestellt. PrP^C- und PrP^{Sc}-Expression der jeweiligen Klone korrelieren nicht miteinander. Abbildung 12b, Spuren 3, 7, 10: leer.

Im Fall der beiden sehr starken Klone korrelieren die PrP^C-Expression und PrP^{Sc}-Expression der Zellen: Beide Klone haben mit und ohne PK-Verdau deutliche Signale (Abbildung 12, Spuren 8 und 9), was sowohl auf eine hohe Expressionsrate für PrP^C, als auch auf eine Akkumulation der unlöslichen, Proteinase

K-resistenten PrP^{Sc}-Isoform schließen lässt. Bei den mittel- und schwach-PrP^{Sc}-exprimierenden ScMHM2-Klonen scheint es diese Korrelation nicht zu geben: Es sind Klone mit einer sehr hohen PrP^C-Menge und niedriger bis mittleren PrP^{Sc}-Mengen zu finden (Abbildung 12, Spuren 8 und 13). Ein Klon exprimiert praktisch kein PrP^C, aber deutliche Mengen proteaseresistentes PrP^{Sc} (Spur 11).

Eine direkte Korrelation zwischen PrP^C-Expression und akkumuliertem PrP^{Sc} lässt sich somit nicht ableiten.

4.1.3 Stabilität der Infektion

4.1.3.1 Zeitkinetik

Die Fragestellung bei dieser Untersuchung war, ob die Scrapie-Infektion der ScMHM2 Zellen über mehrere Zellgenerationen konstant bleibt oder ob die Zellen ihre Prion-Infektion im Laufe mehrerer Passagierungen eliminieren können. Weiterhin war zu klären, welche Verdünnungsstufe bei der Passagierung diesen Vorgang eventuell begünstigen könnte.

Persistierend mit Scrapie (RML) infizierte ScMHM2-Zellen wurden gleichzeitig auf insgesamt zehn Kulturplatten (d = 9 cm) angezchtet. Waren die Platten konfluent, wurden die Zellen von fünf Platten lysiert und die Proben für die Westernblot-Analyse vorbereitet. Die Zellen der anderen Platten wurden mit Trypsin abgelöst, mit Medium verdünnt und auf je zwei neue 9 cm-Schalen weiterpassagiert. Es wurden Verdünnungsraten von 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 und 1:50 gewählt. Nach Erreichen des konfluenten Stadiums wurden die Zellen einer Schale einer bestimmten Verdünnungsstufe lysiert und die der andere Schale nach gleichem Schema weiterpassagiert.

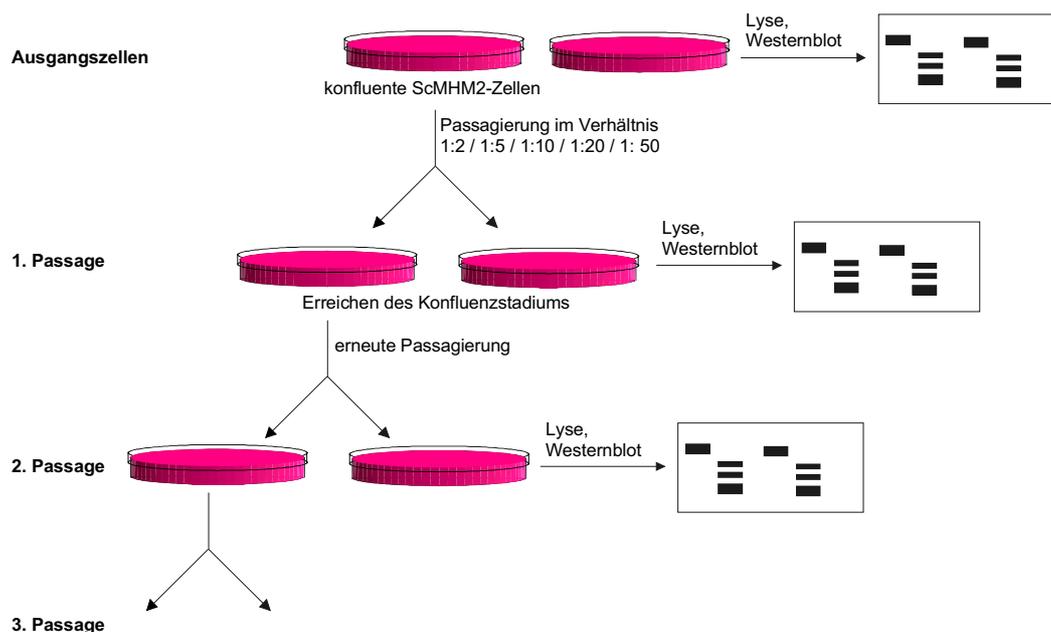


Abbildung 13: Passagierungsschema. Konfluente ScMHM2-Zellen wurden in festen Verdünnungsraten auf je zwei Kulturschalen gesplittet. Die Zellen einer Schale wurden für die Bestimmung der PrP^C und PrP^{Sc}-Expression verwendet. Die Zellen der zweiten Schale wurden nach Erreichen des Konfluenzstadiums weiterpassagiert.

Der Versuch erstreckte über insgesamt vier Passagen. Die gewonnenen Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt und sowohl Gesamt-PrP als auch das 3F4-*getaggte* PrP im Westernblot markiert. Die gewählten Verdünnungsstufen zeigten stets das gleiche Ergebnis: Das typische Bandenmuster beider PrP-Isoformen (PrP^C und PrP^{Sc}) war in den ersten zwei Wochen schwächer ausgeprägt und wurde im Zeitverlauf immer kräftiger (Abbildung 14).

Die Zellen wurden noch einige Wochen weiter passagiert. Es kam in Kultur zu keinem auffälligen Verlust von PrP^{Sc} (nicht gezeigt).

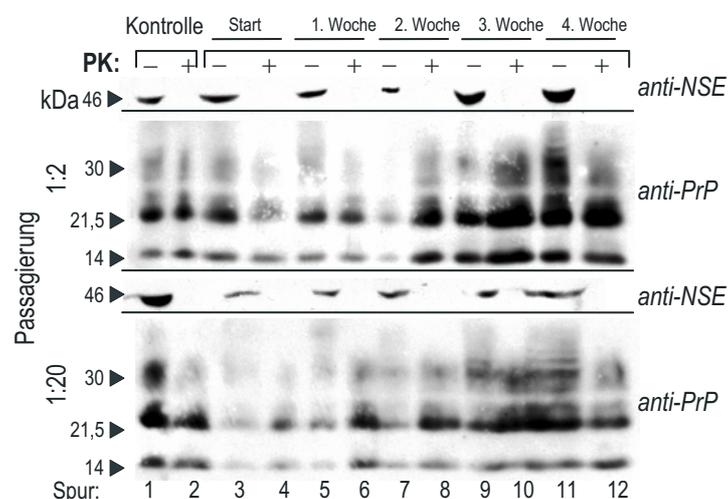


Abbildung 14: Zeitkinetik PrP^{Sc}-Expression (Verdünnungen 1:2 und 1:20) im Zeitraum von 5 Wochen. Es zeigt sich eine Zunahme der PrP^{Sc}-Expression über den beobachteten Zeitraum. Äquivalente Proteinmengen wurden mit dem anti-NSE-Antikörper bestätigt.

Als nächstes sollte geklärt werden, ob die PrP^{Sc}-Menge bei unterschiedlichen Passagierungsraten unterschiedlich ist. Da sich separat inkubierte und entwickelte Westernblots hinsichtlich der geblotteten Proteinmenge nicht zweifelsfrei miteinander vergleichen lassen, konnten die oben stehenden Blots nicht verwendet werden. Daher wurden in einem weiteren Westernblot Proben der Verdünnungsstufen 1:2, 1:10 und 1:20 aus dem gleichen Passagierungsschritt (Woche 3) in einem Gel nebeneinander aufgetragen und ein Westernblot durchgeführt.

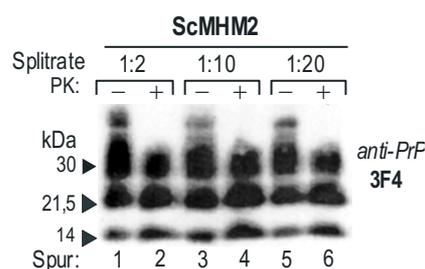


Abbildung 15: Vergleich der quantitativen PrP^C- und PrP^{Sc}-Expression bei unterschiedlicher Passagierungsraten: Aufgetragen sind die Zelllysate der 1:2, 1:10 und 1:20 passagierten ScMHM2-Zellen aus dem oben beschriebenen Zeitkinetik-Experiment (Woche 3, s.a. Abbildung 14). Die PrP^C- und PrP^{Sc}-Menge bleibt bei unterschiedlicher Passagierungsrate gleich.

Die Signalstärke sowohl der PrP^C-Banden als auch der PrP^{Sc}-Banden war – unabhängig von den Verdünnungsstufen – während des Untersuchungszeitraums annähernd gleich. Daraus folgt, dass die PrP^C-Expression durch die Verdünnung, die durch Passagierung erfolgt, nicht beeinflusst wird. Ebenso ist die

PrP^{Sc}-Menge in einer konfluenten ScMHM2-Schale unabhängig von der zuvor gewählten Verdünnung (Splitrate).

Durch die oben beschriebenen Versuche lässt sich zeigen, dass PrP^C- und PrP^{Sc}-Mengen der ScMHM2-Zellen von den beiden Passagierungsparametern Zeit und Verdünnung unabhängig sind.

4.1.3.2 DMSO / chemische Chaperone

Niedrigmolekulare Stoffe, die von Zellen als Antwort auf einen osmotischen Schock produziert werden, bezeichnet man als Osmolyte. Zu dieser Gruppe gehören verschiedene Polyalkohole, Polysaccharide und einige Aminosäuren mit ihren Derivaten. Sie verbessern die Fähigkeit der Zellen, auf verschiedenartige metabolische Schädigungen zu antworten und sich der veränderten Situation entsprechend anzupassen.

Das organische Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) besitzt (ebenso wie Glycerin) eine ähnliche Schutzwirkung wie die oben angeführten zellulären Osmolyte. Aus diesem Grund wird es auch als chemisches Chaperon bezeichnet. Tatzelt *et al.* konnten einen zeit- und dosisabhängigen Effekt von chemischen Chaperonen auf die Neusynthese von PrP^{Sc} nachweisen (Tatzelt *et al.*, 1996).

Im nachfolgend beschriebenen Experiment ging es weniger um die Anwendbarkeit chemischen Chaperone als Chemoprophylaxe oder Therapeutikum für Prion-Infektionen, sondern es wurde der Frage nachgegangen, ob das Tieffrieren prion-infizierter Zellstämme in Gegenwart „chaperon-ähnlicher“-Zusatzstoffe wie DMSO zum Verlust der Infektion führt. Da kultivierte PrP^{Sc}-positive Zellen zu späteren Verwendungszwecken häufig mit DMSO als Konservierungsstoff tiefgefroren werden, erschien es nahe liegend dessen Einfluss auf die PrP^{Sc}-Synthese zu verfolgen.

Ausgehend von einem stark PrP^{Sc}-exprimierenden ScMHM2-Klon wurden zwei 9 cm-Platten als Ausgangssystem benutzt. Nach Erreichen des Konfluenzstadiums wurde eine Platte nach den oben stehenden Methoden lysiert. Das gewonnene Lysat wurde in Anwesenheit von Sarkosyl ultrazentrifugiert und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die Zellen der zweiten Platte wurden trypsinisiert, mit einer Gefrierlösung aus 50% FCS, 40% DMEM und 10% DMSO aufgenommen und portioniert. Anschließend wurden sie vorsichtig abgekühlt und in flüssigem Stickstoff für 2-3 Tage tiefgefroren. Ein Kryoröhrchen wurde danach schonend aufgetaut und die Zellen wurden auf zwei 9 cm-Schalen herangezüchtet, bis diese erneut konfluent waren. Anschließend wurden die Zellen einer Platte lysiert und die der anderen Platte tiefgefroren. Insgesamt wurde der Vorgang des Tieffrierens und Auftauens viermal wiederholt (siehe Abbildung 16).

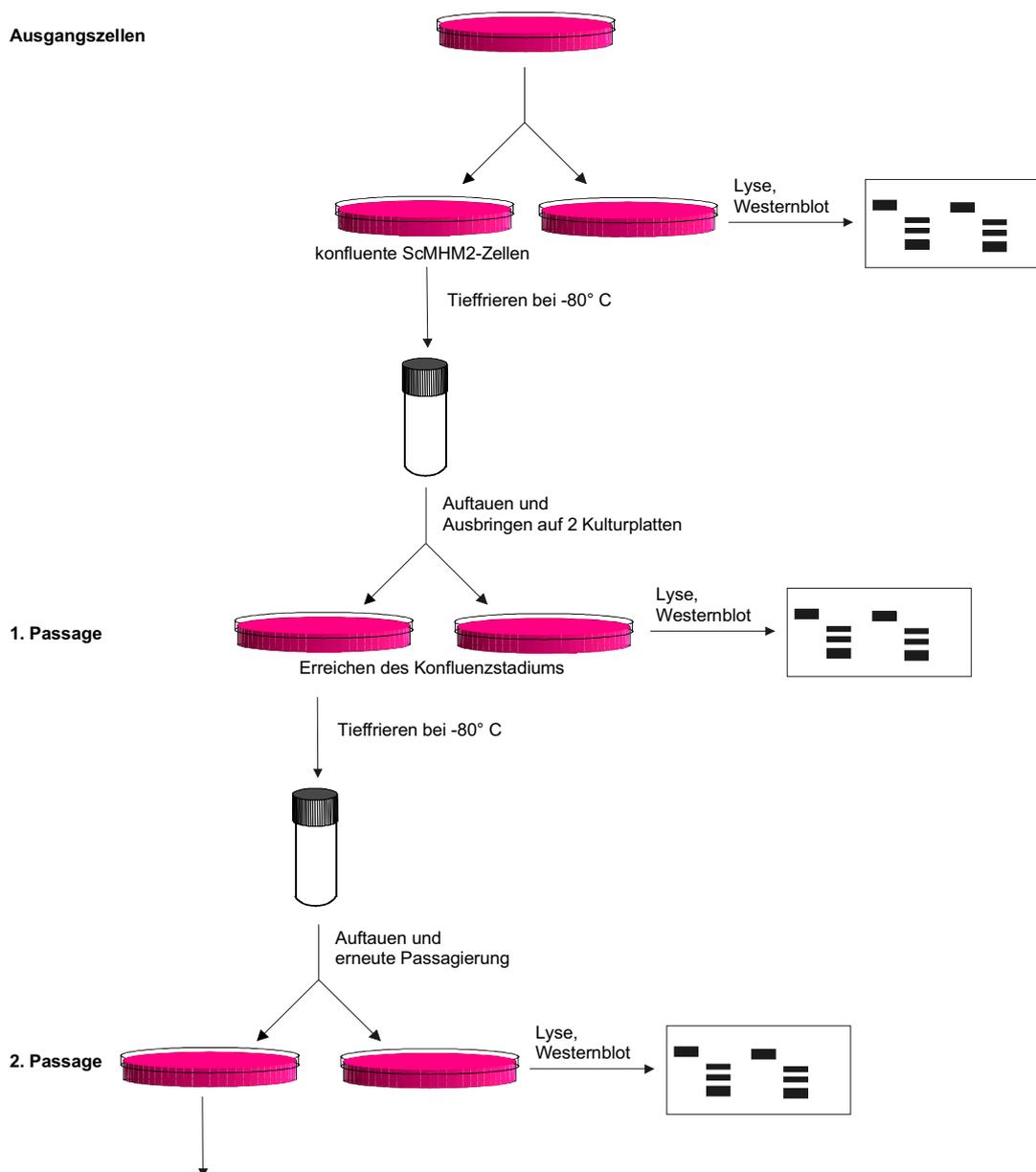


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Einfrier- und Auftauvorgänge: Konfluente Zellen werden in einer Verdünnung von 1:10 auf je zwei Kulturschalen gesplittet. Die Zellen einer Schale werden nach Erreichen des Konfluenzstadiums für den PrP^C- und PrP^{Sc}-Nachweis (SDS-PAGE, Westernblot) verwendet. Die Zellen der zweiten Schale werden mit DMSO-haltigem Kryomedium eingefroren, nach einigen Tagen aufgetaut und auf zwei Schalen weiterpassagiert.

Bereits nach dem ersten Tiefrier-Auftau-Vorgang war eine deutliche Verminderung der Menge an unlöslichem PrP festzustellen. Auch der Gehalt an PrP^C nahm leicht ab. Nach einer weiteren Woche ist der PrP^{Sc}-Titer kaum mehr nachweisbar. PrP^{Sc} bleibt nach weiteren Einfrier-Auftau-Zyklen konstant auf einem niedrigen Expressionsniveau nachweisbar.

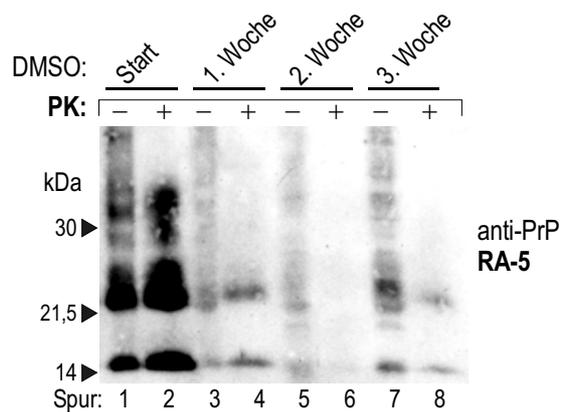


Abbildung 17: Einfluss von DMSO als chemisches Chaperon auf die PrP^{Sc}-Konzentration infizierter ScMHM2-Zellen. Die PrP^{Sc}-Menge nimmt durch Einfrier-Auftau-Vorgänge in DMSO-haltigem Medium deutlich ab. Im Gegensatz dazu bleibt die PrP^C- bzw. PrP^{Sc}-Menge bei Passagierung ohne Einfrieren gleich.

DMSO als notwendige Substanz zur Kryoasservierung von Zellen führt zu einer deutlichen Reduktion von PrP^{Sc} in der Zellkultur. Um Zellen mit einem hohem PrP^{Sc}-Titer nach der Asservierung in flüssigem Stickstoff zu erhalten, ist es notwendig, nach dem Auftauen von Zellen Subklone der Ausgangskultur anzulegen.

4.1.4 Zelluläre Proteine prion-infizierter Zellen im Vergleich mit uninfizierten Zellen

Zur näheren Charakterisierung des ScMHM2-Systems wurden einige Proteine untersucht, die laut damaliger Literatur mit der Prion-Infektion im Zusammenhang zu stehen scheinen. Sofern tatsächlich eine Korrelation zwischen PrP^{Sc} und der Expression anderer zellulärer Proteine besteht, sollten diese als Marker für die Charakterisierung der infizierten Zellen dienen und Hinweise auf die biochemische und biologische Aktivität der Zellen liefern.

4.1.4.1 bNOS-Expression in ScMHM2-Zellen

Im Zuge des Passagierungsexperiments von MHM2-Zellen, das die Stabilität der Infektion im Hinblick auf die Passagierung prüfen sollte (Kapitel 4.1.3.1, Abbildung 13), wurde auch die Expression der zerebralen NO-Synthase (bNOS) im zeitlichen Verlauf verfolgt. Auf diese Weise sollte die von Ovardia *et al. in vivo* als auch *in vitro* beobachtete Verschiebung des Molekulargewichts von bNOS in PrP^{Sc}-infizierten Neuronen mit dem Infektionsverlauf zeitlich korreliert werden (Ovardia *et al.*, 1996).

Mit dem RML-Stamm infizierte ScMHM2-Zellen wurden im wöchentlichen Abstand in einer Verdünnung von 1:10 herangezogen. Nach Erreichen des Konfluenzstadiums wurden die Zellen lysiert und Zellkerne und Membranen abzentrifugiert. Die Hälfte des postnukleären Protein-Extrakts wurde mit Proteinase K verdaut und gemeinsam mit der unverdauten Fraktion auf einem 9% SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Zum immunologischen Nachweis im Westernblot wurde ein kommerzieller anti-bNOS-Antikörper der Firma Transduction Laboratories verwendet. Zur Überprüfung äquivalenter Proteinmengen wurde die Membran nach dem „Strippen“ des bNOS-Antikörpers mit einem anti-NSE-Antikörper inkubiert.

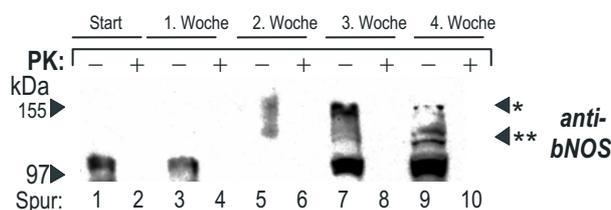


Abbildung 18: Zu Beginn und eine Woche nach dem Auftauen zeigen die ScMHM2-Zellen keine bNOS-spezifischen Banden. Ab der 3. Woche (Spur 7) kann ein deutliches Signal bei 155 kDa (Molekulargewicht von bNOS, Pfeil (*)) detektiert werden. Dieses Signal nimmt zur 4. Woche wieder ab. Auftreten Unterhalb der bNOS-Bande erscheint eine Doppelbande (Pfeil (**)). Die Intensität der einfachen Bande bei 155 kDa nimmt ab.

Aus Abbildung 18 geht hervor, dass sich ein bNOS-spezifisches Signal (155 kDa) erst ab der zweiten Woche der Zeitreihe detektieren lässt, dessen Intensität mit der Zeit zunimmt. Die ab der vierten Woche unterhalb

von 155 kDa zu erkennenden zwei Banden korrelieren mit den von Gabizon beschriebenen Doppelbanden. Parallel dazu nimmt die Intensität der Bande, welche die native bNOS (155 kDa) repräsentiert wieder ab.

ScMHM2-Klone, die eine starke PrP^{Sc}-Expression aufweisen, zeigen dass bei einem sehr hohen PrP^{Sc}-Titer unterhalb der bNOS- eine kräftigere Bande vorhanden ist, die der trunkierten Form der bNOS entspricht (Abbildung 19). Bei niedrigerer PrP^{Sc}-Menge lässt sich allerdings keine Korrelation mit der bNOS-Menge feststellen.

Das deutet darauf hin, dass die bNOS-Expression sowie postrtranslationale Modifikationen (wie z.B. N-/C-terminale Prozessierung) des Enzyms nur indirekt von der Prion-Infektion beeinflusst werden. Als Marker für den Infektionszustand der Zellen ist bNOS damit ungeeignet.

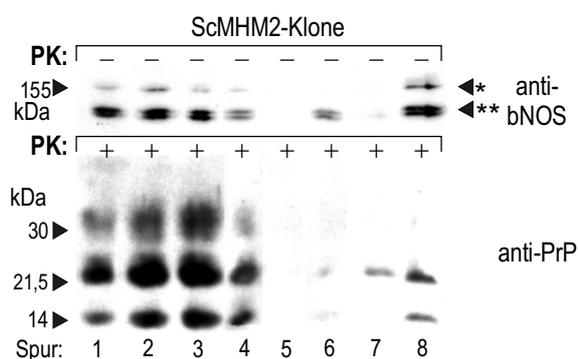


Abbildung 19: bNOS-Expression von ScMHM2-Klonen in Abhängigkeit vom Gehalt an PrP^{Sc}: bNOS-spezifische Bande (*) bei 155 kDa, darunter Doppelbande, die der trunkierten Form von bNOS entspricht (**). Starke PrP^{Sc}-Expression geht mit hohem Gehalt an bNOS sowie deren verkürzter Form (Spuren 1-4) einher. Bei schwach PrP^{Sc}-exprimierenden Klonen ist die bNOS-Expression unabhängig vom PrP^{Sc}-Titer (Spuren 6, 7, und 8).

4.1.4.2 Messung der Tyrosinphosphorylierung

Ein wichtiger Faktor zur Regulation von Enzymaktivitäten im Sinne der Signaltransduktion ist die Phosphorylierung von Proteinen an spezifischen Tyrosinresten, die auf die Aktivität ihrer zugehörigen Tyrosinkinase zurückgeht. In manchen Fällen liegt auch eine Autophosphorylierung zugrunde.

In einer 1997 publizierten Arbeit weisen Tan *et al.* am Modell der Alzheimerschen Erkrankung auf eine Beteiligung von Peptiden hin, die über die Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade Zelltod auslösen sollen (Tan *et al.*, 1997).

Aus diesem Grund wurde zunächst das Phosphorylierungsmuster Scrapie-infizierter Zellen im zeitlichen Verlauf untersucht. Zum Nachweis von Proteinen, die an Tyrosinresten phosphoryliert sind, eignen sich kommerzielle Phosphotyrosin-Antikörper, z.B. der Antikörper PY20 der Firma Transduction Laboratories. Er reagiert stark und spezifisch mit Phosphotyrosin-enthaltenden Proteinen und zeigt keine Reaktion mit Phosphoserin- und -threoninresten.

Die zuvor mit anti-bNOS inkubierten Nitrocellulosemembranen der bNOS-Zeitkinetik (siehe Kapitel 4.1.4.1, Abbildung 19) sowie des Klon-Screenings (Kapitel 4.1.3.1) wurden „gestrippt“ (siehe oben) und anschließend mit dem anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY20 reinkubiert (Abbildung 20).

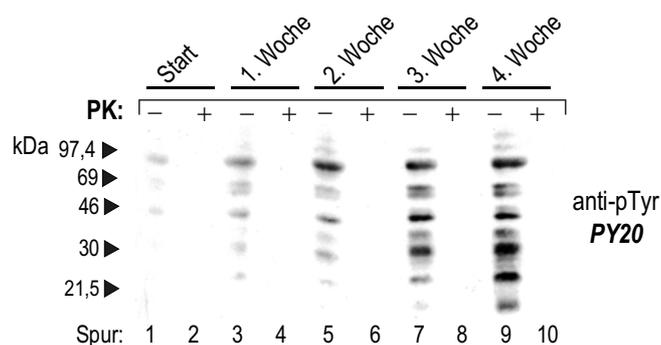


Abbildung 20: Zeitkinetik der Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten in Scrapie-infizierten Zellen. Zum Startzeitpunkt sind vor allem im hochmolekularen Bereich schwache Banden zu erkennen. Drei bis vier Wochen später (entspricht der 3. bzw. 4. Passagierung) zeigen sich auch im Bereich <46 kDa kräftigere Banden.

Zu Beginn des Experiments treten schwache Signale bei ca. 44, 69 und 90 kDa auf (Abbildung 20, Spur 1). Innerhalb von vier Wochen (entsprechend vier Passagen) erscheinen vor allem im Bereich <46 kDa weitere phosphorylierte Banden, und die Intensität der von Beginn an sichtbaren Banden (69 bzw. 90 kDa) nimmt zu.

Weiterhin wurde das Phosphorylierungsmuster solcher ScMHM2-Klone untersucht, die PrP^{Sc} auf stabilem Niveau in unterschiedlichen Konzentrationen exprimierten.

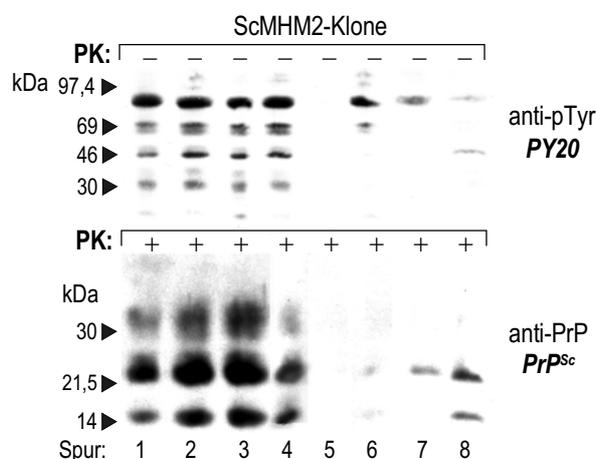


Abbildung 21: Phosphotyrosinproteine verschiedener ScMHM2-Klone in Abhängigkeit von der PrP^{Sc}-Expression. Klone mit starker PrP^{Sc}-Expression (Spuren 1-4) zeigen mehrere kräftige Phosphotyrosinbanden (ca. 32, 44, 69 und 90 kDa), wogegen schwache PrP^{Sc}-Klone (Spuren 5-8) nur im hochmolekularen Bereich Phosphotyrosin-positive Banden haben.

In Abhängigkeit vom PrP^{Sc}-Titer der Zellen nimmt die Phosphorylierungsintensität im Bereich <80 kDa mit der Menge an PrP^{Sc} zu (Abbildung 21).

Betrachtet man die Ergebnisse der oben gezeigten Versuche, so scheint die Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosinresten direkt mit dem Ausmaß der Scrapie-Infektion zusammenzuhängen. Offensichtlich korreliert die Stärke der Phosphotyrosinbanden direkt mit einer hohen PrP^{Sc}-Expression. Zum anderen führt die

Passagierung von infizierten Zellen, bei der die PrP^{Sc}-Expression unverändert bleibt (Kapitel 4.1.3.1), zusätzlich zu einer Phosphorylierung zellulärer Proteine.

4.1.4.3 Bestimmung der 14-3-3-Expression

14-3-3-Proteine können während oder kurz vor dem Auftreten der klinischen Symptomatik einer TSE-Infektion im Liquor nachgewiesen werden und sind daher als Marker früher Infektionsstadien nur bedingt geeignet (Hsich *et al.*, 1996, Zerr *et al.*, 1997, Weber *et al.*, 1997b). Eventuell lassen sich aber durch Apoptosevorgänge ausgelöste Zelluntergänge indirekt verfolgen. Ziel der Versuchreihe war es, den „14-3-3-Assay“ im Zellkulturmodell zu prüfen.

Vor diesem Hintergrund wurden analog zum oben stehenden Protokoll mit dem RML-Stamm infizierte MHM2-Zellen im wöchentlichen Abstand in einer Verdünnung von 1:10 gesplittet und auf weiterpassiert. Nach Erreichen des Konfluenzstadiums wurden die Zellen lysiert, und ein Teil des postnukleären Überstands 30 Minuten lang einem Proteinase K-Verdau (10 µg/ml) unterworfen. Die PK-verdauten Proben wurden gemeinsam mit dem unverdauten Teil im Westernblot untersucht. Zum Nachweis des 14-3-3 Proteins wurde der anti-14-3-3-Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology verwendet.

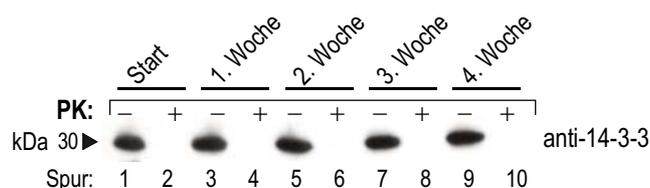


Abbildung 22: Kinetik der 14-3-3 Expression in ScMHM2-Zellen. Die 14-3-3-Expression bleibt im Lauf mehrerer Passagen konstant (Spuren 1, 3, 5, 7 und 9).

Die 14-3-3-Expression der Scrapie-positiven Zellen blieb über den ganzen untersuchten Zeitraum unverändert (Abbildung 22).

In einem parallelem Ansatz wurde die 14-3-3-Expression verschiedener Scrapie-infizierter MHM2-Zellen in Abhängigkeit der PrP^{Sc}-Expression verglichen. Dazu wurden ScMHM2-Einzelzellklone herangezogen und Klone mit unterschiedlich starker PrP^{Sc}-Expression im Westernblot auf ihren Gehalt an 14-3-3 untersucht. Auch hier war die 14-3-3-Expression nicht mit der PrP^{Sc}-Menge der Zellen korreliert (Abbildung nicht gezeigt).

Die oben gezeigten Versuche legen den Schluss nahe, dass 14-3-3 unabhängig von der PrP^{Sc}-Menge in ScMHM2-Zellen immer gleich stark exprimiert wird. Damit kann 14-3-3 als Ladungskontrolle ähnlich wie die neuronenspezifische Enolase (NSE, siehe Kapitel 4.1.4.4) verwendet werden.

4.1.4.4 Bestimmung der NSE- Expression

Ein zelluläres Protein, das nicht der Charakterisierung der verwendeten Zelltypen, bzw. ihres Infektionsstatus dient, sondern als Mengenstandard für die Quantifizierung von Westernblots eingesetzt wurde, ist die

neuronenspezifische Enolase (*neuron specific enolase*; NSE). Sie ist ubiquitär in allen Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystem, sowie in Merkelzellen, neuroendokrinen Zellen (wie z.B. C-Zellen der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse, der adrenalen Medulla, etc.) und Melanozyten lokalisiert. Besonders hoch ist die NSE-Konzentration in Neuroblastomzellen, wie den N2a- bzw. ScMHM2-Zellen (Schmechel *et al.*, 1978, Wang *et al.*, 1990).

Nach erfolgreicher Detektion des zu untersuchenden Proteins (z.B. PrP, NOS etc.) wurde die Membran gestrippt und nach dem Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen mit einem polyklonalen Antikörper (Chemicon) gegen Neuronenspezifische Enolase untersucht werden. Verwendet wurde ein Antikörper, der das γ - γ -Isoenzym mit einer Größe von 46 kDa zuverlässig erkennt. Da NSE weder unlöslich, noch Proteinase K-resistent ist, konnten für den Nachweis keine Proben, die mit Ultrazentrifugation bzw. PK-Verdau behandelt wurden, verwendet werden.

Die Intensität der NSE-Banden wurde mit Hilfe des Programms *ImageQuant* (Amersham Biosciences) quantifiziert. Auf diese Weise ergab sich die Möglichkeit, über den Vergleich der NSE-Menge pro Bande im Westernblot einen Rückschluss auf die aufgetragene Proteinmenge zu bekommen und bei einer Wiederholung des Blots die Proben auf eine gleiche Proteinbeladung zu titrieren.

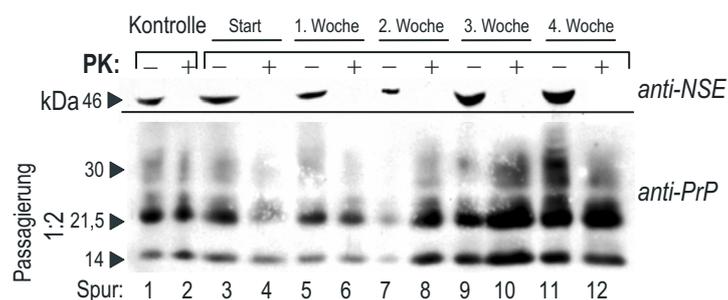


Abbildung 23 (entspricht Abbildung 14 oben): Verwendung von NSE als Proteinmengenstandard. Die Intensität der NSE-spezifischen Banden in den unverdauten Proben ist annähernd gleich, so dass von äquivalenten Proteinmengen pro Spur ausgegangen werden kann. Darunter der gleiche Westernblot nach Strippen und Reinkubation mit anti-PrP-Antikörper (3F4).

In der oben stehenden Abbildung (Abbildung 23) wird exemplarisch die Verwendung von NSE als Ladungskontrolle gezeigt. ScMHM2-Zellen wurden über vier Wochen passagiert und nach jedem Splitvorgang, wurden die Zellen einer von zwei parallel angelegten Schale lysiert und im Westernblot analysiert (Kapitel 4.1.3.1). Nach dem Nachweis der NSE-Expression wurde dieselbe Membran für die Quantifizierung der PrP^{Sc}-Menge verwendet. Die PrP^{Sc}-Expression nimmt im Zeitverlauf leicht zu.

Der konstanten NSE-Expression (Bande bei 46 kDa) ist zu entnehmen, dass die aufgetragene Proteinmengen pro Spur annähernd gleich sind. Die PrP^{Sc}-Expression nimmt dagegen im zeitlichen Verlauf leicht zu.

4.2 Infektion von kultivierten murinen Zellen mit Prionen

4.2.1 Reinfektion

4.2.1.1 Reinfektion vorher persistierend prion-infizierter Zellen mit Zelllysaten

In den oben beschriebenen Zellkulturexperimenten wurden unter anderem Zellklone entdeckt, die die Scrapie-Infektion offenbar verloren haben, bzw. nie mit PrP^{Sc} infiziert gewesen waren.

Ziel war es, diese Zellen erneut mit PrP^{Sc} zu infizieren und die Stabilität der Reinfektion im Verlauf der Passagierung zu verfolgen. Neben der Bestimmung des Prozentsatzes der Zellen, die reinfiziert werden können, sollte untersucht werden, ob die Zellen die Infektion erneut eliminieren würden.

Um diese Fragen zu beantworten, wurden PrP^{Sc} negativ getestete MHM2-Zellen herangezogen (siehe Kapitel 4.1.1) und kurz vor Erreichen des Konfluenzstadiums mit 1%, 5%, 10%, 20% und 50% (v/v) Lysat aus ScMHM2-Zellen inokuliert. Nach 2,5 Stunden wurde das Inokulum entfernt und durch normales Medium (*Dulbecco's modified Eagle's Medium* mit Zusätzen von FCS, Glutamin und Antibiotika) ersetzt. Wenige Stunden bis einige Tage nach Infektion war eine starke Vakuolisierung der Zellen festzustellen. Die Zellen wurden über zwei Wochen weitergezüchtet und jeweils nach Erreichen des Konfluenzstadiums passagiert. Danach wurden sie lysiert und das gewonnene Pellet mit dem Zellmaterial in Sarkosyl-haltigem Puffer resuspendiert. Es folgte eine Separierung der unlöslichen Zellfraktion in der Ultrazentrifuge bei 100.000 g für eine Stunde. Das nach dem Ultrazentrifugationsvorgang gewonnene Pellet entspricht weitgehend dem nach PK-Verdau gewonnenen Pellet. Obwohl das nach dem Aufreinigungsverfahren mittels PK-Verdau erhaltene PrP der Definition von PrP^{Sc} genauer entspricht (Unlöslichkeit und PK-Resistenz), aber zeit- und aufwendiger ist, wurde die PrP-Aufreinigung meist nur mittels Ultrazentrifugation in Gegenwart von Sarkosyl durchgeführt (Kriterium der Unlöslichkeit).

Das detergentienunlösliche Pellet wurde der Westernblot-Analyse unterzogen, der Überstand wurde für nachfolgende Experimente (Löslichkeit von Zwischenformen des PrP^C/PrP^{Sc}) bei -20°C tiefgefroren.

Abbildung 24 zeigt reinfizierte MHM2-Zellen zehn Tage nach der Inokulation mit PrP^{Sc}-Zelllysate. Das charakteristische Dreibandmuster, welches die Glykosylierungszustände des Prionproteins widerspiegelt, ist in den reinfizierten Zellen deutlich zu sehen und entspricht dem der Kontrolle in Spur 2. Die Inokulumkonzentration ist mit der Intensität der PrP^{Sc}-Banden korreliert. Es sind bereits Konzentrationen von 1% für eine Reinfektion ausreichend (Abbildung 24, Spur 5). Die kräftigsten Banden sind bei 20% und 50% Inokulum zu finden.

Nicht infizierte Kontrollzellen wiesen kein PrP-spezifisches Glykosylierungsmuster auf, besitzen offensichtlich kein detergentienunlösliches PrP. Eine spontane Reinfektion der Zellen scheint daher unwahrscheinlich.

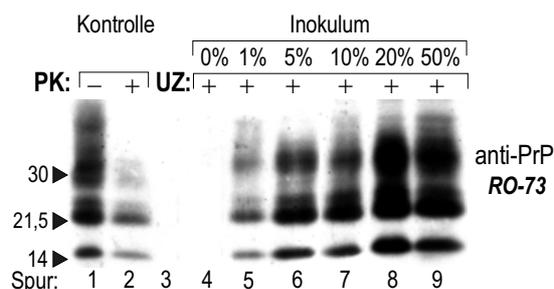


Abbildung 24: Reinfektion vormals Scrapie-positiver MHM2-Zellen, die die Infektion verloren hatten. 10 Tage nach Inokulation mit PrP^{Sc}-Zellhomogenat. Spuren 1 und 2: ScMHM2-Kontrolle mit und ohne PK-Verdau. Spur 3: leer, Spur 4: *Mock*-infizierte Kontrolle. Spuren 5-9: MHM2-Zellen, die mit 1-50% ScMHM2-Zellysat inokuliert wurden. PK = Proteinase K-Verdau, UZ = Ultrazentrifugation.

Ziel des beschriebenen Experiments war es, die frühe Phase einer Infektion auf eine möglichst einfache Weise zu erfassen. Zum einen galt es, den Zeitpunkt der selbsterhaltenden PrP^{Sc}-Synthese zu ermitteln. Zum anderen sollten die kritischen Zeitpunkte zur Probengewinnung und -fixierung im Hinblick auf die elektronenmikroskopische Verfolgung der PrP^{Sc}-Aufnahme in die Zellen festgelegt werden. Der Infektionsverlauf konnte durch ein Zeitkinetik-Experiment mit Hilfe der Westernblot-Analyse verfolgt werden. Das Verfahren erwies sich bereits in den Vorexperimenten als sensitiv genug, um bereits geringe PrP^{Sc}-Konzentrationen nachzuweisen.

4.2.1.2 Nachweis von *de novo* synthetisiertem PrP^{Sc}

MHM2-Zellen wurden nach Erreichen des Konfluenzstadiums wie oben beschrieben mit 1%, 10%, 20% bzw. 50% ScMHM2-Lysat inokuliert. Die Zellen wurden nach Infektion über vier Passagen kultiviert und bei jeder Passagierung ein Aliquot lysiert. Die gewonnenen Pellets wurden durch Ultrazentrifugation in lösliche und unlösliche Proteinfraction getrennt und durch Westernblot-Analyse auf PrP^{Sc}-Produktion untersucht.

Wie auf Abbildung 25 erkennbar, ist bei den Zellen, die mit 1% PrP^{Sc}-Zellysat infiziert wurden, bereits nach der ersten Passagierung kein PrP^{Sc}-spezifisches Bandenmuster nachweisbar. Das Inokulum ist nach der ersten Passage herausverdünnt, eine *de novo*-Synthese von PrP^{Sc} nicht sichtbar (Abbildung 25, Spur 1). Bei einer Inokulumkonzentration von 50% sind hingegen PrP^{Sc}-spezifische Banden nachweisbar (Spur 5). Nach zwei Wochen zeigten sich bei beiden Zell-Präparationen deutliche Signale, die auf eine Akkumulation von unlöslichem PrP hinweisen und sich nach einer weiteren 1:10-Passagierung verstärken.

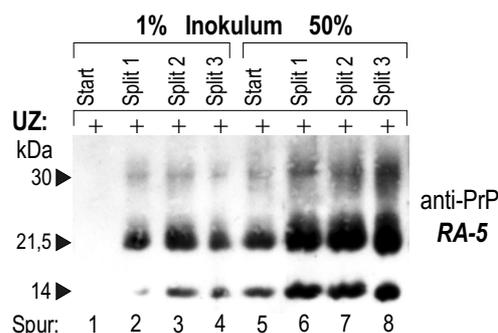


Abbildung 25: Zunahme der PrP^{Sc}-Expression in reinfizierten MHM2-Zellen im Verlauf von 4 Passagen. Spuren 1-4: Zellen nach Inokulation mit 1% Zelllysate. Spuren 5-8: Zellen nach Inokulation mit 50% Zelllysate. Start: 1:4-Passage ca. 3-4 Tage nach Infektion, Split 1: erneute 1:4-Passage (10 Tage später), Split 2 und 3: jeweils 1:10-Verdünnung bei Passage. Insgesamt entspricht die durch Passagen erzielte Verdünnung 1:1600. UZ = Ultrazentrifugation.

Nach einer Verdünnung von mehr als 3,2 log-Stufen (1:1600) ist das Inokulum aus den Zellen der Ausgangspopulation verschwunden. Das nach vier Passagierungen nachgewiesene PrP^{Sc} (Spuren 4 und 8) kann somit auf eine *de novo*-Synthese von PrP^{Sc} zurückgeführt werden. Daraus folgt, dass die Zellen erfolgreich mit PrP^{Sc}-haltigem Zelllysate aus ScMHM2-Zellen reinfiziert werden konnten.

4.2.1.3 Bestimmung der Effektivität des Infektionsverfahrens und der Reinfektionsrate

Analog zur Bestimmung der Infektionsrate der ScMHM2-Ausgangszellen (Kapitel 4.1.1), wurde eine klonale Selektionierung von MHM2-Zellen, die ihre Infektion verloren hatten, 2½ h nach Inokulation mit 20% Zelllysate von ScMHM2-Zellen durchgeführt. Mittels Endpunkt titration wurden aus den reinfizierten Zellen insgesamt 45 Klone herangezogen.

27 Klone wurden im Westernblot auf Anwesenheit von PrP^{Sc} getestet. Darunter fanden sich 20 Klone ohne PrP^{Sc}-spezifisches Bandenmuster. Zwei Klone zeigten ein schwaches und fünf Klone ein deutliches PrP^{Sc}-Signal. Dies entspricht einer Reinfektionsrate von 26%.

Die Methode der Einzelzellklonierung garantiert das Herausverdünnen des Inokulums nach der Infektion, so dass der Nachweis von PrP^{Sc} auf eine *de novo*-Synthese zurückgeführt werden kann. Auf diese Weise ließen sich Klone selektionieren, die auf interessante PrP^{Sc}-Eigenschaften, wie u.a. Expressionsstärke und PK-Resistenz von PrP^{Sc}, Stabilität der Infektion und eventuelle morphologische Phänotypen untersucht werden konnten.

4.2.1.4 PK-Resistenz des PrP^{Sc} reinfizierter Zellen

Wie unter Kapitel 4.2.1.1 beschrieben, erfolgte zum einfacheren Screening der infizierten Zellen die Aufreinigung von PrP^{Sc} durch Ultrazentrifugation in Gegenwart von Detergentien. Das so gewonnene PrP^{Sc} sollte sowohl die Bedingung der Detergens-Unlöslichkeit, als auch der Proteaseresistenz erfüllen. Dazu wurden durch die vorherigen Infektionsexperimente zwei stark PrP^{Sc}-exprimierende Klone und ein schwacher Klon selektiert. Die Klone wurden über drei Wochen im Verhältnis 1:10 passagiert. Bei jeder

Passagierung wurde ein Aliquot lysiert und sohl PK verdaut, als auch in Anwesenheit von Detergens ultrazentrifugiert. Die erhaltenen Proteinfraktionen wurden mittels Westernblot analysiert (Abbildung 26).

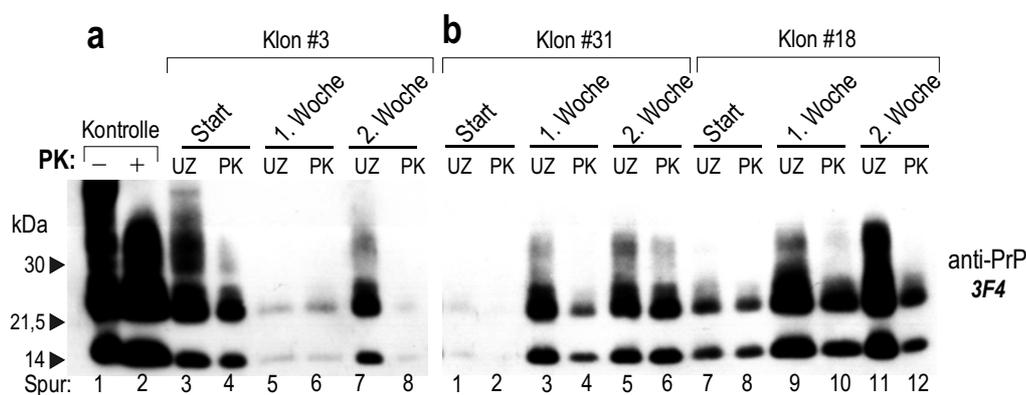


Abbildung 26a, b: Zeitverlauf der PrP^{Sc}-Expression von drei ScMHM2-Klonen, die nach Verlust der Infektion reinfiziert wurden: Klon #3 mit anfänglich hohem Gehalt an detergentienunlöslichem, proteaseresistentem PrP (Spuren 3-8). Dann nahezu vollständiger Verlust der Proteaseresistenz über die nächsten zwei Passagen (Spuren 6, 8). Klon #31, der anfangs kaum unlösliches PrP besitzt, exprimiert im Zeitverlauf unlösliches, PK-resistentes PrP (Abbildung 26b, Spuren 1-6). Die PrP^{Sc}-Expression von Klon #18, zum Startzeitpunkt kräftig (Abbildung 26b, Spuren 7, 8) nimmt im Verlauf von zwei Passagen noch weiter zu (Spuren 9-12). UZ = Ultrazentrifugation, PK = Proteinase K-Verdau.

Abbildung 26 zeigt exemplarisch einige der im Hinblick auf die PrP^{Sc}-Expression beobachteten Varianten nach Reinfektion: Bei Klon 18 sind sowohl die Kriterien der Unlöslichkeit in Detergentien als auch der PK-Resistenz der nicht- und monoglykosylierten PrP-Formen über drei Passagen erfüllt (Abbildung 26b, Spuren 7-12). In diesem Klon schien die PrP^{Sc}-Menge im Lauf von drei Wochen sogar zuzunehmen.

Nicht in allen Fällen waren jedoch beide Kriterien gleichzeitig erfüllt. Im Fall eines Klons (3, Abbildung 26a, Spuren 3, 4) waren Unlöslichkeit und Proteaseresistenz zu Beginn der Zeitreihe deutlich ausgeprägt. Nach einer Passage waren Unlöslichkeit und PK-Resistenz deutlich verringert (Spuren 5, 6). Das nach der 2. Passage deutlich vorhandene PrP^{Sc}-spezifische Glykosylierungsmuster verschwindet nach PK-Behandlung fast vollständig (Spuren 7, 8). Somit kam es zwar zu einer Akkumulation von detergentunlöslichem, nicht aber proteaseresistentem Material.

Ebenfalls ungewöhnlich verhielt sich Klon 31 (Abbildung 26b), der ursprünglich als schwach PrP^{Sc}-exprimierender Klon eingestuft wurde. Nach Ultrazentrifugation sind die Banden der nicht- und monoglykosylierten Formen zum Startzeitpunkt nur schwach, das diglykosylierte PrP überhaupt nicht sichtbar (Abbildung 26b, Spur 1). Alle drei Glykoformen erwiesen sich als proteasesensitiv (Abbildung 26b, Spur 2). Im Verlauf von zwei Passagen (jeweils 1:10 gesplittet) werden die PrP^{Sc}-spezifischen Banden immer kräftiger und gehen mit einer deutliche Proteaseresistenz einher (Spuren 3 bis 6).

Bei einer geringen Inokulumkonzentration kann die Detergens-Unlöslichkeit von PrP^{Sc} auch nur eine temporäre Eigenschaft (Abbildung 27, Spuren 6, 7) sein. MHM2-Zellen wurden mit einem 1 bzw. 10%igem Lysat aus ScMHM2-Zellen (entsprechend den unter 4.2.1.1 beschriebenen Bedingungen) reinfiziert und über mehrere Wochen passagiert. Jeweils zu Beginn und am Ende des Versuchs wurde eine Kulturschale mit den Mock-, 1%- und 10%- inokulierten Zellen lysiert, das unlösliche Protein mittels Ultrazentrifugation in

Sarkosyl sedimentiert nach Gelelektrophorese im Westernblot detektiert. Im Gegensatz zu Zellen, die mit 10% Lysat infiziert worden waren (Abbildung 27, Spur 10) konnte bei den mit 1% ScMHM2-Lysat inokulierten Zellen bereits nach sechs Wochen kein detergentienunlösliches PrP mehr nachgewiesen werden.

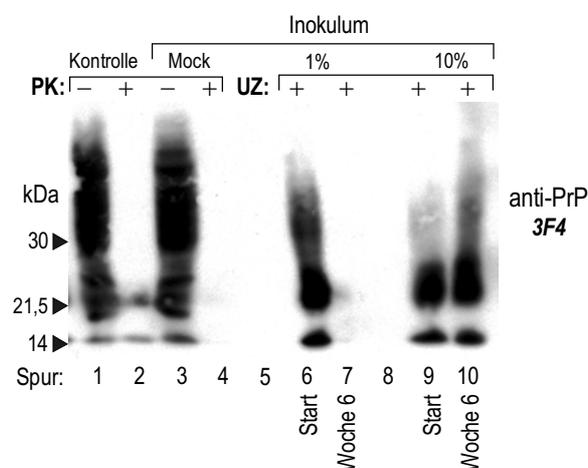


Abbildung 27: Gehalt an detergentienunlöslichem PrP in Abhängigkeit von der Inokulumkonzentration. MHM2-Zellen wurden mit 1 bzw. 10% ScMHM2-Lysat inokuliert und der Gehalt an PrP^{Sc} 1 Woche (Start) und 6 Wochen nach Inokulation untersucht. Spuren 1 und 2: PrP^{Sc}-Kontrolle von ScMHM2-Zellen. Spuren 3 und 4: Mock-infizierte Zellen eine Woche nach Inokulation zeigen kein proteaseresistentes PrP. Spuren 6 und 7: Mit 1% Lysat (ScMHM2) inokulierte Zellen. Spuren 9, 10 mit 10% Lysat infizierte Zellen produzieren auch nach sechs Wochen PrP^{Sc}. Spuren 5 und 8: leer. PK = Proteinase K-Verdau. UZ = Ultrazentrifugation.

Abhängig von der Inokulumkonzentration kommt es also zu einer stabilen Prion-Infektion der MHM2-Zellen. 1% Inokulum führt nur zu einer temporären Infektion. Mit 10% Inokulum ist die Infektion über mehrere Passagen stabil.

4.2.2 *De novo*-Infektion

Ein wesentliches Ziel der Infektionsexperimente war die Neuinfektion muriner Nervenzellen. Die neuronalen Zellen sollten mit verschiedenen PrP^{Sc}-Stämmen infiziert und anschließend wesentliche Parameter wie u.a. Infektionseffizienz, Verlauf der PrP^{Sc}-Expression, Entwicklung von Unlöslichkeit und PK-Resistenz untersucht werden. In diesem Zusammenhang erwies sich die Verwendung der das MHM2-Epitop tragenden Zellen als „*bos*“ als großer Vorteil, da durch einen MHM2-spezifischen Antikörper nur das zelleigene Prionprotein sichtbar gemacht wird. Vorhandenes Inokulum wird vom MHM2-spezifischen Anti-PrP-Antikörper (3F4) nicht erkannt und führt so nicht zu falsch positiven Resultaten. Während der Exposition der Zellen mit prionhaltigem Material wurden in definierten Zeitabständen Proben für elektronenmikroskopische Untersuchungen genommen.

Inokulation und Aufzucht der Zellen sowie die Präparation für die Elektronenmikroskopie wurden in unserem Labor durchgeführt. Die Immunogold-Antikörpermarkierung, die weitere Probenaufbereitung sowie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Lajos Laszlo, Eötvös Universität, Budapest vorgenommen.

4.2.2.1 Infektion mit verschiedenen Prionenstämmen

MHM2- und GT1-Zellen wurden analog zu den Reinfektionsexperimenten mit 40% ScMHM2-Zelllysate (RML-„*strain*“) inokuliert. Neben dem Zelllysate wurde auch 1%iges Hirnhomogenat terminal an TSE erkrankter Mäuse (entspricht ca. 10^5 ID₅₀; Eklund *et al.*, 1967), die mit dem mausadaptierten BSE bzw. Scrapie-79A infiziert waren, als Inokulum verwendet. Es wurden Versuchsreihen mit verschiedenen Inokulumkonzentrationen und Inokulationszeiten durchgeführt, um die Parameter für eine Infektion zu ermitteln. In der untenstehenden Tabelle (Tabelle 35) sind die optimalen Konzentrationen und Inokulationsdauer für die jeweils verwendeten Zellen zusammengefasst.

Inokulum		verwendete Zellen	
Stamm	Ursprung	GT1	MHM2
Scrapie-RML	Zelllysate	40%	40%
Scrapie-79A	Hirnhomogenat	1%	1%
Mouse-BSE	Hirnhomogenat	1%	1%
	Inokulationszeit	1h	2h

Tabelle 35: Optimale Inokulumkonzentrationen und Infektionsdauer bei Neuinfektionen in Abhängigkeit vom Zelltyp. Die Inokulationszeit bei GT1-Zellen musste verkürzt werden, da diese Zellen äußerst empfindlich auf das Hirnhomogenat bzw. Zelllysate reagieren.

4.2.2.2 Infektion von MHM2-Zellen

Abbildung 28 zeigt MHM2-Zellen, die mit den „strains“ RML (Spur 4), 79A (Spur 5) und mausadaptiertem BSE (Spur 6) infiziert wurden. Elf Tage nach Inokulation wurden die Zellen lysiert und die Proben in Anwesenheit von Detergentien ultrazentrifugiert. Im Westernblot ist bei jedem „strain“ ein deutliches PrP-spezifisches Signal zu nachweisbar.

Auffällig sind jedoch das Glykosylierungsmuster und das Molekulargewicht des detergentienunlöslichen Prionproteins, das nicht mit den erwarteten Größen von 17-19 kDa, 25 kDa und 27-30 kDa der Kontrolle (Abbildung 28, Spur 1, 2) übereinstimmt. Die prominenteste Bande entspricht dem Molekulargewicht des unverdauten Prionproteins der ScMHM2-Kontrolle. Möglicherweise handelt es sich dabei um PrP-Moleküle mit intermediären Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc}: Einerseits besitzt das entstandene PrP die volle Länge (wie PrP^C), andererseits ist es in Sarkosyl unlöslich wie PrP^{Sc}.

Allerdings besitzt das neu entstandene detergentienunlösliche PrP im Gegensatz zu „echtem“ PrP^{Sc} keine PK-Resistenz, sondern erwirbt diese Eigenschaft erst im Verlauf weiterer Passagen (siehe Kapitel 4.2.3).

Zellen, die mit den Scrapie-Stämmen RML und 79A infiziert wurden, weisen fast gleiche Glykosylierungsmuster auf. Dagegen ist die Bande des unglykosylierten PrP (24-25 kDa) in BSE-infizierten Zellen deutlich kräftiger als bei den beiden anderen Scrapie-Stämmen.

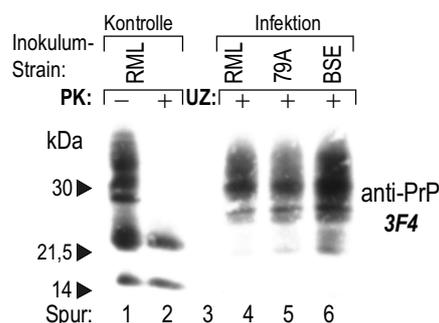


Abbildung 28: Inokulation von MHM2-Zellen mit den Prionen-„strains“ Scrapie-RML, Scrapie-79A und murines BSE: Spuren 1 und 2: ScMHM2-Kontrolle vor und nach PK-Verdau. Spur 3: leer. Spuren 4-6: Mit verschiedenen *strains* inokulierte MHM2-Zellen zeigen 11 Tage nach Inokulation detergentienunlösliches Vollängen- PrP. PK = Proteinase K-Verdau. UZ = Ultrazentrifugation in Gegenwart von Sarkosyl.

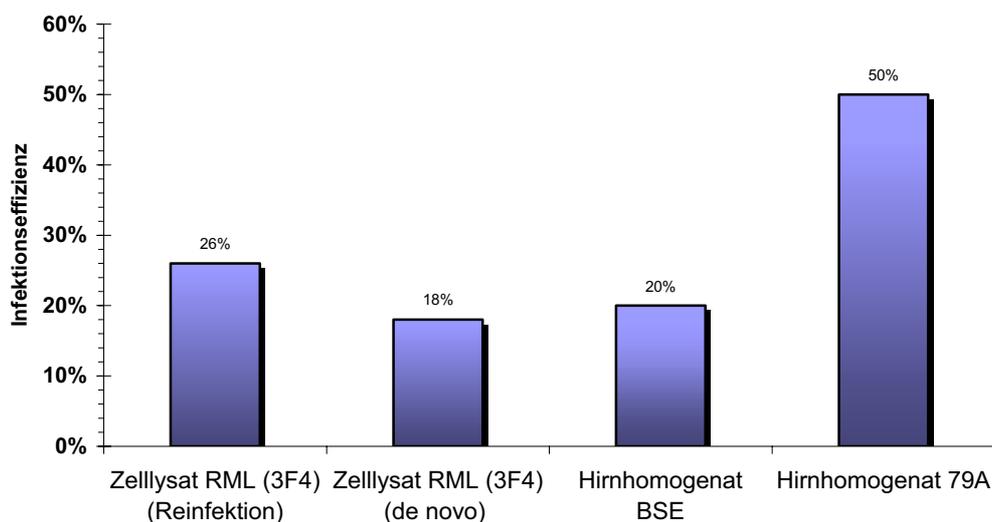
Auch nach einer weiteren Passage (9 Tage später) bleiben Molekulargewicht, Glykosylierungsmuster und -intensität der drei „strains“ in MHM2-Zellen im Vergleich zum vorhergehenden Westernblot unverändert (nicht gezeigt).

4.2.2.3 Effizienz der Infektion mit Gehirnhomogenaten

Durch die unter Kapitel 3.2.3 beschriebene Einzelzellklonierung direkt im Anschluss an die Inokulation mit PrP^{Sc}-haltigem Material und Screening der Klone auf PrP^{Sc}-Expression lassen sich Rückschlüsse auf die Effektivität der Infektion ziehen. Die Zellen wurden nach ihrer Lyse mittels Ultrazentrifugation in Gegenwart von Sarkosyl auf detergentienunlösliches PrP getestet.

Mit dem mausadaptierten BSE-Stamm konnten dabei zwei von zehn Klonen infiziert werden. Drei von sechs Klonen, die mit dem 79A-Hirnhomogenat inokuliert wurden, waren im Westernblot positiv. Die Infektion mit dem RML-Zellysate war ähnlich effektiv wie mit dem BSE-Stamm (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 36: Effektivität der Infektion von MHM2-Zellen in Abhängigkeit vom Prionstamm. Hinter den Prozentangaben in der Tabelle ist die Zahl der infizierten Klone gegenüber den getesteten Klone angegeben.



<i>Inokulum</i>	<i>Infektionsrate von MHM2-Zellen</i>	<i>Infektionsmodus</i>
Zelllysate RML (3F4)	26% (7/27)	Reinfektion
Zelllysate RML (3F4)	18%	de novo-Infektion
Gehirnhomogenat BSE	20% (2/10)	de novo-Infektion
Gehirnhomogenat 79A	50% (3/6)	de novo-Infektion

4.2.2.4 Infektion von GT1-Zellen

Die GT1-Zellen konnten weder mit Zelllysate RML-infizierter ScMHM2-Zellen, noch mit Hirnhomogenaten der Stämme 79A und BSE infiziert werden. 31 Tage nach Inokulation wurden die im Vergleich zu den infizierten MHM2-Zellen langsam wachsenden GT1-Zellen nach der zweiten Passage auf ihren PrP^{Sc}-Gehalt getestet. In dem durch Ultrazentrifugation in Gegenwart von Sarkosyl erhaltenen Pellet ist keine PrP-spezifische Bande nachweisbar, damit also kein unlösliches PrP vorhanden (Abbildung 29, Spuren 4, 6 und 8).

Zum Nachweis der PrP^C-Expression, wurde auch der Überstand der Sarkosyl-behandelten Proben nach der Ultrazentrifugation geblottet (Abbildung 29, Spuren 5, 7 und 9). Der Nachweis PrP-spezifischer Banden mit einer Größe von 32 bis 35 kDa (entsprechend diglykosyliertem PrP^C) weist darauf hin, dass die Zellen trotz unverminderter PrP^C-Produktion nicht infiziert werden konnten.

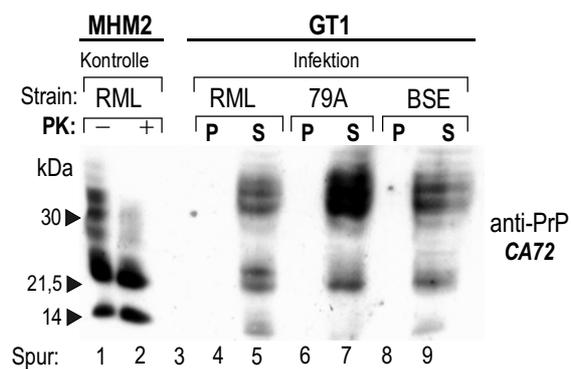


Abbildung 29: Inokulation von GT1-Zellen mit verschiedenen Prion-„strains“. Mit verschiedenen Prionstämmen inokulierte GT1-Zellen haben kein unlösliches PrP (Spuren 4, 6, und 8), jedoch eine normale PrP^C-Expression (Spuren 5, 7 und 9). Spuren 1 und 2: Kontrolle ScN2a-Zellen vor (-) und nach (+) Proteinase K-Verdau. Spur 3: Leer. S = Überstand, P = Pellet

4.2.3 Erwerb von Detergens-Unlöslichkeit und PK-Resistenz von PrP^{Sc} im Zeitverlauf

Ein Teil der unter Kapitel 4.2.2.2 und 4.2.2.3 beschriebenen ScMHM2-Zellen wurde nach der Infektion mit RML, 79A- bzw. mausadaptierten BSE tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen insgesamt sechs Wochen (entsprechend 6 Passagen in einer Verdünnung von 1:10) weiterpassagiert. Eine Hälfte der Zellen einer konfluenten 9-cm-Schale wurde nach der Lyse in 10% Sarkosyl ultrazentrifugiert, die andere Hälfte einem 30-minütigem Verdau mit 20 µg/ml Proteinase K unterworfen. Die Proben wurden danach elektrophoretisch getrennt und durch Westernblot analysiert (Abbildung 30).

Unabhängig vom verwendeten Inokulum wird sowohl das durch Ultrazentrifugation separierte detergentienunlösliche PrP als auch das PK-resistente PrP markiert. Dabei weisen die mit Hirnhomogenat infizierten Zellen (Abbildung 30, Spuren 3-6) einen deutlich höheren Gehalt an unlöslichem Prionprotein auf, als solche, bei denen Hirnhomogenat verwendet wurde (Abbildung 30, Spuren 1 und 2).

Im erstgenannten Fall fällt vor allem die Verschiebung des Bandenmusters der PK-verdauten Proben im Vergleich zu den mit Detergentien behandelten Proben in Richtung „klassisches“ PrP^{Sc}-Muster auf (schematisch neben dem Westernblot dargestellt). Die unglykosylierte Bande ist in den PK-verdauten Proben stärker betont. Im Vergleich zwischen Scrapie-79A und BSE-„strain“ lassen sich auch hier Unterschiede im Bandenmuster erkennen. Während bei 79A das monoglykosylierte PrP betont ist, ist beim BSE-Stamm die diglykosylierte Form kräftiger.

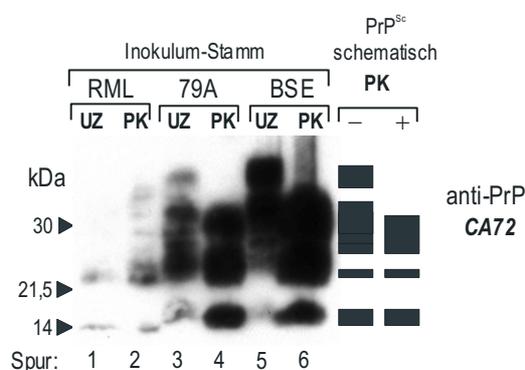


Abbildung 30: Prion-infizierte MHM2-Zellen: Spuren 1 und 2: mit ScMHM2-Zellysate infizierte MHM2-Zellen. Spuren 3 und 4: mit Sc79A-Hirnhomogenat infizierte MHM2-Zellen. Spuren 5 und 6: mit BSE-Hirnhomogenat (infizierte MHM2-Zellen). Die Zellen wurden nach der Lyse entweder in Gegenwart von Detergens ultrazentrifugiert (UZ) oder PK-verdaut (PK) und anschließend in einem 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zum Nachweis des Prionproteins wurde ein PrP-spezifischer Antikörper verwendet. Das PrP-Bandenmuster ist nach PK-Verdau im Gegensatz zu den ultrazentrifugierten Proben nach unten verschoben und weist zwischen 79A- und BSE-infizierten Zellen ein deutliche Betonung der mono- (79A) bzw. diglykosylierten (BSE) Form auf. Rechts: schematische Darstellung des charakteristischen Glykosylierungsmusters von PrP^{Sc} vor und nach PK-Behandlung.

4.2.4 Subklonierung von *de novo*-infizierten Zellklonen

Erfolgreich infizierte 79A- bzw. BSE-MHM2-Zellklone wurden ein zweites Mal mittels Endpunkt titration auf Mikrotiterplatten verdünnt ausgesät und über mehrere Passagen Subklone herangezüchtet. Dabei sollte überprüft werden, ob in den Klonen eine relativ homogene Infektion der Zellen vorhanden ist, oder ob bereits ein Teil der Zellen die Infektion wieder verloren hat. Weiterhin sollten Subklone, die PrP^{Sc} sehr stark exprimieren, für Folgeversuche selektiert werden.

Alle sieben Subklone des Ausgangsklons 79A-MHM2-#9 besitzen detergentienunlösliches PrP^{Sc}, das allerdings nicht N-terminal trunziert ist (Abbildung 31, Spuren 3-9). Zwei Subklone (Spuren 3 und 6) weisen einen deutlich höheren Gehalt an PrP^{Sc} als die übrigen fünf Klone auf. In sechs der sieben Subklone überwiegt die Bande der diglykosylierten PrP^{Sc}-Form (Pfeilkopf) gegenüber den anderen beiden Glykosylformen (Spuren 4-9).

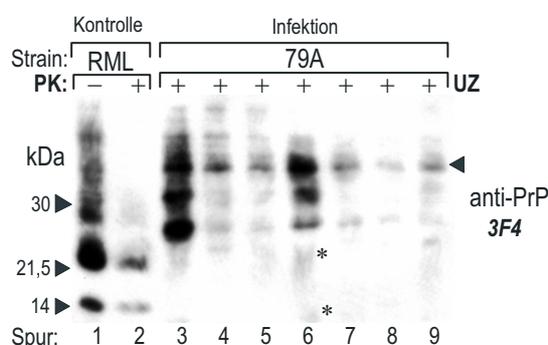


Abbildung 31: Subklone des mit 79A-Gehirnhomogenat infizierten MHM2-Zellklons #9. Alle sieben Subklone sind infiziert und zeigen eine kräftige Bande des diglykosylierten PrP^{Sc} (Pfeilkopf). Zwei Subklone (Spuren 3 und 6) zeigen einen hohen Gehalt an detergentunlöslichem PrP, die anderen 5 Klone weisen eine mittlere bis schwache Expression auf. In allen sieben Fällen ist das PrP^{Sc}-spezifische Glykosylierungsmuster des 79A-Stamms zu erkennen, das im Vergleich zur Infektionskontrolle (RML-ScMHM2 aus San Francisco) gleichmäßig in den höhermolekularen Bereich verschoben ist. Ein einziger Subklon (Spur 6) weist Banden im Bereich des nicht- und monoglykosylierten N-terminal-trunzierten Prionproteins auf (*).

Die Subklonierung weiterer 79A- bzw. der BSE-ScMHM2-Zellklone führte zu vergleichbaren Resultaten und werden daher nicht gesondert abgebildet. Bei fast allen Klonen, die viel unlösliches PrP exprimierten, waren die Subklone gleichmäßig stark und homogen infiziert. Dagegen resultierten aus Klonen mit einem geringen Gehalt an detergentunlöslichem Prionprotein in der Regel nur wenige, schwach exprimierende Subklone.

4.2.5 Vergleich von detergenslöslicher und -unlöslicher PrP-Fraktion

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wird die Expression des löslichen PrP^C mit dem durch die Prion-Infektion der Zellen produzierten Gehalt an unlöslichem PrP verglichen. Dazu wurde die aus der Ultrazentrifugation in Gegenwart von Sarkosyl im Überstand verbleibende lösliche Proteinfraction (und dem darin enthaltenen PrP^C) mit Ethanol gefällt und das gewonnene Präzipitat nach Auftrennung in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel im Westernblot untersucht.

Abbildung 32 zeigt untereinander gestellt, die Expression des detergensunlöslichen (oben) und löslichen (unten) Prionproteins in verschiedenen infizierten ScMHM2-Zellklonen. Mit Ausnahme eines Subklons (Spur 6) ist in allen übrigen Fällen der Gehalt an PrP^C in der löslichen Proteinfraction mit der PrP^{Sc}-Expression korreliert (Spuren 4, 5 und 7).

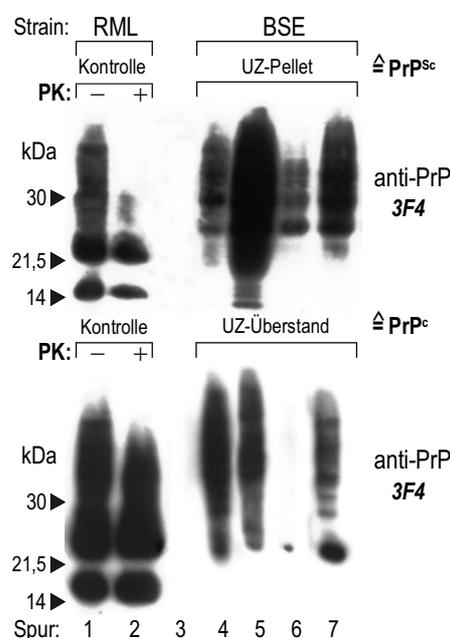


Abbildung 32: Vergleich der Expression des detergenslöslichen und -unlöslichen Prionproteins in vier mit mausadaptiertem BSE infizierten MHM2-Zellklonen. Spur 1 und 2: Infektionskontrolle. Spur 3: leer. Spuren 4-7 infizierte Zellklone. Das Verhältnis von löslichem zu unlöslichem PrP differiert von Subklon zu Subklon.

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine hohe PrP^C-Expression keine unbedingte Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion von MHM2-Zellen ist. Es muss also auch andere Faktoren geben, die eine Zelle suszeptibel für eine Prion-Infektion machen.

4.3 Morphologische Veränderungen von MHM2-Zellen nach Infektion mit PrP^{Sc}-Zelllysate

4.3.1 Ultrastrukturelle Veränderungen prion-infizierter Zellen

MHM2-Zellen wurden – wie unter Kapitel 3.3.2.2 beschrieben – mit ScMHM2-Zelllysate inokuliert. Die Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Infektion im subkonfluenten Stadium (ca. 80% Zelldichte).

Zu definierten Zeitpunkten wurden die Zellen einzelner 5cm-Schalen trypsinisiert und für die in Kapitel 3.3.2.2 aufgeführten elektronenmikroskopischen Aufnahmen fixiert.

Tabelle 37: Zeitpunkte der Präparation von MHM2-Zellen für Standard-EM und Immuno-Elektronenmikroskop. n.d. = nicht durchgeführt. + = Präparation erfolgt.

	<i>Standard-EM</i>	<i>Immuno-EM</i>
vor Infektion	+	+
15 Minuten nach Infektion	n.d.	+
30 Minuten nach Infektion	+	+
60 Minuten nach Infektion	+	+
2 Stunden nach Infektion	+	+
6 Stunden nach Infektion	+	+
12 Stunden nach Infektion	+	n.d.
24 Stunden nach Infektion	+	+
2 Tage nach Infektion	+	+
3 Tage nach Infektion	+	n.d.

Die weitere Aufarbeitung der fixierten Zellen, sowie die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden freundlicherweise von Dr. Lajos Laszlo an der Eötvös Universität in Budapest durchgeführt.

4.3.1.1 Morphologie uninfizierter MHM2-Zellen

Die elektronenmikroskopische Aufnahme in Abbildung 33 zeigt MHM2-Zellen vor der Infektion mit Prionen. Die Kern-Cytoplasma-Relation ist regelrecht. Alle abgebildeten Zellen weisen einen normal großen heterochromatischen Zellkern auf. Die Zellen zeigen keine morphologischen Veränderungen der Kernstruktur, wie beispielsweise Cytoplasmavaginationen. Die im Cytoplasma dargestellten Organellen wie Golgiapparat und Mitochondrien sind vollkommen intakt. Sowohl der Phänotyp als auch die Zahl der lysosomalen Kompartimente bewegt sich im Normalbereich. Insgesamt entspricht der Phänotyp der Zellen dem nicht infizierten „gesunden“ Stadium.

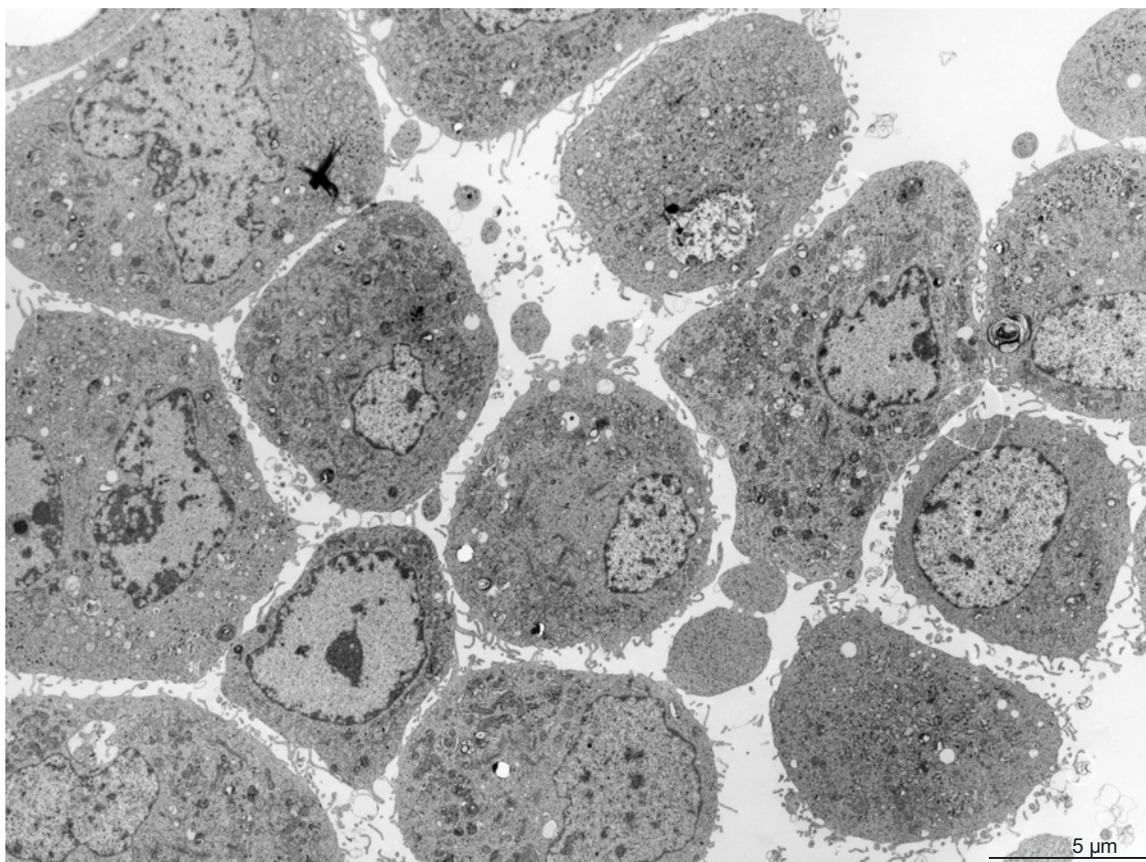


Abbildung 33: MHM2-Zellen vor der Infektion mit Prionen. Die Zellen sind vital und weisen eine normale Morphologie auf. Die Zahl der Lysosomen ist im Normalbereich.

4.3.1.2 Zellen unmittelbar nach Infektion mit Prionen

Subkonfluente MHM2-Zellen wurden mit Lysat aus ScMHM2 Zellen bzw. Hirnhomogenaten aus Scrapie-mäusen wie unter Kapitel 3.3.2.2 und 3.3.2.3 beschrieben, infiziert.

Die unten abgebildeten elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Zellen 30 Minuten nach Inokulation mit prionhaltigem Material. Die Pfeile markieren Invaginationen der Cytoplasmamembran, die auf eine intensive endosomale Aktivität der infizierten MHM2-Zellen schließen lassen (Abbildung 34a). Bei „mock“-infizierten Zellen kommt es ebenfalls zur Endosomenbildung und Aufnahme von extrazellulärem Material. Vor allem bei der Phagozytose unlöslicher Proteine, wie z.B. PrP^{Sc}, lässt sich eine Zunahme der Zahl an Endosomen beobachten.

Die elektronendichten Strukturen auf der cytosolischen Seite der Abbildung 34b lassen diese Einstülpungen eindeutig als „clathrin coated pits“ erkennen. Der beschriebene Prozess einer „bulk internalisation“ von Zellmaterial ist ein aktiver Vorgang der Zelle. Es ist anzunehmen, dass auf diese Weise auch im Inokulum enthaltenes PrP^{Sc} aufgenommen wird.

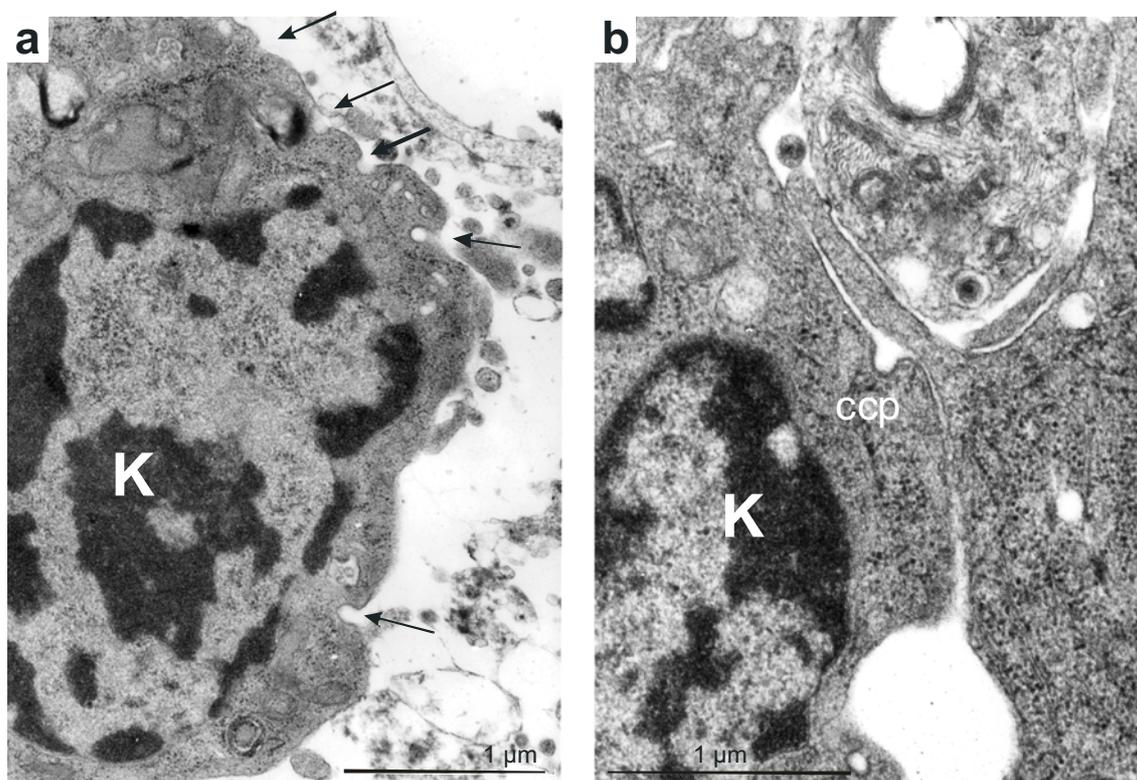


Abbildung 34a: MHM2-Zelle 30 Minuten nach Inokulation mit PrP^{Sc}-haltigem Material (aus Zelllysat). An der Membran finden zahlreiche Phagozytosevorgänge statt (Pfeile). **b:** Abbildung einer frisch infizierten MHM2-Zelle mit einer deutlich erkennbaren „clathrin coated pit“ (ccp). K = Zellkern.

4.3.1.3 Zwölf bis 24 Stunden nach Infektion mit Prionen

Zwölf Stunden nach der Inokulation ist die Zahl der sekundären Lysosomen in den MHM2-Zellen deutlich erhöht (Abbildung 35a). Das Kernchromatin erscheint heterogen und nur teilweise kondensiert. In der Ausschnittsvergrößerung eines Zytoplasmabereiches mit darin enthaltenen Mitochondrien (Abbildung 35b) lässt sich bei einigen dieser Organellen eine zwiebelartige Aufspaltung der inneren Kompartimente erkennen. Dieser, als Myelinisierung bezeichnete Vorgang, weist auf eine Schädigung der Mitochondrien hin.

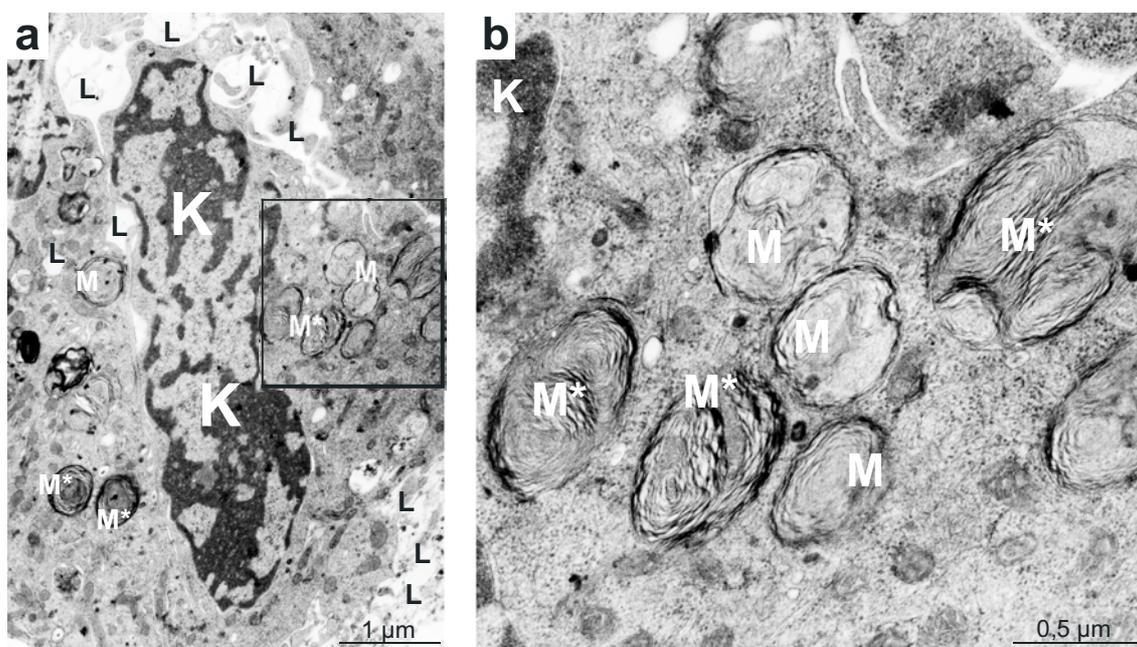


Abbildung 35a: MHM2-Zellen wenige Stunden nach Inokulation mit prionenhaltigem Zellysate. Die Zahl der Lysosomen ist signifikant gestiegen. **b:** Ausschnittsvergrößerung des markierten Bereiches aus Abbildung 35a: Die zwiebelschalenartigen Strukturen weisen auf mitochondriale Schädigung hin. K = Zellkern mit nur teilweise kondensiertem Chromatin (dunkel), M = Mitochondrien (intakt bzw. ohne eindeutige Schädigung), M* = Mitochondrien mit struktureller Veränderung, L = lysosomale Kompartimente.

Der Prozess der Vakuolisierung schreitet im Laufe der nächsten zwölf Stunden weiter fort und erreicht ungefähr einen Tag nach Infektion einen vorläufigen Höhepunkt, an dem die stark angeschwollenen Vakuolen verschmelzen und innerhalb der infizierten Zelle riesige Kompartimente bilden. Im Zellkern ist das Chromatin verdichtet und randständig (Abbildung 36).

Aus den Aufnahmen geht nicht eindeutig hervor, ob es sich bei den beobachteten Veränderungen um apoptotische Schädigungen der Zellen handelt. Dagegen sprechen die Ergebnisse der unter Kapitel 4.3.3.1 beschriebenen Apoptoseexperimente mittels TUNEL, die auf eine eher niedrige Apoptoserate infizierter Zellen hinweisen. Auch die Veränderungen der Zellen im fortgeschrittenen Infektionsstadium sind für apoptotische Vorgänge atypisch.

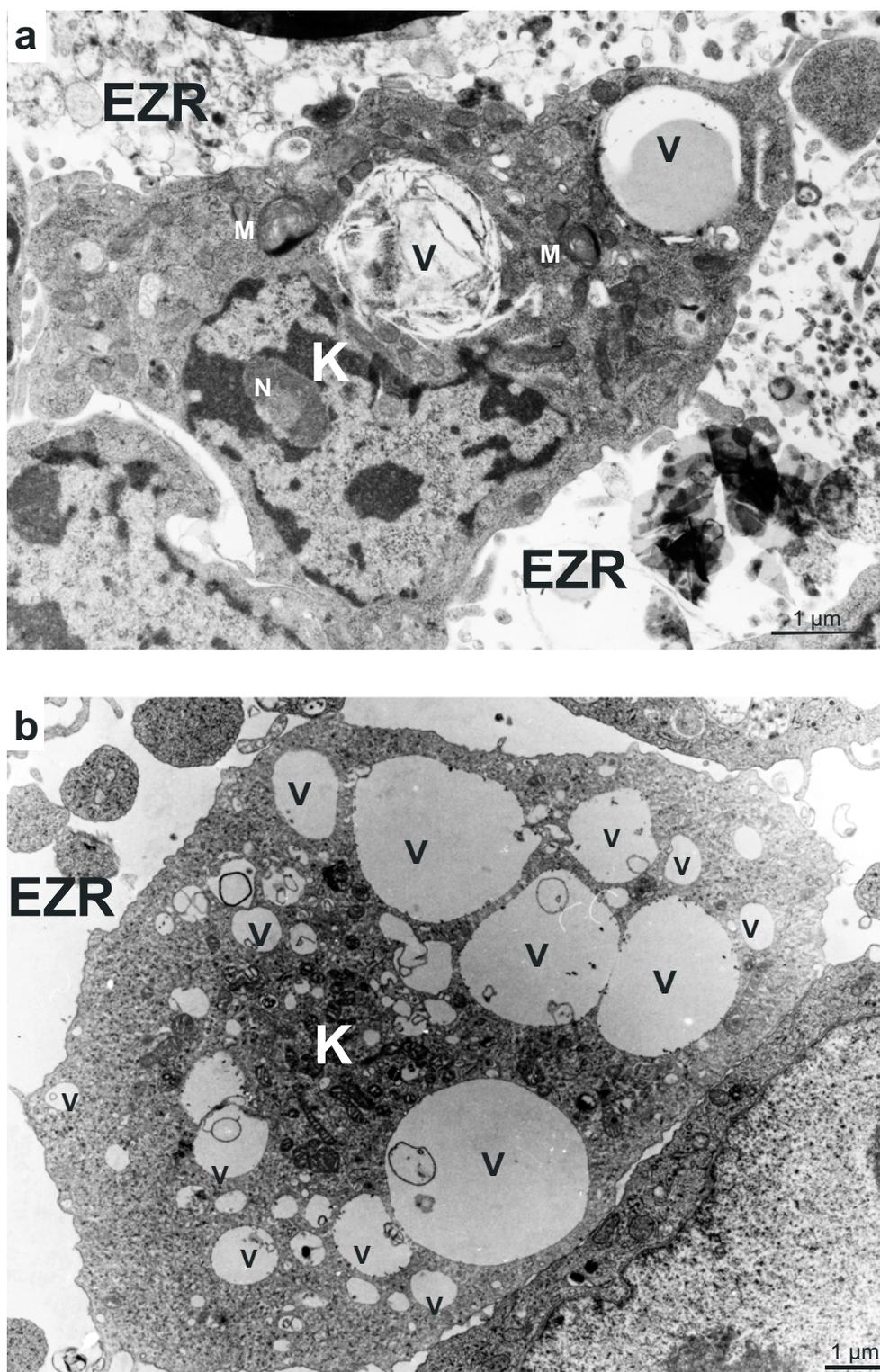


Abbildung 36: MHM2-Zellen 12 Stunden nach Inokulation. **a:** Fortschreiten des Vakuolisierungsprozesses. Eine der beiden großen Vakuolen ist mit lamellären Strukturen, die andere mit homogenem Material gefüllt. Ein großer Teil des Chromatins ist kondensiert. Der Nucleolus ist prominent. Die Mitochondrien zeigen die beschriebenen zwiebschalartigen Veränderungen als Korrelat ihrer Schädigung. **b:** Die zahlreichen kleinen Vakuolen konfluieren zu riesigen Formationen, die den größten Anteil des Zellvolumens einnehmen. Die Kernmembran ist zusammengebrochen, andere Organellen sind nicht mehr eindeutig zu identifizieren. EZR = extrazellulärer Raum, K = Zellkern, M = Mitochondrien, N = Nucleolus, V = Vakuolen.

4.3.1.4 MHM2-Zellen zwei bis drei Tage nach Inokulation mit Prionen

Die morphologischen Veränderungen der infizierten Zellen verlaufen nach den ersten 24 Stunden nach der Inokulation mit prionhaltigem Material langsam und weniger dramatisch.

Der fortschreitende Zelltod führt zu einem Anstieg der Aktivität der gewebespezifischen Transglutaminase (L. Laszlo, persönliche Mitteilung), der mit einer Erhöhung der Elektronendichte im Nukleus korreliert.

Die Kern-Cytoplasma-Relation ist deutlich zugunsten des Kerns verschoben. Es finden sich nur noch wenige, schaumartig aneinander gelagerte Vakuolen. Die zelluläre Ultrastruktur desintegriert und die Zellorganellen sind nicht mehr eindeutig identifizierbar. Das Kernchromatin ist fast vollständig kondensiert (Abbildung 37).

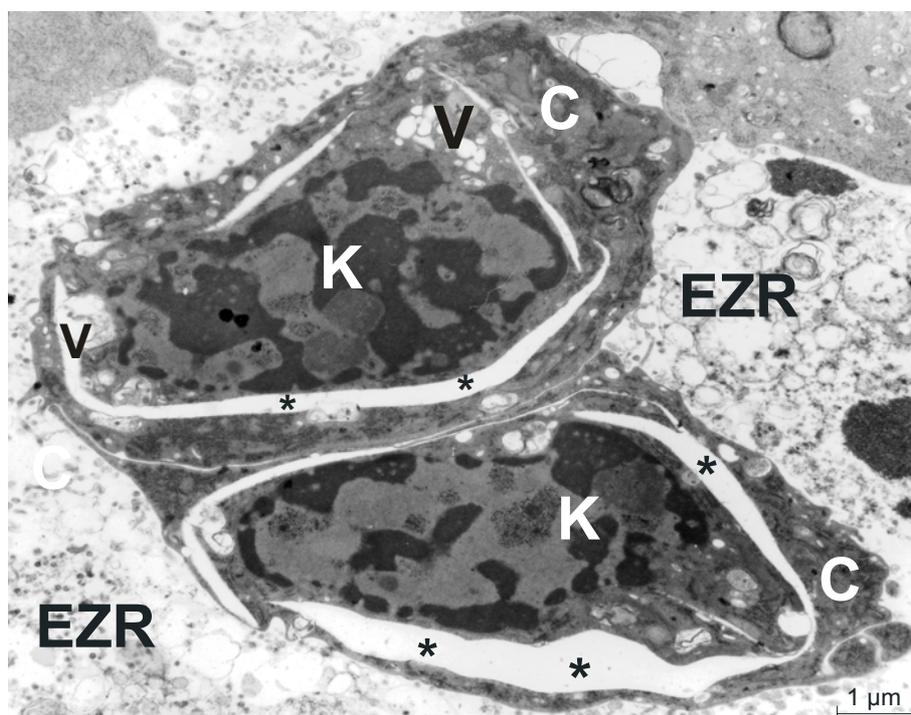


Abbildung 37: Die erhöhte Elektronendichte im Kernbereich korreliert mit der fast vollständigen Chromatin-Kondensation. Der Cytoplasmasaum ist schmal und beinhaltet nur wenige, strukturell geschädigte Zellorganellen. Der mit (*) bezeichnete Saum zwischen Kern und Cytoplasma stellt einen fixierungsbedingten Schrumpfungsspalt dar und ist nicht mit den wenigen, schaumartig aneinander gelagerten Vakuolen zu verwechseln. C = Cytoplasma, K = Zellkern, EZR = extrazellulärer Raum, V = Vakuole.

Letztlich kommt es zum Zusammenbruch der Zellmembran, infolgedessen werden Zelltrümmer ausgestoßen, die, wie die Immunogoldmarkierungen mit dem PrP-spezifischen Antikörper zeigen, PrP^{Sc} enthalten (Abbildung 38, Pfeile).

Benachbarte Zellen nehmen die akkumulierenden PrP^{Sc}-Aggregate mittels Phagozytose wieder auf und werden so ebenfalls infiziert. Die Infektion kann sich auf diese Weise über die gesamte Zellpopulation ausbreiten.

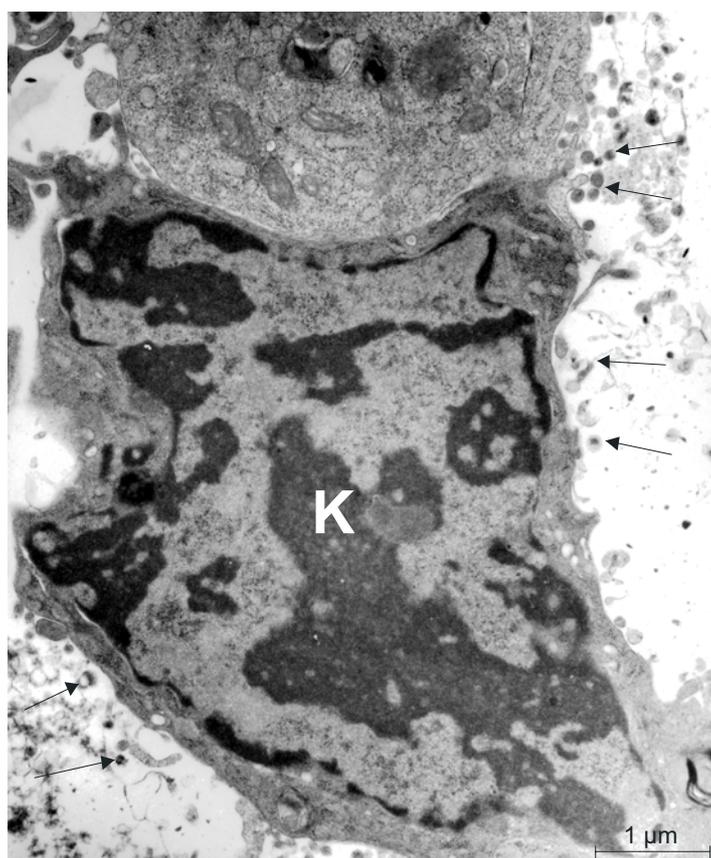


Abbildung 38: Die Zellmembran der schwer geschädigten Zellen desintegriert, und die Zelltrümmer werden freigesetzt (Pfeile). Über der absterbenden Zelle ist am oberen Bildrand eine weitere Zelle mit bereits starken degenerativen Veränderungen zu erkennen. K = Zellkern, Pfeile = freigesetzte Zelltrümmer mit PrP^{Sc}.

4.3.2 Verfolgung der Stadien der „*early infection*“ mittels Immuno-EM

Mit der Immunogoldmarkierung von PrP^{Sc} ist es möglich, nicht nur die aktive Aufnahme des Inokulums in die Zellen, sondern auch dessen Weitertransport und Ablagerung in Organellen zu verfolgen.

Da PrP^C gegenüber den stringenten Präparationsbedingungen instabil ist, werden durch dieses Verfahren nur die im Inokulum enthaltenen PrP^{Sc}-Moleküle markiert.

4.3.2.1 Fünfzehn Minuten nach Infektion

Abbildung 39 zeigt MHM2-Zellen 15 Minuten nach der Inokulation mit prionhaltigem Material. Goldmarkiertes PrP^{Sc} ist als schwarzer Punkt zu erkennen (Pfeile). Es wird deutlich, dass das Prionprotein mit der Zelloberfläche in Kontakt tritt.

Ähnlich wie unter Standard-EM-Bedingungen ist auch in der Ausschnittvergrößerung der Membraneinstülpungen im Immuno-EM die Ausbildung von „*clathrin-coated pits*“ zu erkennen, durch die PrP^{Sc} anscheinend aktiv aufgenommen wird (Abbildung 39).

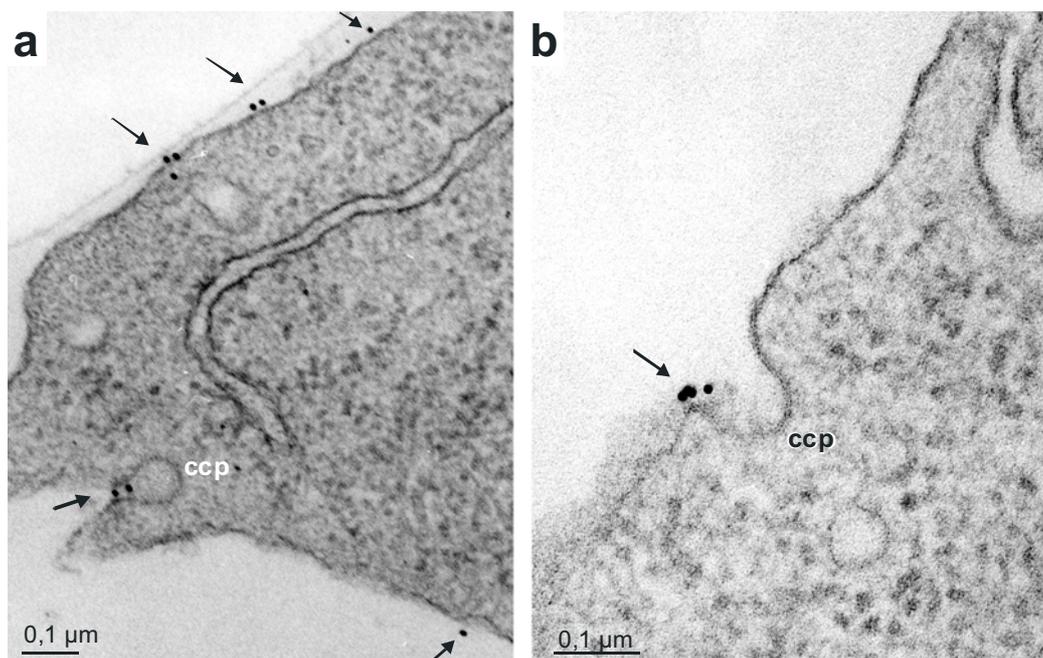


Abbildung 39: Immuno-EM von MHM2-Zellen, die mit Zelllysate prion-infizierter Zellen inokuliert wurden (15 Minuten nach Inokulation). **a:** Interaktion von PrP^{Sc} mit der Zelloberfläche (Pfeile) und Ausbildung von Membraneinstülpungen. **b:** Ausschnittsvergrößerung der Einstülpung der Zellmembran mit „*clathrin coated pit*“. ccp = „*clathrin-coated pit*“.

4.3.2.2 Dreißig Minuten nach Infektion

Bereits 30 Minuten nach der Inokulation kann man in endosomalen Kompartimenten internalisiertes PrP^{Sc} erkennen, während ein Teil des PrP^{Sc} sich noch an der Zelloberfläche befindet (Abbildung 40a, b).

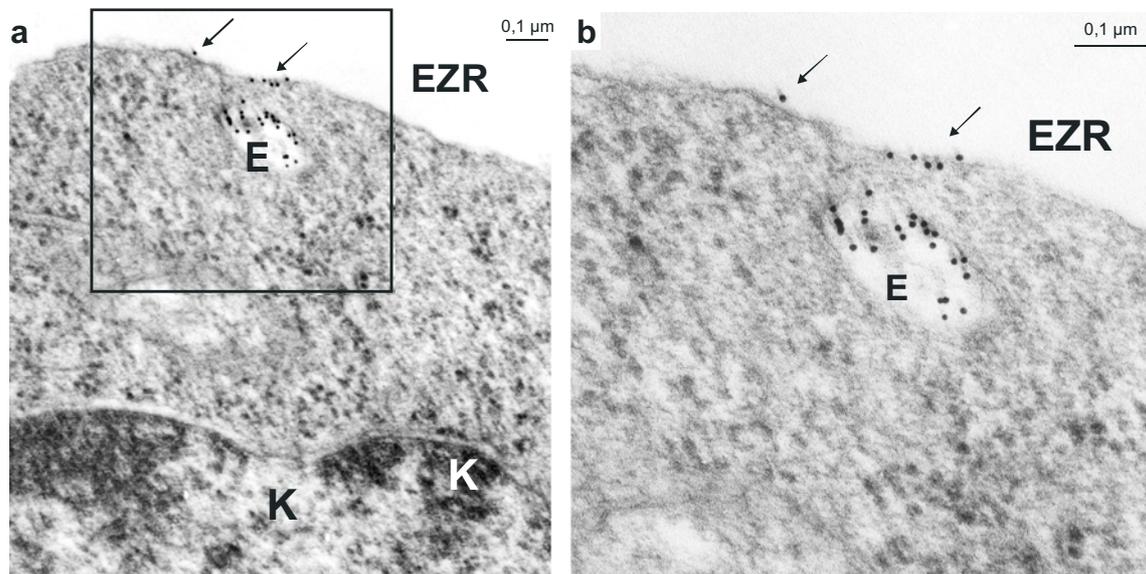


Abbildung 40a: 30 Minuten nach Inokulation wird ein Teil des im Inokulum enthaltenen PrP^{Sc} in Endosomen aufgenommen während der andere Teil sich noch an der Zelloberfläche befindet (Pfeile). **b:** Die Ausschnittsvergrößerung zeigt in Endosomen eingeschlossenes PrP^{Sc}. E = Endosom, EZR = extrazellulärer Raum, K = Zellkern.

4.3.2.3 Sechzig Minuten nach Infektion

Die Weitertransport des aufgenommenen PrP^{Sc} führt von den Endosomen rasch zu elektronendichteren Strukturen. Diese enthalten Ubiquitin-Konjugate, Beta-Glucuronidase und Kathepsin B und gehören dem lysosomalen Kompartiment an. Nach etwa einer Stunde ist PrP^{Sc} in diesen so genannten „späten Endosomen“ bzw. Lysosomen lokalisierbar. Aufnahmen von Zellen 2, 6, und 24h nach Inokulation geben keinen Hinweis auf einen Weitertransport des aufgenommenen PrP^{Sc} (nicht gezeigt). Vermutlich verbleibt PrP^{Sc} in den Lysosomen und akkumuliert dort.

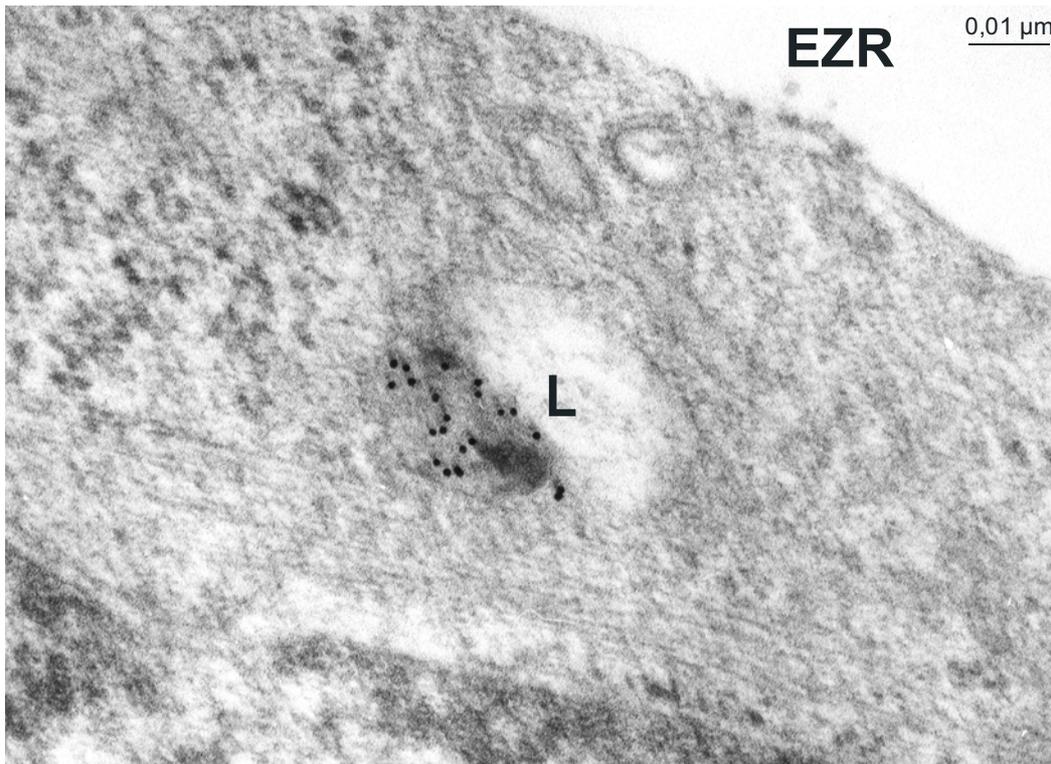


Abbildung 41: Akkumulation von PrP^{Sc} im lysosomalen Kompartiment. L = Lysosom, EZR = extrazellulärer Raum

4.3.3 Vitalitätsuntersuchung von N2a-Zellen nach Infektion mit Prionen

4.3.3.1 Apoptose von N2a-Zellen nach Inokulation mit prionhaltigem Zelllysate

Die auf elektronenmikroskopischer Ebene beobachteten morphologischen Veränderungen der N2a-Zellen, die mit Prionen infiziert wurden, können als Apoptosevorgänge interpretiert werden. Es sollte daher geklärt werden, ob es sich tatsächlich um induzierten Zelltod (Apoptose) handelt und in welchem Ausmaß die inokulierten Zellen davon betroffen sind.

Mit Hilfe des TUNEL-Verfahrens lassen sich die als pathognomisch geltenden DNA-Einzelstrangbrüche apoptotischer Zellen hochsensitiv nachweisen. Die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Einzelstrangbrüche („nicks“) lassen den Kern einer apoptotischen Zelle apfelgrün erscheinen.

N2a-Zellen wurden wie unter Kapitel 3.3.2.2 beschrieben, mit Lysat aus ScMHM2-Zellen in verschiedenen Konzentrationen („mock“, 1% bis 50%) inokuliert. Nach der Inokulation wurden die Zellen trypsinisiert und auf speziellen Objektträgern über Nacht angezchtet. Nach der Fixierung der Zellen wurden die Einzelstrangbrüche mittels terminaler Transferase, die fluoreszenzgekoppeltes UTP an die offenen Enden der Einzelstrangbrüche ansynthetisiert, markiert. Die Bilder wurden im Fluoreszenzmikroskop bzw. mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops aufgenommen.

Ein kleiner Prozentsatz der Zellkerne der inokulierten Zellen ist apoptotisch (Abbildung 42b-d). Die Kontrollzellen weisen dagegen keine erkennbaren apoptotischen Veränderungen auf (Abbildung 42a). In der stark vergrößerten Aufnahme des konfokalen Lasermikroskops lassen sich im Zellkern einer apoptotischen Zelle ballenartig verdichtete Chromatinstrukturen erkennen, die auf einen beginnenden Zelltod hindeuten.

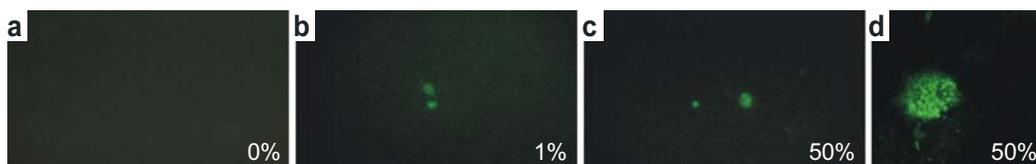


Abbildung 42: Fluoreszenzfärbung von DNA-Einzelstrangbrüchen (TUNEL) zur Darstellung von Apoptosevorgängen in Prion-inokulierten N2a-Zellen: **a:** N2a-Zellen, die mit Zelllysate aus nichtinfizierten N2a-Zellen inokuliert wurden. **b** und **c:** mit prionhaltigem Zelllysate inokulierte N2a-Zellen. Vereinzelt findet sich eine apfelgrüne Kernfärbung als Zeichen, die eben stattfindende Apoptosevorgänge anzeigt. **d:** in der Aufnahme mit einem konfokalen Mikroskop ist das Chromatin ballenartig kondensiert und kann als Zeichen des Apoptosebeginns interpretiert werden.

Die oben gezeigten Aufnahmen legen den Schluss nahe, dass N2a-Zellen kein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung von Apoptosevorgängen darstellen. Einige Zellen zeigen zwar Vakuolisierung und nachfolgenden Zelltod, was auch elektronenmikroskopisch belegt werden kann. Der Zelluntergang beruht

jedoch hauptsächlich nicht auf Apoptose-typischen DNA-Einzelstrangbrüchen, sondern auf einem anderen, bislang unbekanntem Mechanismus.

4.3.3.2 Vitalitätsassay

Einige MHM2-Zellen, die entweder mit PrP^{Sc}-haltigem oder prionfreiem Zelllysate inokuliert wurden, zeigen einige Stunden bis Tage nach der Infektion eine lichtmikroskopisch erkennbare deutliche Vakuolisierung. Um Artefakte auszuschließen, die durch einen Einfluss des Inokulums auf das Zellwachstum hervorgerufen werden, wurde ein Vitalitätsassay frisch infizierter (zwei Tage nach Infektion), „mock“-inokulierter und nicht infizierter Zellen mittels XTT-Farbstoff einem Vitalitätstest unterzogen (Kapitel 3.7.3).

Die gewonnenen Daten wurden mittels t-Test für unverbundene Stichproben unter Annahme unterschiedlicher Varianzen statistisch analysiert. Bei einem zweiseitigen Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ ergibt sich hinsichtlich der Vitalität kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen, die mit Lysat aus ScMHM2- bzw. aus nichtinfizierten N2a-Zellen inokuliert wurden. Es besteht auch kein signifikanter Unterschied zwischen nicht-inokulierten Kontrollzellen und solchen, die mit Zelllysate inkubiert wurden.

Tabelle 38: Die statistische Auswertung des XTT-Vitalitätsassays zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen. Es finden sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen „mock“- und prion-infizierten Zellen.

	Kontrollzellen nicht inokuliert	Zellen „mock“-inokuliert	Zellen ScMHM2-inokuliert
Zahl der getesteten Kulturen pro Mikrotiterplatte	16	16	16
Mittelwert Extinktion	0,433	0,528	0,442
Varianz Extinktion	0,01704	0,02408	0,00501
p-Wert nicht infiziert/prion-infiziert	0,686	--	0,686
p-Wert „mock“-infiziert/prion-infiziert	--	0,057	0,057

Der MHM2-Zelltyp zeigt also keine signifikanten Vitalitätsunterschiede zwischen nicht infizierten und infizierten Zellen ($p > 0,05$). Die elektronenmikroskopisch beobachteten ultrastrukturellen Veränderungen nach der Inokulation (Kapitel 4.3.1) sind also kein Korrelat der apoptotischer Prozesse, sondern entsprechen einer anderen Form des Zelluntergangs, der möglicherweise durch PrP^{Sc} direkt verursacht wird.

5 Diskussion

5.1 Persistierend mit PrP^{Sc} infizierte Zelllinien

Bereits 1970 gab es Hinweise, dass der Scrapie-Erreger in Zellkultur vermehrbar ist (Clarke und Haig, 1970). In den darauf folgenden Jahren wurde eine Reihe von Zelllinien hinsichtlich ihrer Infizierbarkeit mit Prionen getestet, so z.B. murine Fibroblasten (Clarke und Millson, 1976), die Tumorzellen L5178Y (Gibson *et al.*, 1972), die murinen Linien P388D1 und P3-NS1-Ag-1 (NS1), L-Zellen sowie ein NS1-Nierenzell-Hybrid (Elleman, 1984). Neben der grundsätzlichen Schwierigkeit, dass sich einige Zellen gar nicht mit Prionen infizieren ließen, stellte sich die mangelnde Persistenz der Prion-Infektion häufig als gravierendes Problem heraus.

Die murine N2a-Linie und deren Derivate (wie z.B. die unten beschriebenen MHM2-Zellen) sind die weltweit in allen Labors am weitesten verbreitete Zelllinie zur Untersuchung prion-spezifischer Fragestellungen. Es handelt sich um relativ anspruchslose, in *Monolayern* wachsende Zellen, die mit Hirnhomogenat unterschiedlicher Prionstämme („*strains*“) infiziert werden können und die Infektiosität über zahlreiche Passagen hinweg aufrechterhalten.

Die vom murinen Hypothalamus abstammenden, immortalisierten GT1-Zellen konnten erstmalig von Schätzl *et al.* persistierend mit Prionen infiziert werden (Schätzl *et al.*, 1997). Prion-infizierte GT1-Zellen zeigen zum Teil (<20%) einen ausgeprägten Phänotyp, der durch Wachstumsstörungen, Vakuolisierung und induziertem Zelltod (Apoptose) gekennzeichnet ist.

Da die Infektion von Versuchstieren mit Prionen eine – aufgrund der langen Inkubationszeit – sehr zeit- und aufwendige Methode darstellt, stellen prion-infizierte, persistierende Zelllinien ein hervorragendes Modellsystem für die Untersuchung unterschiedlicher Aspekte der Prion-Biologie dar. Die langwierigen Tierexperimente (Inkubationszeiten von >140 Tagen bei Infektion von Wildtyp-Mäusen mit Prionen) führen auf Zellebene in weniger als vier Wochen zu einer gesicherten Aussage. Experimente mit N2a bzw. GT1-Zellen können als Vorstufe zur Ermittlung der optimalen Parameter von Tierexperimenten dienen, und damit die Planung der nachfolgenden Tierversuche erleichtern.

5.1.1 Das chimäre MHM2 Prionprotein

Butler *et al.* beschrieben 1988 die effiziente Produktion von PrP^{Sc} und infektiösen Prionen in Neuroblastomzellen der Maus, die persistierend mit murinen Scrapie-Prionen des RML-„*strains*“ infiziert waren (Butler *et al.*, 1988). Aufgrund der so genannten Speziesbarriere (Pattison, 1965), die eine effektive Übertragung der Infektiosität zwischen bestimmten Spezies verhindert und deren Ursache bis heute nicht vollständig geklärt worden ist, lassen sich Mäuse nicht mit Prionen des syrischen Hamsters infizieren (Scott *et al.*, 1992).

Aus Experimenten mit transgenen Mäusen (Scott *et al.*, 1989; Prusiner *et al.*, 1990) weiß man inzwischen, dass die Primärstruktur des Donor-PrP^{Sc}-Stammes eine der Ursachen für die Speziespezifität ist.

Durch die Entwicklung eines chimären Konstrukts aus dem Priongen der Maus und des syrischen Hamsters konnte Scott 1992 eine mit dem 3F4-Epitop markierte Variante des Maus-Prionproteins herstellen, die er in murine prion-infizierte Neuroblastomzellen einführte. Die nach dem eingeführten Konstrukt bezeichneten ScMHM2-Zellen (Maus-Hamster-Maus-Maus) exprimieren sowohl murines PrP^C, als auch MHM2-PrP^C, das ebenfalls durch Infektion mit prionhaltigem Hirnhomogenat in die Proteinase K-resistente, detergens-unlösliche PrP^{Sc}-Form überführt werden konnte. In dem mit „H“ bezeichneten Sequenzabschnitt liegt das so genannte 3F4-Epitop (Aminosäurepositionen 109 bis 112). Bei Inokulationsexperimenten zeigte sich, dass alle Mäuse, die mit ScMHM2-Prionen infiziert worden waren, erkrankten. In der Kontrollgruppe mit Hirnhomogenat aus syrischem Hamster erkrankte kein einziges Tier. Das in Zellkultur generierte ScMHM2-PrP ist also infektiös und an die Speziesbarriere Maus-Hamster gebunden (Borchelt *et al.*, 1990 ; Borchelt *et al.*, 1992).

Mit Hilfe des 3F4-Antikörpers kann aufgrund der durch den Aminosäureaustausch veränderten Epitopstruktur zwischen Maus-PrP^C/PrP^{Sc} und MHM2-PrP^C/PrP^{Sc} unterschieden werden. Der 3F4-Antikörper erkennt das Wildtyp-PrP^C/PrP^{Sc} der Maus nicht. Der entscheidende Vorteil dieses Zellsystems gegenüber anderen neuronalen Zelllinien, die persistierend mit Prionen infiziert werden können, liegt in der Möglichkeit, die Neusynthese von PrP^{Sc} nach der Infektion von dem im Inokulum enthaltenen Prionprotein, welches das 3F4-Epitop nicht trägt, zu unterscheiden zu können. Grundsätzlich sind zwei experimentelle Ansätze denkbar: i) Messung des Epitop-markierten, *de novo*-synthetisierten PrP^{Sc} nach Inokulation mit murinem Wildtyp-PrP^{Sc}. Durch Verwendung des 3F4-Antikörpers lässt sich im Beobachtungszeitraum *de novo* generiertes PrP^{Sc} markieren. ii) Verfolgung des 3F4-Inokulums im Verlauf mehrerer Passagen nach Infektion in Wildtyp-Neuroblastomzellen. Mit dem 3F4-Antikörper könnte man die Abnahme der PrP^{Sc}-Moleküle im Inokulum durch Verdünnung bzw. Abbau ermitteln.

Für die Verwendung dieses Antikörpers spricht auch, dass er kommerziell vertrieben wird und in großen Mengen verfügbar ist. Zudem ist die Affinität eines monoklonalen Antikörpers zum Substrat im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern geringeren Schwankungen unterworfen. (Semi-)quantitative Bestimmungen der Protein-Menge im Westernblot sind mit monoklonalen Antikörpern zuverlässiger.

5.1.2 Charakteristische Eigenschaften persistierend prion-infizierter Zellen

5.1.2.1 PrP^{Sc}-Produktion in ScMHM2-Zellen

Aufgrund ihres raschen Wachstums und ihrer Robustheit wurden ScMHM2-Zellen für die meisten Experimente bevorzugt verwendet. Durch regelmäßige Passagierung dieser Zellen wurde eine homogene Zellpopulation erzeugt.

Zur Generierung der ScMHM2-Zellen wurde mittels stabiler Transfektion das MHM2-Konstrukt in zuvor mit prionenhaltigem Material infizierte N2a Zellen eingeführt (Scott *et al.*, 1992). Die Zellen wurden danach nicht weiter klonal selektiert, stellten somit eine inhomogene „Mischkultur“ mit z.T. nichtinfizierten Zellen dar. Die von der Kopienzahl abhängige Menge an exprimierten PrP^C musste ebenfalls näher bestimmt werden.

Um eine annähernd quantitative Aussage über den Prozentsatz an infizierten Zellen machen zu können, wurde der Weg der Einzelzellklonierung beschritten. Wie die Westernblot-Analysen zuvor infizierter ScMHM2-Zellen anhand von Klonierungsexperimenten zeigen, sind ca. 70% der erhaltenen Einzelzellklone infiziert. Anhand der Signalintensität der PrP^{Sc}-spezifischen Banden im Westernblot konnte zudem gezeigt werden, dass die Expression des pathologischen Prionproteins in den einzelnen Klonen stark variiert. Vermutlich ist in der Mischkultur ein ähnlich hoher Prozentsatz an infizierten Zellen enthalten, die PrP^{Sc} ebenfalls in unterschiedlichen Mengen akkumulieren. Die Zellen geben ihre Infektion an die Tochterzellen und möglicherweise auch an benachbarte Zellen weiter, wie die Ergebnisse der Reinfektionsexperimente (Kapitel 5.2.1) zeigen.

Dass die Scrapie-Infektion im Zellkultursystem erhalten bleibt, wurde durch Passagierungsexperimente (Zeitkinetik) der ScMHM2-Zellen überprüft. Im zeitlichen Verlauf blieben PrP^C-Expression und PrP^{Sc}-Akkumulation in „bulk“-infizierten MHM2-Zelllinien über viele Passagen konstant. Zudem wurde deutlich, dass die Produktion beider PrP-Isoformen nicht direkt mit der Wachstumsgeschwindigkeit der infizierten Zellen korreliert ist.

Die Kinetik der Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} scheint von mehreren Faktoren abzuhängen. Dazu gehört unter anderem auch das Ausmaß der zellulären PrP^C-Expression. Interessanterweise ist die PrP^{Sc}-Menge bei den durch Klonierung gewonnenen ScN2a/ScMHM2-Kulturen nur bei starker PrP^C-Expression mit dem Gehalt an löslichem Prionprotein korreliert. Bei Klonen, die nur einen mittleren bis niedrigen PrP^C-Titer aufweisen, schwankt die produzierte PrP^{Sc}-Menge dagegen zwischen sehr wenig bis mittel: Einige Zellklone reichern PrP^{Sc} in weit stärkerem Maße an, als andere Zellen, die eine ähnlich hohe PrP^C-Produktion haben. Die PrP^{Sc}-Produktion und -Anreicherung in infizierten Zellen ist also keine Konstante der PrP^C-Expression.

Dieser Befund wurde durch jüngste Veröffentlichungen bestätigt, in denen auf die Tatsache hingewiesen wird, dass die Infektionseffizienz bei einer Neuinfektion von N2a-Zellen nicht direkt von der PrP^C-Expression der zu infizierenden Zellen abhängt. (Bosque und Prusiner, 2000; Enari *et al.*, 2001) Neben der PrP^C-Konzentration werden weitere Faktoren vermutet, welche die Suszeptibilität und die Anreicherung von PrP^{Sc} steuern.

5.1.2.2 ScMHM2-Zellen können über viele Passagen persistierend infiziert bleiben

Die Untersuchung der infizierten ScMHM2-Zellen im Hinblick auf die Stabilität der Scrapie-Infektion war in unter verschiedenen Gesichtspunkten von großem Interesse.

Grundsätzlich galt es, den optimalen Verdünnungsfaktor (d.h. die „split rate“) für das Passagieren der Zellkulturen zu ermitteln. Es konnte gezeigt werden, dass ScMHM2-Zellen in fast jeder Verdünnung (von 1:2 bis 1:50) passagiert werden können, wodurch sie für experimentelle Anwendungen äußerst interessant erscheinen.

Die Zellen sollten nicht zu schnell konfluent werden, aber auch nicht zu langsam wachsen, um eine zügige Durchführung der Versuche zu garantieren. Ziel war es, nach einem Passagierungsschritt innerhalb von vier bis fünf Tagen eine konfluente 9 cm-Kulturschale zu erhalten. Die im Zeitkinetik-Experiment empirisch ermittelte Verdünnung von 1:10 stellte sich unter Beibehaltung der PrP^{Sc}-Produktion als optimal für das Wachstum der Zellen heraus.

Um eine Aussage über eine mögliche prioninduzierte Expression bestimmter zellulärer Marker machen zu können, war es notwendig, den Gehalt der Zellen an pathologischem Prionprotein zu kennen. Dazu wurden in Stickstoff gelagerte ScMHM2-Zellen über mehrere Passagen propagiert und die PrP^C- und PrP^{Sc}-Produktion mittels Westernblot bestimmt. Die Intensität der PrP^{Sc}-spezifischen Banden nahm während der ersten drei Passagen zu und blieb dann konstant. Die Zunahme der PrP^{Sc}-Expression lässt sich eventuell durch einen gewissen Wachstumsreiz infolge der Passagierung erklären, der zur Stimulation der PrP^{Sc}-Expression führt. Die Gesamtproteinmenge der Zelle bleibt jedoch unverändert, wie die durchgeführten Reinkubation der Nitrozellulosemembran mit dem NSE-Antikörper beweist. Wie bereits erwähnt, nahm die PrP^{Sc}-Expression persistierend infizierter ScMHM2-Zellen auch bei hohen Verdünnungen (1:20 bzw. 1:50) nicht signifikant ab.

Diese Ergebnisse sind maßgebend für die Effizienz einer geplanten Neuinfektion von Zellen. Von einer bestimmten „split rate“ ausgehend, lässt sich so der PrP^{Sc}-Titer ermitteln, der für eine selbsterhaltende Infektion notwendig ist. Verdünnungen von mehr als 1:50 sind im Hinblick auf das Wachstum der Zellen nicht mehr praktikabel und bedingen lediglich eine Reduktion der infektiösen Partikel um 1,6 Stufen des dekadischen Logarithmus. Bei einer vollständig konfluenten Kulturschale kann vorausgesetzt werden, dass es bei dieser Verdünnung initial nach Passagierung zu einer Verminderung der infektiösen Partikel auf ca. 2×10^2 ID₅₀ kommt (Bosque *et al.*, 2000). Die PrP^{Sc}-Produktion läuft in den infizierten Zellen jedoch kontinuierlich weiter und trägt so zur Erhöhung der Prionmenge sofort nach der Passage bei.

Auf der anderen Seite führt auch eine vergleichsweise langsame Passagierung und der Versuch, die Zellen während der Kultivierung in einem dauernd konfluenten Stadium zu halten, um ihre Teilungsrate zu vermindern, nicht zu einer Akkumulation von PrP^{Sc}. Zellteilung und Zelluntergänge führen gemeinsam mit dem Wechsel des Kulturmediums auch bei einer Verdünnung von 1:2 pro Passage zu einer „clearance“ (Verdünnungsvorgang) des akkumulierten PrP^{Sc}.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die PrP^{Sc}-Produktion von ScMHM2-Zellen unter normalen Kulturbedingungen konstant ist.

5.1.2.3 Einfluss chemischer Chaperone auf die Stabilität der Infektion

Trotz der unter Kapitel 5.1.2.2 beschriebenen Stabilität der Scrapie-Infektion von ScMHM2-Zellen beobachtet man über einen längeren Zeitraum bzw. bei häufiger Passagierung einen Verlust ihrer PrP^{Sc}-Expression (Bosque *et al.*, 2000). Aus diesem Grund müssen die Zellen immer wieder subkloniert werden, um die PrP^{Sc}-Infektion zu erhalten. Richtungweisend für die unter Kapitel 4.1.3.2 beschriebenen Experimente mit Zellen, die in Gegenwart von DMSO tiefgefroren wurden, war die Beobachtung, dass infizierte ScMHM2-Zellen mit einer sehr ausgeprägten PrP^{Sc}-Expression nach dem Auftauen deutlich weniger PrP^{Sc} produzierten. Ursachen können sowohl der Einfrier-/Auftauvorgang an sich, als auch das DMSO sein.

Tatzelt *et al.* konnten zeigen, dass sowohl die Rate als auch das Ausmaß der PrP^{Sc}-Formation in ScN2a-Zellen durch Reagenzien, die Proteine in ihrer nativen Form stabilisieren, reduziert werden (Tatzelt *et al.*, 1996). Zu diesen so genannten Osmolyten gehören beispielsweise Glycerin und Trimethylamin N-Oxid (TMAO) sowie das organische Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO). Die genannten Substanzen schützen *in vitro* Proteine vor temperaturbedingter Denaturierung und Aggregation (Gerlisma und Stuur, 1972; Back *et al.*, 1979; Gekko und Koga, 1983). Aufgrund ihres Einflusses auf die Proteinfaltung werden sie auch als „chemische Chaperone“ bezeichnet. Obwohl diese chemischen Chaperone das intrazellulär bereits vorhandene PrP^{Sc} anscheinend nicht beeinflussen, interferieren sie doch mit der PrP^{Sc}-Neubildung durch Konversion von PrP^C. In einer Konzentration von 100 mM reduziert DMSO die Neubildung von detergensunlöslichem PrP^{Sc} um ca. 50%. Den Ergebnissen von Tatzelt *et al.* zufolge hängt der inhibitorische Effekt sowohl von der Zeit als auch von der Konzentration des chemischen Chaperons ab. Es wird vermutet, dass die genannten Substanzen die Syntheserate von PrP^C nicht beeinflussen, sondern die α -helikale Form von PrP^C stabilisieren und vor einer Konformationsänderung zu PrP^{Sc} schützen. Denkbar ist auch eine veränderte subzelluläre Kompartimentierung von PrP^C bzw. PrP^{Sc}, so dass die Reaktionspartner nicht mehr in den für die Konversion nötigen räumlichen Kontakt treten können.

Kultivierte Zellen werden in der Regel unter der Verwendung von DMSO als Frostschutzmittel kryokonserviert. Die erwähnten PrP^C-stabilisierenden Eigenschaften von Glycerin, die auch für DMSO angenommen werden, konnten durch Zeitkinetik-Experimente im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Dazu wurden ScMHM2-Zellen in kurzen Abständen wiederholt in einer DMSO-haltigen Kryolösung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und wieder aufgetaut. Dabei stellte sich heraus, dass die PrP^{Sc}-Menge mit der Zahl der Einfrier-/Auftauvorgänge deutlich abnimmt. Die beobachtete rasche Verminderung der PrP^{Sc}-Expression der kultivierten ScN2a- und ScGT1-Zellen ist daher nicht nur auf eine metabolisch begünstigte Selektion PrP^{Sc}-negativer Zellen zurückzuführen, sondern vor allem auf den konformationsstabilisierenden Einfluss des DMSO als Frostschutzmittel.

Nichtsdestotrotz ist aus vielerlei Gründen (Überalterung der Zellen, Kontamination, Weitergabe der Zellen an andere Forschungsgruppen, etc.) das Einfrieren der Zellen notwendig. Als Alternative zu DMSO und Glycerin müssen Substanzen eingesetzt werden, die die Stabilität der Prion-Infektion nicht beeinträchtigen. Dazu bieten sich dextranshaltige Lösungen bzw. kommerzielle, DMSO-freie, Glycerol-freie Frostschutzmittel (z.B. der Firma Celox) an.

Inwieweit durch konformationsstabilisierende Substanzen in der Behandlung von Prionerkrankungen bzw. prophylaktisch eingesetzt werden können, ist derzeit nicht abzusehen. Die Verwendung des ScMHM2-Zellkulturmodells dürfte die breite Untersuchung infrage kommender Wirkstoffe im Vergleich zum Tiermodell aber erheblich beschleunigen.

5.1.3 Expression zellulärer Markerproteine in ScMHM2-Zellen

Die vergleichende Untersuchung nicht infizierter muriner Neuroblastomzellen (N2a) und stabil infizierter ScMHM2-Zellen über mehrere Passagen hinweg bzw. an definierten Einzelzellklonen sollte Auskunft über Veränderungen bestimmter zellulärer Marker geben, die durch infektionsverursachte pathologische Veränderungen oder kompensatorische Zellmechanismen bedingt sind. Dazu wurde die Expression einiger bereits in der Literatur beschriebener zellulärer Marker, die mit einer Scrapie-Infektion assoziiert sein sollen, im ScMHM2-System überprüft.

5.1.3.1 Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (bNOS)

Die verschiedenen Isoformen der NO-Synthase (NOS), bei denen es sich um Homodimere mit einer Größe von ca. 300 kDa handelt, sind für die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) verantwortlich, das auch als EDRF („*endothelium derived relaxing factor*“) bezeichnet wird. Die NO-Synthasen besitzen eine signifikante Ähnlichkeit mit der Cytochrom P450-Reduktase und katalysieren die Umwandlung von L-Arginin in Citrullin und NO.

Eine besondere Isoform, die zerebrale NOS (bNOS) katalysiert die Freisetzung von NO als neuronale Transmittersubstanz im zentralen Nervensystem. Den kritischen Punkt der Aktivitätsregulation stellt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration dar, die eine Interaktion von bNOS mit Calmodulin triggert (Marletta, 1994). Eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führt zu einer Aktivierung der bNOS, ein Vorgang, der durch verschiedene Agonisten bewirkt wird (Nathan und Xie, 1994). Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit dürfte wohl der Ca^{2+} -agonistische Effekt des β -Amyloid-Peptids als „Pendant“ zum PrP^{Sc} besonders bemerkenswert sein (Hu und el Fakahany, 1993). Durch *in vitro* Experimente konnten Zhang *et al.* einen protektiven Effekt der bNOS gegen eine ischämische Schädigung von Neuronen nachweisen (Zhang *et al.*, 1994a).

Zu den reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS, „*reactive oxygen species*“), die bei zahlreichen katalytischen Reaktionen im Organismus entstehen, gehören das Superoxidradikal (O_2^-), Wasserstoffperoxyd (H_2O_2) und das Hydroxylradikal (OH^\cdot). Die Reaktion von NO mit diesen Verbindungen kann sowohl toxischer als auch protektiver Natur sein (Stamler, 1994). In Systemen, in denen die Toxizität von ROS abhängt, kann NO als Kettenabbruchsubstanz dienen und somit Schäden begrenzen helfen. In zellulären Systemen, in denen die NO-Synthese zu apoptotischen Vorgängen beiträgt, wirken sich die Reaktionen des NO mit reaktiven Sauerstoffverbindungen durch eine erhöhte Vulnerabilität für nitrierende Reaktionen, welche die Energiespeicher der Zelle durch Herunterregulation der Poly-ADP-Ribosyltransferase entleeren, toxisch aus (Zhang *et al.*, 1994b).

Die Synthese einer bNOS-spezifischen mRNA in Scrapie-N2a-Zellen ist im Vergleich zu nichtinfizierten N2a-Zellen deutlich erhöht (Ovadia *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die infizierten ScN2a-Zellen im Gegensatz zu den N2a-Zellen in der Westernblot-Analyse anstelle einer bNOS-spezifischen Bande bei 155 kDa, zwei schwächere Banden mit einem niedrigeren Molekulargewicht aufweisen, was auf eine Fehlfaltung des Enzyms hindeutet. Eventuell basiert die nichtphysiologische Faltung auf einer Interaktion mit „*heat-shock*“ Proteinen (z.B. Hsp 73) an unlösliches PrP^{Sc}, die damit für die Faltung anderer zellulärer Proteine wie bNOS nicht mehr zur Verfügung stehen. Unter diesen Umständen könnte es zu einer Fehlfaltung der gehirnspezifischen bNOS und einer dadurch bedingten Veränderung der Wanderungseigenschaften im SDS-Polyacrylamidgel kommen.

Die Ergebnisse der Zeitkinetik-Experimente decken sich mit der Aussage Ovadias, dass in prion-infizierten Neuronen vermehrt unlösliche bNOS gebildet wird, die langsamer abgebaut wird und vermutlich keine enzymatische Aktivität besitzt. Zu Beginn des Passagierungsexperiments ist noch keine bNOS-spezifische Bande zu erkennen. Dies mag auf dem noch asynchronen Wachstum der Zellen beruhen, welches dazu führt, dass die bNOS-Menge unter dem Detektionslimit des ECL-Systems liegt. Die im Laufe weniger Wochen intrazellulär akkumulierende bNOS wird anfangs noch durch eine charakteristische Einzelbande bei 155 kDa repräsentiert, die schließlich hinter einer Doppelbande mit niedrigerem Molekulargewicht zurücktritt. Die Stoffwechselaktivität und damit die Vitalität der Zellen scheinen jedoch wenig beeinträchtigt zu sein, da sich keine Anhaltspunkte für eine erhöhte Apoptoserate infizierter Zellen finden. Bei der Untersuchung der Klone hinsichtlich ihrer bNOS-Expression und dem Versuch, die Menge an nativem bzw. fehlgefaltetem Enzym mit der Menge an PrP^{Sc} zu korrelieren, stellte sich heraus, dass ScMHM2-Klone je nach Ausmaß ihrer PrP^{Sc}-Expression bNOS sowohl in nativer Form (~155 kDa) exprimieren, als auch einen noch höheren Gehalt an unlöslicher bNOS (Doppelbande <155 kDa) aufweisen.

Es bieten sich sicher noch weitere Experimente zur Untersuchung der Regulation der bNOS-Expression in prion-infizierten Zellen an, die aber den Rahmen dieser Dissertation sprengen würden. In der vorliegenden Arbeit ging es vornehmlich darum, das N2a-/MHM2-Zellkulturmodell im Zusammenhang mit der Aufklärung des Mechanismus der Prionerkrankungen auf seine Verwendbarkeit und Vielseitigkeit zu prüfen.

5.1.3.2 Proteinphosphorylierung prion-infizierter MHM2-Zellen

Die 1997 von Tan *et al.* veröffentlichte Arbeit beschreibt den Mechanismus der reaktiven Gliose und der neuronalen Toxizität bei Morbus Alzheimer als eine Tyrosinkinase-abhängige Signalkaskade unter Vermittlung Alzheimer-spezifischer Peptide (β -Amyloid) (Tan *et al.*, 1997). Prion-infizierte Zellen zeigen im Hinblick auf Neurotoxizität und dem morphologischen Bild einer reaktiven Gliose ein dem Morbus Alzheimer ähnelndes Bild.

Es lag daher nahe, das Phosphorylierungsmuster und den zeitlichen Verlauf der Proteinphosphorylierung an Tyrosinresten in Scrapie-infizierten Zellen zu beobachten. Dabei zeigte sich, dass das Phosphorylierungsmuster von der PrP^{Sc}-Produktion der infizierten Zellen abhängig ist. ScMHM2-Klone mit hohem Gehalt an PrP^{Sc} besitzen ein im untersuchten Molekulargewichtsbereich von 10 bis 100 kDa umspannendes ausge-

prägtes Phosphorylierungsmuster. Dagegen fehlen bei Zellklonen mit schwacher PrP^{Sc}-Produktion vor allem Phosphoproteine im niedermolekularen Bereich (< 46 kDa).

Das Zeitkinetik-Experiment bestätigte die Abhängigkeit des Phosphorylierungsmusters von einem synchronisierten Zellwachstum und der akkumulierten Prionmenge: Das anfangs schwach ausgeprägte Phosphotyrosinmuster legte mit jedem Passagierungsschritt an Signalintensität zu.

Kürzlich wurden neuere Daten zu einer durch Prionfragmente induzierten potentiellen Signalübertragungskaskade, die zur Neuroinflammation führt, publiziert. Combs *et al.* vermuten, dass sowohl Prionpeptide als auch fibrilläres β -Amyloid die Tyrosinkinasen Lyn und Syk aktivieren, die ihrerseits den Ca²⁺-Influx in die Zelle regulieren (Combs *et al.*, 1999). Der Calcium-Einstrom stimuliert die PKC und die nachgeschaltete Ca²⁺-sensitive Tyrosinkinase PYK2. Am Ende der Signaltransduktionskette stehen die beiden MAP-Kinasen ERK1 und ERK2, die ihrerseits die Proliferation der Astrocyten, respektive die Neurodegeneration steuern (Hafiz und Brown, 2000).

Jüngste Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe deuten ebenfalls auf eine Beteiligung von PrP^C an der zellulären Signalübertragung hin (Spielhauer und Schatzl, 2001). Es wurden unter anderem die Interaktionspartner Synapsin Ib und das Adapterprotein Grb2 im „*yeast two-hybrid*“-System identifiziert und ihre Interaktion mit PrP^C mittels Immunokopräzipitation überprüft. Insbesondere Grb2 wird als ein möglicher Kandidat für die Regulation des Calciumefflux, dessen Signaltransduktionskaskade hauptsächlich durch Proteinphosphorylierung- und -dephosphorylierungsvorgänge gesteuert wird, angesehen.

Die quantitative und qualitative Veränderung der Phosphorylierungsmuster prion-infizierter Zellen liefert indirekt hilfreiche Anhaltspunkte über das Ausmaß der PrP^{Sc}-Produktion und die Induktion zellulärer Degenerationsprozesse. Möglicherweise lässt sich durch geeignete Substanzen die Signaltransduktionskaskade, die für die fatalen neurodegenerativen Veränderungen verantwortlich ist, blockieren, zumindest aber verlangsamen.

5.1.3.3 14-3-3-„*assay*“

Bis zur Entdeckung zweier 14-3-3-Proteine mit einer Größe von jeweils 30 kDa war die Untersuchung des zerebrospinalen Liquors von Patienten mit Verdacht auf eine Prionerkrankung keine wesentliche Hilfe zur Untermauerung der Diagnose. Diese als „130“ und „131“ bezeichneten Proteine sind im Liquor von Patienten mit Creutzfeldt-Jakob-Krankheit in niedriger Konzentrationen nachweisbar und scheinen hochsensitive und spezifische Marker für diese Krankheit zu sein. Möglicherweise handelt es sich um Abbauprodukte eines hochmolekularen 14-3-3 Proteins. Dies wurde durch die Arbeiten von Hsich *et al.* bekräftigt und hat die Entwicklung eines immunologischen Schnelltests ermöglicht (Hsich *et al.*, 1996).

Die pathophysiologische Rolle der 14-3-3-Proteine ist noch unbekannt. Es sind jedoch hochkonservierte Proteine, die in vielen Spezies von Hefen und Pflanzen über Insekten bis zu den Säugetieren vorkommen und eine Rolle bei der Proteinkinase-abhängigen intrazellulären Signalübertragungsvorgängen zu spielen

scheinen (Ichimura *et al.*, 1988). Man nimmt an, dass 14-3-3-Proteine mit Proteinen, die an Serin- und/oder Threoninresten phosphoryliert sind, interagieren und sie so inaktivieren.

Die Sensitivität des Schnelltests liegt bei der Untersuchung humaner Liquorproben bei 96%. Seine Spezifität erreicht dagegen nur 88%. In 27% der 14-3-3-positiven Proben lagen andere Ursachen wie virale Enzephalitiden (z.B. Infektion mit dem Herpes simplex Virus), zerebrale Infarkte, subarachnoidale Blutungen oder Rett's Syndrome vor. Im Tiermodell lag die Spezifität bei 99%, die Sensitivität bei 87%. Nicht an spongiformen Enzephalopathien erkrankte Tiere zeigten kein 14-3-3-Signal in der Westernblot-Analyse.

Hsich *et al.* nehmen als Grund für die Erhöhung der 14-3-3-Konzentration im Liquor von CJD erkrankten Patienten zelluläre Lecks an, die durch quasi-inflammatorische Vorgänge bedingt sind. Sie erklären damit auch den Nachweis des 14-3-3-Proteins bei Patienten mit Erkrankungen anderer Ätiologie.

Im Hinblick auf das beschriebene Zellkulturmodell ist die Untersuchung des 14-3-3-Proteins anscheinend nur bedingt geeignet. Der Vergleich unterschiedlich stark PrP^{Sc}-exprimierender Scrapie-Klone mittels Westernblot-Analyse zeigt, dass sich dieses Protein bestenfalls als allgemeiner Marker für die Schädigung bzw. den Untergang der prion-infizierten Neuronen eignet, aber keine Aussage über die Höhe des Prion-Titers der Zellen erlaubt. Vor allem in Zellen, die einen geringen Gehalt an PrP^{Sc} aufweisen, besteht offenbar keine Korrelation zwischen PrP^{Sc} und 14-3-3-Expression. Da sich die Konzentration des 14-3-3-Proteins auch im Zeitkinetik-Experiment als eine unabhängige Funktion der Prionexpression erwies, lassen sich keine gesicherten Aussagen über eine vom Signalübertragungsweg, respektive der Vitalität der Zellen abhängige Regulation dieses Proteins treffen.

Letztendlich ist das 14-3-3-Protein nur als allgemeiner Marker für die *in vivo*-Diagnostik mit Zelluntergängen verknüpfter Prozesse im Gehirn geeignet. Als Einzeltest ist dessen Spezifität gering. Aus den genannten Gründen kann sich die klinische Verdachtsdiagnose einer Creutzfeldt-Jakob Erkrankung nicht alleine auf den Nachweis des 14-3-3-Proteins stützen. Aussagen über Erkrankungen an spongiformen Enzephalopathien sind nur in der Zusammenschau mit den klinisch-neurologischen Untersuchungen, EEG und MRT möglich. Die in Deutschland aktuell zugrunde liegenden Kriterien wurden 1997 in der *Biomed-Studie* definiert (Weber *et al.*, 1997b) und werden als Grundlage für die klinische Klassifikation von CJD-Verdachtsfällen von der Deutschen CJD-Surveillance Unit München-Göttingen verwendet.

5.1.3.4 Schlussfolgerung

Die getesteten zellulären Markerproteine 14-3-3, bNOS und NSE, sowie die Untersuchung der Proteinphosphorylierung lieferte im MHM2-System reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse. Die MHM2-Zellen erwiesen sich als geeignet für eine Reihe von Experimenten, die ansonsten in langwierigen Tierversuchen hätten durchgeführt werden müssen.

5.2 Infektion mit Prionen

5.2.1 Reinfektionsexperimente als Vorstufe der *de novo*-Infektion

Als Vorstufe der Infektionsexperimente mit Zelllysaten diene die Reinfektion von ehemals prion-infizierten N2a- und MHM2-Zellen, die ihre Infektion verloren hatten. Dabei sollte überprüft werden, ob die Infektion durch prionhaltiges Zelllysat generell möglich ist.

Ausgehend von den Daten aus Titrationsexperimenten lässt sich ableiten, dass sich in einem 10%igen Zelllysat (aus ca. 10^7 ScMHM2-Zellen) ca. 10^4 ID₅₀ Prionpartikel befinden (Bosque *et al.*, 2000). Bei einer Konzentration von 10^3 ID₅₀ Prionen im Lysat kommt es zu einer Reinfektion von MHM2-Zellen. Das neu gebildete in Detergentien unlösliche PrP ist jedoch verglichen mit den Zellen, die mit einer höheren Priondosis inokuliert wurden, PK-sensitiv. Anstelle des proteaseresistenten PrP^{Sc} wird ein detergensunlösliches, proteasesensitives Intermediat gebildet. Wie sich in den Experimenten zur Neuinfektion von Zellen zeigte, ist diese Form des PrP-Moleküls kein Artefakt der Reinfektion, sondern eine über einige Passagen zu beobachtende Zwischenform, die erhalten bleibt, bis die Infektion verschwindet und nur noch PrP^C gebildet wird, oder es zur persistierenden Bildung von detergensunlöslichem, PK-resistentem PrP^{Sc} kommt.

Ab 10^4 ID₅₀ Prionen im Zelllysat bleibt die Infektion der Zellen über viele Passagen stabil. Wie die zunehmende Intensität der PrP^{Sc}-spezifischen Banden in der Westernblot-Analyse im Verlauf der Passagen zeigt, kommt es zu einer Ausbreitung der Infektion innerhalb der Zellkultur. Vermutlich wird die Infektion nicht nur an die Tochterzellen, sondern durch horizontale Ausbreitung auch an benachbarte Zellen weitergegeben.

Die Ergebnisse der Infektionsversuche sprechen dafür, dass hierbei eventuell Zell-Zell-Kontakte eine Rolle spielen. N2a-Zellen erwiesen sich auch bei einer langfristigen Inkubation mit dem Kulturüberstand aus ScN2a-Zellen als nicht infizierbar. Mögliche Ursachen hierfür sind zum einen die Unlöslichkeit von PrP^{Sc} sowie der geringe Gehalt von in den Überstand abgegebenen Prionpartikeln, die zu einem niedrigen Titer im Zellkulturüberstand führen.

Die Beobachtungen lassen vermuten, dass es eine kritische Konzentration für eine erfolgreiche, persistierende Infektion mit Scrapie-Material gibt, deren Unterschreitung in der Regel nur zu einer transienten Infektion führt. Die Inokulumkonzentration beeinflusst in erster Linie die Persistenz einer Prion-Infektion.

Es ist nicht auszuschließen, dass ehemals infizierte ScMHM2-Zellen zum Zeitpunkt der Reinfektion eine Restmenge an PrP^{Sc} bilden. Anhand „mock“-inokulierter Kontrollzellen konnte gezeigt werden, dass nicht der alleinige Kontakt mit Zellmaterial oder die darauf folgende Passagierung die PrP^{Sc}-Produktion induziert, sondern eine wirkliche *Re*-Infektion mit *de novo*-Synthese von PrP^{Sc} erfolgt.

Für die *de novo*-Synthese des pathologischen Prionproteins spricht auch das transiente Verhalten von detergensunlöslichem PrP, das vier (bei 1% Inokulum) bis sieben Tage (bei 50% Inokulum) nach der Infektion

zunächst verschwindet, um nach der nächsten Passagierung wieder aufzutreten. Es ist anzunehmen, dass das kurz nach Inokulation nachgewiesene, detergensunlösliche PrP dem Inokulum entstammt, dessen Konzentration im Verlauf der Passagierung durch Abbauvorgänge und Verdünnung unter die Nachweisgrenze des ECL-Systems sinkt. Das Wiederauftreten von PrP^{Sc} ist auf die Konversion des endogenen PrP^C zu PrP^{Sc} zurückzuführen.

Die Experimente zum Ausdünnen des Inokulums, zur Ermittlung der Infektionseffizienz und dem Zeitpunkt des Erscheinens des *de novo*-synthetisierten PrP^{Sc} dienten als wichtige Ausgangsparameter für die Neuinfektion von Zellen.

5.2.2 GT1- und MHM2-Zellen sind unterschiedlich gut infizierbar

Die unter Kapitel 4.2.2.1 beschriebenen Experimente belegen, dass sich die verwendeten Zelllinien GT1 und MHM2 hinsichtlich ihrer Suszeptibilität für eine Prion-Infektion unterscheiden. GT1-Zellen können zwar generell infiziert werden (Schatzl *et al.*, 1997), eine persistierende, messbare Infektion von GT1-Zellen durch Inokulation mit Zellysate bzw. Hirnhomogenat war in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht zu erreichen. Obwohl GT1- und MHM2-Zellen eine ähnlich starke PrP^C-Expression aufweisen, konnte die GT1-Zelllinie in diesen Versuchen deutlich schlechter infiziert werden als MHM2-Zellen.

Verglichen mit den Neuroblastomzellen teilen sich GT1-Zellen sehr viel langsamer und erweisen sich hinsichtlich der Kultivierungsbedingungen deutlich anspruchsvoller. Durch die Inokulation mit den relativ toxischen Zell- bzw. Hirnhomogenaten führten diese Bedingungen zu einem raschen Tod der meisten GT1-Zellen und zur Ausdünnung der Kultur, so dass die Zellen mangels Kontakt zu ihren Nachbarn nur sehr langsam wuchsen und die Infektion auch nicht an diese weitergeben konnten. Auch Zellen, die unter mildereren Bedingungen infiziert wurden, konnten trotz Subklonierung nicht persistierend infiziert werden.

5.2.3 *De novo*-Infektion von MHM2-Zellen mit Zellysaten und Hirnhomogenaten

Durch die Einzelzellklonierung wurden ScMHM2-Klone mit einer starken PrP^{Sc}-Produktion selektioniert und für die Herstellung des Inokulums für nachfolgende Infektionsexperimente verwendet. Im Gegensatz zur konventionellen Verfahren, die auf der Homogenisierung prion-infizierter Gehirne basieren, ist die Prionenanreicherung über Zellysate rasch und mit geringem Arbeitsaufwand durchführbar. Da nach der Inokulation von Mäusen mit Prionen – in Abhängigkeit von der verwendeten Mauslinie und dem Prionstamm – bis zum Ausbruch der Krankheit ein Zeitraum von mindestens zwei Monaten (durchschnittlich 150 Tage) vergeht, ist es vorteilhaft, Infektiosität ohne den Umweg über zeitraubende Tierexperimente gewinnen zu können.

Auch im Hinblick auf die ethisch-rechtlichen, finanziellen und vor allem räumlichen Anforderungen, die Tierexperimente stellen, ist die Gewinnung von PrP^{Sc} im Zellkultursystem von erheblichem Vorteil. Zellkultorexperimente bieten sich auch für die Austestung therapeutischer und diagnostischer Verfahren an, um

eine grobe Vorselektion von Substanzen bzw. Messverfahren mit geringerem Aufwand als mit Tierexperimenten durchzuführen. Nicht zuletzt erleichtern die einfache Transfizierbarkeit mit genetischen Konstrukten und die klonale Selektionierung von Zelllinien das Studium der Prion-Infektion auf molekularbiologischer Ebene.

Bei der Verwendung von Hirnhomogenat ist die Menge an akkumulierten Prionen und somit die PrP^{Sc}-Konzentration vom Stadium der Krankheit abhängig. Die Prionmenge pro ml Inokulum ist bei den ScMHM2-Zellen aufgrund der gleichmäßigen PrP^{Sc}-Produktion konstant. Es ist daher leicht, definierte Inokulumkonzentrationen in großer Menge herzustellen und durch einfache Aufbereitungsmethoden die PrP^{Sc}-Menge zu untersuchen. Das gewonnene Zellysate ist aufgrund der Kulturbedingungen steril.

Darüber hinaus ist in einer homogenen Zellpopulation Scrapie-infizierter Neuroblastomzellen eine Bildung von PrP^{Sc}, das nur geringe Schwankungen seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften aufweist, zu erwarten. Die physiologischen Inhomogenitäten der Scrapie-Verteilung im Mäusegehirn, bzw. Schwankungen im Krankheitsverlauf sind ebenfalls für die Inokulumvorbereitung zu berücksichtigende Parameter, die in der Zellkultur hingegen als konstanten Größen zu betrachten sind.

Die durchgeführten Experimente ergaben, dass sich MHM2-Zellen mit einem 10%igen Lysat (entsprechend 10^4 ID₅₀ infektiösen Partikeln) aus ScMHM2-Donorzellen infizieren lassen. Um eine höhere Infektionsrate zu erzielen, wurden die Zellen zumeist mit einem 40% Zellysate inokuliert. Diese hohe Inokulumkonzentration wirkte sich weitaus weniger toxisch auf die N2a Zellen aus als eine Inokulation mit 2%igem murinem Hirnhomogenat.

10%ige Inokula, die aus Hirnhomogenaten terminal kranker Mäuse präpariert wurden, haben eine Konzentration von ca. 10^5 bis 10^7 ID₅₀, was mittels Endpunkttitration an CD-1 Mäusen ermittelt wurde (Eklund *et al.*, 1967; Carp *et al.*, 1994). Eine Inokulation von 1% erwies sich als geeignete Konzentration, um einerseits Zellen effektiv zu infizieren und andererseits durch das Hirnhomogenat hervorgerufene toxische Zellschädigungen auf ein Minimum zu begrenzen. Die Mindestmenge an infektiösen Prionen liegt bei Zellkulturmaterial um etwa ein bis zwei log-Stufen unter der von Hirnhomogenat.

Um die bereits oben angesprochenen, durch die Toxizität der Inokula bedingten, morphologischen Veränderungen zu minimieren, wurden die Parameter für die Inokulationsbedingungen hinsichtlich der Vorbereitung der Zellen, der Wahl des Kulturmediums sowie der zeitlichen Abfolge der Inokulation optimiert. Auf diese Weise konnte die Inkubationszeit mit dem Inokulum relativ kurz gehalten werden.

Bosque *et al.* stellten fest, dass N2a-Zellen gegenüber Prionen aus Hirnhomogenat weniger suszeptibel als für Prionen aus ScN2a-Zellysate sind (Bosque *et al.*, 2000). Als mögliche Ursachen werden diskutiert dass, i) Prionen eine Zell-spezifische Affinität haben, weshalb MHM2-Zellen für homologes MHM2-PrP^{Sc} suszeptibler sind als für PrP^{Sc}, das aus verschiedenen Zelltypen eines Mausgehirns stammt; ii) der tatsächliche Priontiter des Zellysats zwar höher ist als der des Hirnhomogenats, die MHM2-Prionen aber *in vivo* schneller herausverdünnt werden als PrP^{Sc} aus dem Gehirn; iii) Hirnhomogenat einen Prion-inhibitorischen Faktor enthält, der auf Zellen in Kultur stärker wirkt als in *in vivo*-Systemen und daher ihre Infektion er-

schwert, und iv) Prionen aus Hirnhomogenaten unter den im Gehirnparenchym herrschenden Bedingungen effektiver mobilisiert werden als in kultivierten Neuroblastomzellen.

Wie die Klonierungsexperimente unmittelbar nach der Infektion ergaben, ist die Effektivität während der frühen Phase der Infektion mit Hirnhomogenat zunächst gleich oder eher besser als bei Verwendung von Zellysat. Die MHM2-Zellen internalisieren PrP^{Sc}-haltiges Material sehr rasch, so dass eine ein- bis zwei-stündige Inkubation mit dem prionhaltigen Inokulum für eine persistierende Infektion ausreichen sollte. Das belegen die Versuche, bei denen zwei Stunden nach Inokulation mit Scrapie-Hirnhomogenat eine Einzelzellklonierung erfolgte, woraus ein Anteil von 20% (BSE-Lysat) bzw. 50% (79A-Lysat) infizierter Zellen resultierte. Die mit RML-Zellysat inokulierten MHM2-Zellen waren zu ca. 19% infiziert. Unter den gegebenen Bedingungen war bei gleicher Inokulumkonzentration Zellysat zehnmal infektiöser als Hirnhomogenat.

Die Tatsache, dass bei einer Inokulation mit Zellysat nicht mehr Zellen letztlich auch persistierend infiziert wurden (siehe Tabelle 36), spricht gegen die unter ii) angeführten Theorie einer raschen „clearance“ der ScMHM2-Prionen aus Zellysat. Aus demselben Grund kann auch die unter iii) aufgeführte Existenz Prion-inhibitorischer Faktoren im Hirnhomogenat für das MHM2-Zellsystem als nicht zutreffend betrachtet werden.

Zu diskutieren ist einerseits eine anfangs massivere Erstinfektion bei Hirnhomogenat-infizierten Zellen durch eine mindestens den Faktor 10-1000 höhere Inokulumkonzentration. Die Akkumulationsrate der durch Hirnhomogenat inokulierten Prionen liegt unter der Zellproliferationsrate, so dass die Zellen die Prionen im Verlauf ihres Wachstums herausverdünnen können. Verglichen mit Zellysat-infizierten MHM2-Zellen erfolgt somit eine weniger effektive Weitergabe der Infektion. Andererseits könnten die verwendeten Prionenstämme unterschiedliche Infektionskinetiken aufweisen und nicht vergleichbar sein.

5.2.4 Kinetik neuinfizierter Zellen: PrP-Intermediate

Bei der Verwendung von Hirnhomogenaten als Inokulum kann das darin enthaltene PrP^{Sc} mit Hilfe eines PrP-spezifischen Antikörpers von dem in den infizierten Zellen neu gebildeten pathologischen Prionprotein, welches das 3F4-Epitop trägt, unterschieden werden. Auf diese Weise kann die Kinetik der endogenen *de novo*-Synthese des PrP^{Sc} untersucht werden.

PrP^C und PrP^{Sc} besitzen dieselbe Primärstruktur, unterscheiden sich jedoch in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur. Die Konformationsänderung bei der Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} geht mit dem Erwerb von Detergens-Unlöslichkeit und PK-Resistenz einher. Einigen Forschergruppen nehmen an, dass dieser Vorgang ausgehend von endogenem PrP^C, über einen oder mehrere Zwischenschritte, hin zur PrP^{Sc}-Form abläuft. Dazu wurde von Daude *et al.* ein Modellsystem entwickelt (Daude *et al.*, 1997). Nachdem CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary Cells) mit verschiedenen Mutationen und Insertionen des Prn-p-Gens stabil transfiziert worden waren, wurden mit Hilfe von Markierungsexperimenten die physikalisch-chemischen Eigenschaften des neu gebildeten mutierten PrP verfolgt. Die Versuche zeigen modell-

haft, die schrittweise Umwandlung von Pr^{PC} in eine PK-resistente Form. So weist das mutierte PrP kurz nach seiner Translation intermediäre Eigenschaften der Pr^{PC}-Form und der Scrapie Isoform auf. Mit Hilfe von Markierungsversuchen mit ³⁵S-Methionin fand man heraus, dass das mutierte PrP bereits 10 Minuten nach der Translation strukturelle Veränderungen aufweist und nach etwa 30 Minuten in eine unlösliche Form übergeht, die aber noch PK-sensitiv ist. Erst nach mehreren Stunden kommt es zur Proteaseresistenz. Die Ergebnisse können auf den wirklichen Ablauf einer Infektion nicht direkt übertragen werden. Abgesehen davon, dass mutiertes PrP nicht mit Wildtyp-Pr^{PC} zu vergleichen ist, basieren grundsätzliche Unterschiede zum einen auf dem Fehlen des Interaktionspartners Pr^{PSc}. Zum anderen findet die Konversion in eine zunächst detergensunlösliche, später proteaseresistente Form bereits kurz nach Translation im Cytoplasma statt. Das translatierte PrP durchläuft nicht den „normalen“ Weg der Konversion eines Pr^{PC}-Moleküls, das an der Zelloberfläche auf ein infektiöses Pr^{PSc}-Partikel trifft.

Trotzdem lassen sich die unter Kapitel 4.2.3 beschriebenen Ergebnisse mit der hypothetischen Forderung einer schrittweisen Konversion von Pr^{PC} in Pr^{PSc} in Einklang bringen. Aufgrund der zu Beginn der Infektion noch geringen intrazellulären Pr^{PSc}-Menge und der Annahme, dass die „Scrapie-Konvertiermaschine“ in frisch infizierten Zellen erst anlaufen muss, erscheint es denkbar, dass die Konversionsschritte von Pr^{PC} in Pr^{PSc} zeitverzögert und verlangsamt stattfinden. Die Untersuchung frisch infizierter Zellen, die bereits relativ früh nach der Infektion charakteristische Veränderungen aufwiesen, trug zum Verständnis über den Erwerb ihrer Pr^{PSc}-Eigenschaften wie folgt bei:

Elf Tage nach Inokulation der Zellen mit prionhaltigem Material (Zelllysate und Hirnhomogenate verschiedener Prionstämme) war in den infizierten MHM2-Zellen detergensunlösliches PrP nachweisbar. Die PrP-spezifischen Banden, die im Westernblot detektiert wurden, entsprechen hinsichtlich ihrer Molekulargewichte nicht dem typischen N-terminal-trunkierten, unglykosylierten PrP²⁷⁻³⁰ dessen mono- und diglykosylierter Form. Die am schärfsten abgegrenzte, bei allen untersuchten Prionstämmen am schwächsten repräsentierte Bande liegt im Bereich von 23-24 kDa und damit knapp unter der monoglykosylierten Form des PrP²⁷⁻³⁰. Die darüber liegende Bande (27-28 kDa) ist ebenfalls klar abgegrenzt. Im Gegensatz dazu erstreckt sich die der diglykosylierten Form entsprechende Bande relativ inhomogen über einen Bereich von 32-36 kDa teilweise sogar bis etwa 40 kDa.

Weitere Experimente, sowohl mit weiterpassagierten Zellen als auch (unter den oben beschriebenen Infektionsbedingungen) neuinfizierten Zellen, führten zu vergleichbaren Resultaten. Ein falsch positives Ergebnis durch verbliebenes Inokulum war durch Verwendung des 3F4-Antikörpers, der nur das *de novo* synthetisierte 3F4-„getaggte“ PrP der MHM2-Zellen erkennt, auszuschließen. Der polyklonale Antikörper RA-5, der das Prionprotein von Maus und Hamster erkennt, reagierte mit denselben Banden wie zuvor der Hamster-spezifische 3F4-Antikörper. Das spricht für eine Neusynthese von unlöslichem PrP in den infizierten Zellen.

Infizierte MHM2-Zellen, die zwei Stunden nach der Inokulation subkloniert wurden, wiesen ein ähnliches Bandenmuster im Westernblot auf. Zur Charakterisierung ihrer zelltypischen Eigenschaften wurden Einzelzellklone, mit einer hohen Syntheserate des unlöslichen PrP-Intermediates aufwiesen, in einem weiteren

Klonierungsschritt selektiert. Die daraus resultierenden Sc79A-MHM2-Subklone exprimierten die intermediäre Form des PrP, dessen Expression mit der Abgabe von löslichem PrP^C in den Zellkulturüberstand einherging. Das legt die Vermutung nahe, dass die Produktion des PrP-Intermediates von der PrP^C Menge abhängt.

Das entstandene PrP hat intermediäre Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc}: Es ist in Detergentien unlöslich, jedoch sensitiv gegenüber einer Behandlung mit Proteinase K. Das Molekulargewicht der Intermediat-spezifischen Einzelbanden entspricht der N-terminal unverkürzten Form des PrP („full length PrP“). Auffällig ist auch die unscharfe Begrenzung der Bande, die das diglykosylierte PrP repräsentiert und sich über einen Bereich von 32-36 kDa erstreckt. Aufgrund der denaturierenden Bedingungen des Lämmli-Gels, das Interaktionen von Proteinuntereinheiten verhindert, erscheint eine Dimerisierung zweier PrP-Moleküle (Homodimer) bzw. eine Assoziation mit anderen Proteinen in Form eines Heterooligomers unwahrscheinlich. Denkbar ist dagegen, dass es sich um ein Gemisch diglykosylierter PrP-Moleküle handelt, die sich in ihren Zuckerketten unterscheiden oder um unterschiedlich N-terminal verkürzte PrP-Formen.

Nach mehrwöchiger Passage verändern sich die physikalisch-chemischen Eigenschaften des beschriebenen PrP-Intermediats: MHM2-Zellen, die mit dem RML-„strain“ infiziert worden waren, exprimierten detergensunlösliches Prionprotein, dessen Molekulargewicht der bekannten Scrapie-Form entspricht. Mit dem 79A-Erreger infizierte Zellen enthielten ebenfalls detergensunlösliches PrP, das durch vier unscharf abgegrenzte Banden mit Molekulargewichten von ~20 kDa, 26-27 kDa, 28-31 kDa bzw. 35-36 kDa charakterisiert war. Mit BSE infizierte Zellen exprimierten dagegen PrP, dessen Glykosilierungsmuster sich durch zwei kräftige Banden bei 34-37 kDa (diglykosylierte Form) und 26-28 kDa (monoglykosylierte Form) und eine schwächere Bande bei 20 kDa (unglykosylierte Form) auszeichnet.

Das neu gebildete PrP erwies sich in allen Fällen als weitgehend proteaseresistent und wurde durch Behandlung mit Proteinase K auf seinen proteaseresistenten Rumpf („core“) verkürzt, wobei die entstehenden Molekulargewichte der „klassischen“ Scrapie-Form PrP^{Sc} entsprechen. Die PrP^{Sc}-charakteristischen Eigenschaften Detergens-Unlöslichkeit und Proteaseresistenz treffen auch auf das beschriebene PrP-Intermediat zu.

Damit stellt sich die Frage, wie der beobachtete mehrstufige Übergang der PrP^C- in die PrP^{Sc}-Form während der Scrapie-Infektion zu erklären ist.

Nach der Hypothese von Priola *et al.* (Priola *et al.*, 1995) müssen Aggregation und Proteinase K-Resistenz des PrP nicht zwingend miteinander verknüpft sein. Die PK-Resistenz wird hier als ein Scrapie-spezifisches Phänomen aufgefasst, und die Detergens-Unlöslichkeit als eine von der Scrapie-Infektion unabhängige Eigenschaft betrachtet. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass unlösliches PrP in den infizierten Zellen bereits in den ersten Tagen nach der Inokulation gebildet wird. Die Menge an akkumulierendem PrP scheint in den darauf folgenden Wochen nicht signifikant zuzunehmen. Die Proteinase K-Resistenz ist dagegen erst einige Wochen später nachweisbar. Neben der reinen Akkumulation von unlöslichem PrP muss daher auch eine *qualitative* Veränderung der PrP^{Sc}-Aggregate angenommen werden,

die nicht auf dem bloßen Erreichen einer „kritischen“ PrP-Konzentration beruht. Dazu lassen sich mindestens zwei Modelle diskutieren: i) die entstehenden PrP-Aggregate erreichen einen räumlich-strukturellen Zustand, der sie für PK-Verdau unangreifbar macht; eventuell sind die Aggregate mit weiteren Molekülen assoziiert, die deren Stabilität erhöhen; ii) das erst im späteren Verlauf der Infektion gebildete PrP^{Sc}-Molekül besitzt eine andere sterische Konformation als die zu Beginn der Infektion gebildeten Intermediate, die zwar detergensunlöslich, aber PK-sensitiv sind. Im letzteren Fall ließe sich spekulieren, ob dazu Chaperone oder andere akzessorische Proteine, deren Expression erst im Verlauf einer Prion-Infektion induziert wird, eine Rolle spielen.

Die Untersuchungen von Jackson *et al.* an rekombinant exprimiertem PrP unterstützen die Annahme, dass es mehr als zwei lokale energetische Minima der PrP-Konformation gibt, die dem Molekül einen stabilen Zustand ermöglichen (Jackson *et al.*, 1999). Jackson *et al.* nehmen an, dass sich das humane PrP in diesem *in vitro*-System zu Beginn seiner Konversion in ein 40 kDa schweres Intermediat mit erweiterten α -Helices auffaltet. In einem sehr viel langsamer verlaufenden zweiten Schritt kommt es zu einem Rearrangement in eine β -Faltblatt-reiche Zwischenform. Die Halbwertszeit für den Übergang in die PrP^{Sc}-Form liegt bei zwei bis drei Tagen.

Wie bereits erwähnt, bietet das MHM2-Zellsystem die Möglichkeit, Umfaltungsschritte von PrP^C zu PrP^{Sc}, die in frischinfizierte Zellen offenbar verlangsamt ablaufen, *in situ* zu verfolgen und PrP-Moleküle mit intermediären Eigenschaften (PrP^{*}) zu charakterisieren. Die unter Kapitel 5.2.5 diskutierten elektronenmikroskopischen Aufnahmen der PrP^{Sc}-Internalisierung in frischinfizierte Zellen legen die Vermutung nahe, dass die Umwandlung von PrP^C über Intermediate bzw. direkt in die PrP^{Sc}-Isoform entweder auf dem Weg von der Zelloberfläche zu den Lysosomen oder aber in den Lysosomen erfolgt.

Konkretere Aussage über die Natur der PrP-Zwischenformen lassen sich mit den beschriebenen Experimenten nicht machen. Engmaschig gewählte Zeitpunkte nach der Infektion ermöglichen es, eventuell mehrere Übergangsformen zu erfassen. Denkbar wäre auch eine Charakterisierung der Zwischenformen durch Antikörper, die verschiedene Epitope (z.B. N-Terminus) des PrP erkennen und so eine Aussage über eine mögliche N-terminale Prozessierung ermöglichen sowie die Aufreinigung der Intermediate. Schließlich müsste die Infektiosität der Intermediate und des neu entstandenen PrP^{Sc} im Tier- und Zellkulturmodell überprüft werden.

5.2.5 *In situ*-Verfolgung der frühen Infektionsstadien

Neben dem Nachweis des in den infizierten Zellen neu gebildeten PrP^{Sc} stellt die Untersuchung des in die Zellkultur eingebrachten PrP^{Sc} einen weiteren Schwerpunkt der Infektionsexperimente dar.

Wie die Versuche zeigen, wird das prionhaltige Material in die Zellen internalisiert und nach wenigen Passagierungsschritten aus den inokulierten Zellen herausverdünnt, die inzwischen autochthon PrP^{Sc} produzieren (Kapitel 5.2.3). Durch Immunogoldfärbung ultradünner Zellschnitte kann der Weg des im Inokulum enthaltenen PrP^{Sc} mittels Elektronenmikroskop *in situ* verfolgt werden. Im Gegensatz zum Tierexperiment sind bei der Zellkultur keine lang dauernde Aufzucht und aufwendigen Präparation von Gehirn notwendig, es können beliebig viele Kulturschalen parallel angelegt und infiziert und die Zellen in kurzen Zeitabschnitten für die Elektronenmikroskopie verarbeitet werden.

Bis vor kurzem wurde davon ausgegangen, dass die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} im Lysosom stattfindet (Arnold *et al.*, 1995; Vey *et al.*, 1996). Neueren Untersuchungen zufolge ist das zelluläre PrP in relativ dichten Arealen an der Zelloberfläche angeordnet (Madore *et al.*, 1999). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass GPI-verankertes PrP^C im Rahmen des zellulären „turnovers“ in späten Endosomen degradiert wird.

Die Inokulation von MHM2-Zellen mit Lysaten aus ScMHM2-Zellen führt zu einer massiv gesteigerten Endocytoseaktivität, durch die Inokulumpartikel in die Zellen aufgenommen werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass murines PrP^{Sc} ebenfalls hauptsächlich durch Endocytose an „clathrin-coated pits“ internalisiert wird. Der Aufnahmevergung erfolgt sehr rasch. PrP^{Sc} ist bereits 30 Minuten nach Inokulation in endosomalen Kompartimenten nachweisbar. Bis jetzt ist unklar, ob PrP^{Sc} unspezifisch und mehr oder weniger „zufällig“ in die Zellen aufgenommen wird, oder es einen spezifischen Prion-Rezeptor gibt.

Hinweise für eine spezifische Aufnahme von PrP^{Sc} über den so genannten Lamininrezeptor (LR) bzw. dessen Vorläuferprotein (LRP) liefern die Veröffentlichungen aus der Gruppe von S. Weiss (Rieger *et al.*, 1997; Rieger *et al.*, 1999; Gauczynski *et al.*, 2001; Hundt *et al.*, 2001). Bei diesen Arbeiten ist allerdings zu bedenken, dass die im Hinblick auf Lokalisation, Internalisation und Bindungseigenschaften durchgeführten Experimente in aller Regel nicht auf neuronalen Zellen basieren, sondern meist an Insektenzellen bzw. Hamster-Nierenzellen durchgeführt wurden.

Nach einer Stunde ist ein Großteil des aufgenommenen PrP^{Sc} in elektronendichtere Strukturen, die zum lysosomalen Kompartiment gehören, weitertransportiert worden. Innerhalb der Zelle wird das PrP^{Sc} nicht weitertransportiert, es kann daher noch einige Tage nach Inokulation in den Lysosomen nachgewiesen werden.

Entsprechend der Prion-Hypothese ist für die Umfaltung von PrP^C zu PrP^{Sc} der physikalische Kontakt der beiden Moleküle obligat. Vermutlich erfolgt die Konversion von PrP^C in eine proteaseresistente Form bereits auf dem Weg in das lysosomale Kompartiment, bevor es der Degradation unterworfen wird.

5.3 Morphologische Veränderungen in prion-infizierten Zellen

Da sich bei Säugern, die eine Prion-Infektion tragen, im Gehirn krankheitstypische Veränderungen, wie Nervenzellverlust, Spongiformität, Proliferation der Astrogliazellen und Plaqueablagerungen, spezifisch nach anatomischer Struktur, genetischem Hintergrund sowie dem Prion-„*strain*“ manifestieren, war es das Ziel, so wenig Zellschädigung wie möglich durch das Inokulum zu verursachen, um spezifische Effekte des inokulierten PrP^{Sc} beobachten zu können. In „*mock*“-infizierten MHM2-Zellen treten nach wenigen Stunden vereinzelt geringfügige Veränderungen der Zellmorphologie auf, die nach einigen Tagen verschwinden. In Scrapie-infizierten Zellen zeigen sich jedoch auf elektronenmikroskopischer Ebene signifikante, irreversible Veränderungen der Zellstruktur. Diese beobachteten morphologischen Veränderungen beruhen wohl nicht auf Inokulationsartefakten.

Selbst bei geringer Inokulumkonzentration und sehr kurzen Inokulationszeiten (1-2 Stunden) konnten Neuroblastomzellen infiziert werden. Die Vitalität der Zellen wurde durch die milden Inokulationsbedingungen nicht wesentlich beeinflusst. Wie der *XTT*-„*assay*“ zeigte, unterscheiden sich die parallel gezüchteten, nichtinfizierten MHM2-Zellen hinsichtlich ihrer Proliferation nicht signifikant von den „*mock*“- oder Scrapie-inokulierten Zellen. Scrapie-MHM2-Zellen, die mit den drei untersuchten Prionstämmen infiziert worden waren, unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Wachstumsrate nicht.

Der Versuch, apoptotische Vorgänge in Scrapie-infizierten MHM2-Zellen nachzuweisen, zeigte eine geringe, nichtsignifikante Apoptoserate. Die meisten ScMHM2-Zellen sind in der Lage, sich rasch genug zu teilen, um die PrP^{Sc}-Menge nicht auf ein – für die Zellen kritisches – Niveau ansteigen zu lassen. Die beobachteten Zelluntergänge betreffen wohl Zellen, die nicht in der Lage sind, die PrP^{Sc}-Konzentration durch Zellteilung auf einem nicht toxischen Niveau zu halten.

Es wurde bereits früh erkannt, dass Lysosomen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von Prionerkrankungen spielen (Laszlo *et al.*, 1992). In MHM2-Zellen nimmt die Zahl der sekundären Lysosomen nach der Inokulation zu. Mit der Ablagerung des internalisierten PrP^{Sc} findet dort wohl auch eine Akkumulation des *de novo* synthetisierten PrP^{Sc} statt. Es wird vermutet, dass die Zunahme von PrP^{Sc} zu Lecks der lysosomalen Membran und so zur Freisetzung hydrolytischer Enzyme führt. Der Vorgang endet mit der Zerstörung des neuronalen Cytoskeletts und es kommt zur Kondensation des Kernchromatins. Die Vakuolen konfluieren im Lauf der nächsten Stunden, und die zelluläre Ultrastruktur desintegriert (L. Laszlo, persönliche Mitteilung).

Letztendlich kommt es zum Zelltod sowie zur Freisetzung hydrolytischer Enzyme und des PrP^{Sc} in den extrazellulären Raum, so dass benachbarten Zellen die freigesetzten Prionen aufnehmen können. Auf diese Weise würde sich die Infektiosität selbst propagieren.

Im Gegensatz zu den ausgeprägten, spezifischen Läsionen im Gehirn prion-infizierter Säugetiere sind im verwendeten Zellkultursystem nur wenige und uncharakteristische Schädigungen zu beobachten. Die Neurone des Gehirns sind ortsständig, terminal differenziert und teilen sich nicht weiter.

Die Zellen einer permanenten Zelllinie hingegen teilen sich rasch und sind so in der Lage die PrP^{Sc}-Menge zu reduzieren. Es kommt zu einer eher schleichenden Infektion mit nur wenig manifesten neurodegenerativen Veränderungen.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zum Verständnis des Infektionsmechanismus durch Prionen und der Erhaltung der Infektion im Zellkultursystem.

Als Modellsysteme wurden die murine Neuroblastomlinie N2a sowie immortalisierte Hypothalamuszellen (GT1) verwendet. Ein Teil der N2a-Zellen ist persistierend mit dem chimären Maus-Hamster-Maus Konstrukt (MHM2) des Priongens (*Prn-p*) transfiziert.

Das pathogene Prionprotein PrP^{Sc} lässt sich aufgrund der identischen Primärstruktur mit PrP^C über den Nachweis einer partiellen Proteinase K-Resistenz und seiner Detergens-Unlöslichkeit mit Hilfe eines PrP-spezifischen Antikörpers vom endogenen PrP^C unterscheiden. Durch Einzelzellklonierung einer Population von infizierten ScMHM2-Zellen und nachfolgender Westernblot-Analyse konnte eine Infektionsrate prion-infizierter ScMHM2-Zellen von ca. 70% ermittelt werden. Ferner konnte eine konstante Produktion von infektiösem PrP^{Sc} in den ScMHM2-Zellen über zahlreiche Passagen nachgewiesen werden. Die PrP^{Sc}-Expression der Einzelzellen schwankt jedoch im semiquantitativen Vergleich erheblich.

Wesentliche Faktoren, die die Stabilität der Prion-Infektion beeinflussen, stellen so genannte chemische Chaperone dar. In den durchgeführten Experimenten zeigte sich ein deutlicher PrP^{Sc}-Verlust durch Einfrieren der Zellen in DMSO-haltigem Kryomedium.

Die über mehrere Wochen mittels Westernblot untersuchte Expression zellulärer Marker, die *in vivo* mit der Prion-Infektion korreliert sein sollen, wie beispielsweise zerebrale NO-Synthase (bNOS), neuronenspezifische Enolase (NSE) und 14-3-3-Proteinen, führte zu keinen signifikanten Veränderungen.

Die Verfolgung des Phosphorylierungsmusters von Proteinen Scrapie-infizierter Zellen zeigte im Zeitverlauf eine Zunahme der Phosphorylierung von Proteinen im niedermolekularen Bereich (< 46 kDa). Im Zusammenhang mit jüngsten Befunden unserer Arbeitsgruppe, die eine Beteiligung von PrP^C in Signalkaskaden vermuten lassen, liefern die quantitativen und qualitativen Veränderung der Phosphorylierungsmuster indirekt Anhaltspunkte über das Ausmaß der PrP^{Sc}-Produktion und die Induktion zellulärer Degenerationsprozesse.

Das Hauptprogramm der vorliegenden Arbeit galt der Infektion von N2a- und GT1-Zellen mit Scrapie-/prionhaltigen Hirnhomogenaten und Lysaten. Im direkten Vergleich lassen sich die N2a-Zellen deutlich leichter mit Prionen als die GT1-Zellen infizieren. Letztere wären zwar aufgrund ihres ausgeprägteren neuronalen Phänotyps die Zellen der Wahl gewesen, konnten jedoch nicht stabil infiziert werden. Demgegenüber zeichnen sich die N2a-Zellen durch ihre Robustheit gegenüber der Toxizität einer Inokulation mit Prionen aus.

Eine Reinfektion von N2a-Zellen, die zuvor mit prionhaltigem Material infiziert waren, die Infektion aber über zahlreiche Passagen verloren hatten, ist mit einer niedrigen Konzentration des Lysats aus ScMHM2-Zellen von 1% möglich.

Zur Herstellung des Inokulums für Zellysate wurden die zuvor selektierten PrP^{Sc}-hochexprimierenden MHM2-Einzelzellklone lysiert. Des Weiteren wurden Homogenate aus den Gehirnen zweier Scrapie-infizierter Mäuse hergestellt. Insgesamt wurde die Effektivität und das „strain“-spezifische Muster von drei verschiedenen Erregerstämmen (RML, 79A und mausadaptiertem BSE) in Zellkultur verglichen.

Die Inkubationszeiten sind bei allen Erregerstämmen relativ kurz; bereits wenige Wochen nach der Inokulation konnte eine Aussage über den Infektionserfolg getroffen werden. Am erfolgreichsten war die Infektion mit 79A-„strain“, bei dem etwa 50% der Zellen innerhalb von zwei Stunden nach Inokulation infiziert waren (durch Einzelzellklonierung ermittelt). Demgegenüber betrug die Infektionseffizienz des BSE-Erregers nur 20%. Die Zellysate des RML-„strains“ erwiesen sich für die zu infizierenden Zellen als weniger toxisch und waren bei trotz deutlich geringerer infektiöser Dosis gleichermaßen effektiv.

Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs des Infektionsvorgangs ergab, dass PrP^C-Expression und PrP^{Sc}-Akkumulation in den ScN2a-Zellen nicht direkt voneinander abhängen. Gleichmaßen ist auch die Infizierbarkeit von N2a-Zellen nicht direkt mit der PrP^C-Produktion korreliert.

Im Hinblick auf eine mögliche prioninduzierte Aktivierung von Apoptosevorgängen in den infizierten Zellen durch den hochsensitiven Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen (TUNEL) können keine signifikanten Aussagen gemacht werden.

In der frühen Phase der Prion-Infektion von MHM2-Zellen konnte durch verschiedene Präparationsmethoden detergentenunlösliches von PK-resistentem PrP im Westernblot unterschieden werden. Das mit Hilfe eines PrP-spezifischen Antikörpers detektierte Prionprotein weist dabei intermediäre Eigenschaften zwischen PrP^C- und PrP^{Sc}-Form auf. Detergentenunlösliches PrP ist ca. elf Tage nach der Inokulation nachweisbar, besitzt jedoch im Gegensatz zum „klassischen“ PrP^{Sc} die volle Länge ohne Trunkierung des N-Terminus. Zudem ist es nicht proteaseresistent. Klonierungsexperimente ergaben, dass alle Subklone einer solchen Zelle diese PrP-Eigenschaft zeigen. Nach mehrwöchiger Passage weisen die infizierten Zellen PK-resistentes PrP im Sinne des „klassischen“ PrP^{Sc} auf oder verlieren die Infektion wieder.

Die erfolgreiche Untersuchung der frühen Stadien der Infektion mittels Westernblot-Analyse und die hohe Infektionsrate ermutigten zur Zusammenarbeit mit Dr. Lajos Laszlo (Eötvös Universität Budapest). Mit seiner Hilfe gelang die Verfolgung einzelner PrP^{Sc}-Aggregate durch Immunogoldfärbung im Elektronenmikroskop. Auf diese Weise konnte die Aufnahme von PrP^{Sc} durch Endocytose an „clathrin coated pits“ und die weitere Passage in das endosomale Kompartiment in infizierten N2a-Zellen beobachtet werden.

Zusammenfassend ergibt sich aus der Summe der oben gezeigten Experimente: Das N2a-Zellsystem stellt durch seine Robustheit und einfache Handhabung eine hervorragende Grundlage für die Untersuchung der frühen Stadien einer Infektion mit Prionen dar. Stabile Konditionen ermöglichen es, das Infektionsgeschehen reproduzierbar zu gestalten und in kleinstmögliche Einzelschritte zu unterteilen. Im Vergleich zum Tierversuch ermöglicht es eine rasche und zuverlässige Infektion, die Verfolgung und das Monitoring von PrP^{Sc} im zeitlichen Verlauf sowie die Untersuchung infektionsbedingter Strukturveränderungen auf morphologischer und auch molekularer Ebene.

Literaturverzeichnis

1. Alper,T., Cramp,W.A., Haig,D.A., and Clarke,M.C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, **214**, 764-766.
2. Alper,T., Haig,D.A., and Clarke,M.C. (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 278-284.
3. Arnold,J.E., Tipler,C., Laszlo,L., Hope,J., Landon,M., and Mayer,R.J. (1995). The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J. Pathol.*, **176**, 403-411.
4. Back,J.F., Oakenfull,D., and Smith,M.B. (1979). Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry*, **18**, 5191-5196.
5. Bartz,J.C., Bessen,R.A., McKenzie,D., Marsh,R.F., and Aiken,J.M. (2000). Adaptation and selection of prion protein strain conformations following interspecies transmission of transmissible mink encephalopathy. *J Virol.*, **74**, 5542-5547.
6. Basler,K., Oesch,B., Scott,M., Westaway,D., Walchli,M., Groth,D.F., McKinley,M.P., Prusiner,S.B., and Weissmann,C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, **46**, 417-428.
7. Bessen,R.A. (1996). Neurodegenerative Prion Diseases. *Science & Medicine*, 12-19.
8. Bessen,R.A. and Marsh,R.F. (1994). Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol.*, **68**, 7859-7868.
9. Bockman,J.M., Prusiner,S.B., Tateishi,J., and Kingsbury,D.T. (1987). Immunoblotting of Creutzfeldt-Jakob disease prion proteins: host species-specific epitopes. *Ann. Neurol.*, **21**, 589-595.
10. Bolton,D.C., McKinley,M.P., and Prusiner,S.B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, **218**, 1309-1311.
11. Bolton,D.C., Meyer,R.K., and Prusiner,S.B. (1985). Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein. *J Virol.*, **53**, 596-606.
12. Borchelt,D.R., Scott,M., Taraboulos,A., Stahl,N., and Prusiner,S.B. (1990). Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol.*, **110**, 743-752.
13. Borchelt,D.R., Taraboulos,A., and Prusiner,S.B. (1992). Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.*, **267**, 16188-16199.
14. Bosque,P.J. and Prusiner,S.B. (2000). Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection. *J. Virol.*, **74**, 4377-4386.
15. Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
16. Brown,D.R., Schmidt,B., and Kretzschmar,H.A. (1996). Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*, **380**, 345-347.

17. Bruce, M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., and Bostock, C.J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, **389**, 498-501.
18. Butler, D.A., Scott, M.R., Bockman, J.M., Borchelt, D.R., Taraboulos, A., Hsiao, K.K., Kingsbury, D.T., and Prusiner, S.B. (1988). Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J Virol*, **62**, 1558-1564.
19. Carp, R.I., Ye, X., Kascsak, R.J., and Rubenstein, R. (1994). The nature of the scrapie agent. Biological characteristics of scrapie in different scrapie strain-host combinations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **724**, 221-234.
20. Carrell, R.W. and Lomas, D.A. (1997). Conformational disease. *Lancet*, **350**, 134-138.
21. Caughey, B., Raymond, G.J., Ernst, D., and Race, R.E. (1991). N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J Virol*, **65**, 6597-6603.
22. Chatigny, M.A. and Prusiner, S.B. (1980). Biohazards of investigations on the transmissible spongiform encephalopathies. *Rev. Infect. Dis.*, **2**, 713-724.
23. Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J.M., and . (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*, **315**, 331-333.
24. Chiesa, R., Piccardo, P., Ghetti, B., and Harris, D.A. (1998). Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. *Neuron*, **21**, 1339-1351.
25. Clarke, M.C. and Haig, D.A. (1970). Multiplication of scrapie agent in cell culture. *Res. Vet. Sci.*, **11**, 500-501.
26. Clarke, M.C. and Millson, G.C. (1976). Infection of a cell line of mouse L fibroblasts with scrapie agent. *Nature*, **261**, 144-145.
27. Collinge, J. and Rossor, M. (1996). A new variant of prion disease. *Lancet*, **347**, 916-917.
28. Collinge, J., Sidle, K.C., Meads, J., Ironside, J., and Hill, A.F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, **383**, 685-690.
29. Combs, C.K., Johnson, D.E., Cannady, S.B., Lehman, T.M., and Landreth, G.E. (1999). Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of beta-amyloid and prion proteins. *J. Neurosci.*, **19**, 928-939.
30. Come, J.H., Fraser, P.E., and Lansbury, P.T., Jr. (1993). A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *PNAS*, **90**, 5959-5963.
31. Daude, N., Lehmann, S., and Harris, D.A. (1997). Identification of intermediate steps in the conversion of a mutant prion protein to a scrapie-like form in cultured cells. *J Biol. Chem.*, **272**, 11604-11612.
32. Davis-Salinas, J. and Van Nostrand, W.E. (1995). Amyloid beta-protein aggregation nullifies its pathologic properties in cultured cerebrovascular smooth muscle cells. *J Biol. Chem.*, **270**, 20887-20890.
33. Donne, D.G., Viles, J.H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Wright, P.E., and Dyson, H.J. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *PNAS*, **94**, 13452-13457.

34. Eklund,C.M., Kennedy,R.C., and Hadlow,W.J. (1967). Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse. *J. Infect. Dis.*, **117**, 15-22.
35. Elleman,C.J. (1984). Attempts to establish the scrapie agent in cell lines. *Vet. Res. Commun.*, **8**, 309-316.
36. Enari,M., Flechsig,E., and Weissmann,C. (2001). Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *PNAS*, **98**, 9295-9299.
37. Endo,T., Groth,D., Prusiner,S.B., and Kobata,A. (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry*, **28**, 8380-8388.
38. Forloni,G., Angeretti,N., Chiesa,R., Monzani,E., Salmona,M., Bugiani,O., and Tagliavini,F. (1993). Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*, **362**, 543-546.
39. Fu,H., Coburn,J., and Collier,R.J. (1993). The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. *PNAS*, **90**, 2320-2324.
40. Gabizon,R., McKinley,M.P., and Prusiner,S.B. (1987). Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes. *PNAS*, **84**, 4017-4021.
41. Gajdusek,D.C. (1989). Fantasy of a "virus" from the inorganic world: pathogenesis of cerebral amyloidoses by polymer nucleating agents and/or "viruses". *Hematol. Bluttransfus.*, **32**, 481-499.
42. Gauczynski,S., Peyrin,J.M., Haik,S., Leucht,C., Hundt,C., Rieger,R., Krasemann,S., Deslys,J.P., Dormont,D., Lasmezas,C.I., and Weiss,S. (2001). The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J.*, **20**, 5863-5875.
43. Gekko,K. and Koga,S. (1983). Increased thermal stability of collagen in the presence of sugars and polyols. *J. Biochem. (Tokyo)*, **94**, 199-205.
44. Gerlisma,S.Y. and Stuur,E.R. (1972). The effect of polyhydric and monohydric alcohols on the heat-induced reversible denaturation of lysozyme and ribonuclease. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **4**, 377-383.
45. Gibbons,R.A. and Hunter,G.D. (1967). Nature of the scrapie agent. *Nature*, **215**, 1041-1043.
46. Gibson,P.E., Bell,T.M., and Field,E.J. (1972). Failure of the scrapie agent to replicate in L5178Y mouse leukaemic cells. *Res. Vet. Sci.*, **13**, 95-96.
47. Griffith,J.S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature*, **215**, 1043-1044.
48. Gultekin,H. and Heermann,K.H. (1988). The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal. Biochem.*, **172**, 320-329.
49. Hadlow,W.J. (1959). Scrapie and kuru. *Lancet*, **ii**, 289-290.
50. Hafiz,F.B. and Brown,D.R. (2000). A model for the mechanism of astrogliosis in prion disease. *Mol. Cell Neurosci.*, **16**, 221-232.
51. Hegde,R.S., Mastrianni,J.A., Scott,M.R., DeFea,K.A., Tremblay,P., Torchia,M., DeArmond,S.J., Prusiner,S.B., and Lingappa,V.R. (1998). A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science*, **279**, 827-834.
52. Hill,A.F., Desbruslais,M., Joiner,S., Sidle,K.C., Gowland,I., Collinge,J., Doey,L.J., and Lantos,P. (1997a). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, **389**, 448-50, 526.

53. Hill,A.F., Will,R.G., Ironside,J., and Collinge,J. (1997b). Type of prion protein in UK farmers with Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, **350**, 188.
54. Hsiao,K.K., Scott,M., Foster,D., Groth,D.F., DeArmond,S.J., and Prusiner,S.B. (1990). Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science*, **250**, 1587-1590.
55. Hsich,G., Kenney,K., Gibbs,C.J., Lee,K.H., and Harrington,M.G. (1996). The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N. Engl. J Med.*, **335**, 924-930.
56. Hu,J. and el Fakahany,E.E. (1993). beta-Amyloid 25-35 activates nitric oxide synthase in a neuronal clone. *Neuroreport*, **4**, 760-762.
57. Hundt,C., Peyrin,J.M., Haik,S., Gauczynski,S., Leucht,C., Rieger,R., Riley,M.L., Deslys,J.P., Dormont,D., Lasmezas,C.I., and Weiss,S. (2001). Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *EMBO J.*, **20**, 5876-5886.
58. Ichimura,T., Isobe,T., Okuyama,T., Takahashi,N., Araki,K., Kuwano,R., and Takahashi,Y. (1988). Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *PNAS*, **85**, 7084-7088.
59. Ironside,J.W. (1998). Prion diseases in man. *J Pathol.*, **186**, 227-234.
60. Jackson,G.S., Hill,A.F., Joseph,C., Hosszu,L., Power,A., Waltho,J.P., Clarke,A.R., and Collinge,J. (1999). Multiple folding pathways for heterologously expressed human prion protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1431**, 1-13.
61. James,T.L., Liu,H., Ulyanov,N.B., Farr-Jones,S., Zhang,H., Donne,D.G., Kaneko,K., Groth,D., Mehlhorn,I., Prusiner,S.B., and Cohen,F.E. (1997). Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *PNAS*, **94**, 10086-10091.
62. Kaneko,K., Vey,M., Scott,M., Pilkuhn,S., Cohen,F.E., and Prusiner,S.B. (1997a). COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *PNAS*, **94**, 2333-2338.
63. Kaneko,K., Zulianello,L., Scott,M., Cooper,C.M., Wallace,A.C., James,T.L., Cohen,F.E., and Prusiner,S.B. (1997b). Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *PNAS*, **94**, 10069-10074.
64. Kascsak,R.J., Rubenstein,R., Merz,P.A., Tonna-DeMasi,M., Fersko,R., Carp,R.I., Wisniewski,H.M., and Diringer,H. (1987). Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J Virol.*, **61**, 3688-3693.
65. Kimberlin,R.H. (1992). Bovine spongiform encephalopathy. *Rev. Sci. Tech.*, **11**, 347-489.
66. Klebe,R.J. and Ruddle,F.H. (1969). Neuroblastoma: cell culture analysis of a differentiating stem cell system. *J. Cell. Biol.*, **43**.
67. Kramer,M.L., Kratzin,H.D., Schmidt,B., Romer,A., Windl,O., Liemann,S., Hornemann,S., and Kretzschmar,H. (2001). Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J Biol. Chem.*, **276**, 16711-16719.
68. Kretzschmar,H.A. and Dahme,E. (1990). BSE. Die spongiformen Enzephalopathien und die Prionhypothese. *Di. Ärztebl.*, **87**, 1681-1686.

69. Kretzschmar,H.A., Giese,A., Brown,D.R., Herms,J., Keller,B., Schmidt,B., and Groschup,M. (1997). Cell death in prion disease. *J Neural Transm. Suppl*, **50**, 191-210.
70. Kretzschmar,H.A., Prusiner,S.B., Stowring,L.E., and DeArmond,S.J. (1986). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am. J Pathol.*, **122**, 1-5.
71. Kretzschmar,H.A., Tings,T., Madlung,A., Giese,A., and Herms,J. (2000). Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse. *Arch. Virol. Suppl*, 239-249.
72. Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
73. Lansbury,P.T., Jr. (1997). Structural neurology: are seeds at the root of neuronal degeneration? *Neuron*, **19**, 1151-1154.
74. Lasmezas,C.I., Deslys,J.P., Demaimay,R., Adjou,K.T., Lamoury,F., Dormont,D., Robain,O., Ironside,J., and Hauw,J.J. (1996). BSE transmission to macaques. *Nature*, **381**, 743-744.
75. Laszlo,L., Lowe,J., Self,T., Kenward,N., Landon,M., McBride,T., Farquhar,C., McConnell,I., Brown,J., Hope,J., and . (1992). Lysosomes as key organelles in the pathogenesis of prion encephalopathies. *J. Pathol.*, **166**, 333-341.
76. Lin,M.C., Mirzabekov,T., and Kagan,B.L. (1997). Channel formation by a neurotoxic prion protein fragment. *J Biol. Chem.*, **272**, 44-47.
77. Lundberg,K.M., Stenland,C.J., Cohen,F.E., Prusiner,S.B., and Millhauser,G.L. (1997). Kinetics and mechanism of amyloid formation by the prion protein H1 peptide as determined by time-dependent ESR. *Chem. Biol.*, **4**, 345-355.
78. Madore,N., Smith,K.L., Graham,C.H., Jen,A., Brady,K., Hall,S., and Morris,R. (1999). Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *EMBO J.*, **18**, 6917-6926.
79. Manson,J., West,J.D., Thomson,V., McBride,P., Kaufman,M.H., and Hope,J. (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development*, **115**, 117-122.
80. Marletta,M.A. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, **78**, 927-930.
81. Marsh,R.F., Bessen,R.A., Lehmann,S., and Hartsough,G.R. (1991). Epidemiological and experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy. *J Gen. Virol.*, **72 (Pt 3)**, 589-594.
82. McKinley,M.P., Braunfeld,M.B., Bellinger,C.G., and Prusiner,S.B. (1986). Molecular characteristics of prion rods purified from scrapie-infected hamster brains. *J Infect. Dis.*, **154**, 110-120.
83. Naslavsky,N., Stein,R., Yanai,A., Friedlander,G., and Taraboulos,A. (1997). Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol. Chem.*, **272**, 6324-6331.
84. Nathan,C. and Xie,Q.W. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, **78**, 915-918.
85. Oesch,B., Westaway,D., Walchli,M., McKinley,M.P., Kent,S.B., Aebersold,R., Barry,R.A., Tempst,P., Teplow,D.B., Hood,L.E., and . (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, **40**, 735-746.

86. Oltersdorf,T., Fritz,L.C., Schenk,D.B., Lieberburg,I., Johnson-Wood,K.L., Beattie,E.C., Ward,P.J., Blacher,R.W., Dovey,H.F., and Sinha,S. (1989). The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin-II. *Nature*, **341**, 144-147.
87. Ovadia,H., Rosenmann,H., Shezen,E., Halimi,M., Ofran,I., and Gabizon,R. (1996). Effect of scrapie infection on the activity of neuronal nitric-oxide synthase in brain and neuroblastoma cells. *J Biol. Chem.*, **271**, 16856-16861.
88. Pan,K.M., Stahl,N., and Prusiner,S.B. (1992). Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain. *Protein Sci.*, **1**, 1343-1352.
89. Pattison,I.H. (1965). Scrapie in the welsh mountain breed of sheep and its experimental transmission to goats. *Vet. Rec.*, **77**, 1388-1390.
90. Pattison,I.H. and Jones,K.M. (1968). Modification of a strain of mouse-adapted scrapie by passage through rats. *Res. Vet. Sci.*, **9**, 408-410.
91. Perutz,M.F. (1995). Glutamine repeats as polar zippers: their role in inherited neurodegenerative disease. *Mol. Med.*, **1**, 718-721.
92. Perutz,M.F., Johnson,T., Suzuki,M., and Finch,J.T. (1994). Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *PNAS*, **91**, 5355-5358.
93. Peters,J., Miller,J.M., Jenny,A.L., Peterson,T.L., and Carmichael,K.P. (2000). Immunohistochemical diagnosis of chronic wasting disease in preclinically affected elk from a captive herd. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 579-582.
94. Post,K., Pitschke,M., Schafer,O., Wille,H., Appel,T.R., Kirsch,D., Mehlhorn,I., Serban,H., Prusiner,S.B., and Riesner,D. (1998). Rapid acquisition of beta-sheet structure in the prion protein prior to multimer formation. *Biol. Chem.*, **379**, 1307-1317.
95. Priola,S.A., Caughey,B., Wehrly,K., and Chesebro,B. (1995). A 60-kDa prion protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP. *J. Biol. Chem.*, **270**, 3299-3305.
96. Priola,S.A. and Chesebro,B. (1995). A single hamster PrP amino acid blocks conversion to protease-resistant PrP in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *J Virol.*, **69**, 7754-7758.
97. Prusiner,S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, **216**, 136-144.
98. Prusiner,S.B. (1992). Chemistry and biology of prions. *Biochemistry*, **31**, 12277-12288.
99. Prusiner,S.B. (1998). Prions. *PNAS*, **95**, 13363-13383.
100. Prusiner,S.B., Bolton,D.C., Groth,D.F., Bowman,K.A., Cochran,S.P., and McKinley,M.P. (1982). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry*, **21**, 6942-6950.
101. Prusiner,S.B., Scott,M., Foster,D., Pan,K.M., Groth,D., Miranda,C., Torchia,M., Yang,S.L., Serban,D., Carlson,G.A., and . (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, **63**, 673-686.
102. Rabenau,H.F. (1997). Viren oder infektiöse Proteine? - die Erreger der Subakuten spongiformen Enzephalopathien. *Mikrobiologie*, **7**, 165-169.
103. Raeber,A.J., Borchelt,D.R., Scott,M., and Prusiner,S.B. (1992). Attempts to convert the cellular prion protein into the scrapie isoform in cell-free systems. *J Virol.*, **66**, 6155-6163.

104. Raymond,G.J., Hope,J., Kocisko,D.A., Priola,S.A., Raymond,L.D., Bossers,A., Ironside,J., Will,R.G., Chen,S.G., Petersen,R.B., Gambetti,P., Rubenstein,R., Smits,M.A., Lansbury,P.T., Jr., and Caughey,B. (1997). Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature*, **388**, 285-288.
105. Rieger,R., Edenhofer,F., Lasmezas,C.I., and Weiss,S. (1997). The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat. Med.*, **3**, 1383-1388.
106. Rieger,R., Lasmezas,C.I., and Weiss,S. (1999). Role of the 37 kDa laminin receptor precursor in the life cycle of prions. *Transfus. Clin. Biol.*, **6**, 7-16.
107. Riek,R., Hornemann,S., Wider,G., Billeter,M., Glockshuber,R., and Wuthrich,K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature*, **382**, 180-182.
108. Riek,R., Hornemann,S., Wider,G., Glockshuber,R., and Wuthrich,K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.*, **413**, 282-288.
109. Roehm,N.W., Rodgers,G.H., Hatfield,S.M., and Glasebrook,A.L. (1991). An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol. Methods*, **142**, 257-265.
110. Saborio,G.P., Permanne,B., and Soto,C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, **411**, 810-813.
111. Schatzl,H.M., Laszlo,L., Holtzman,D.M., Tatzelt,J., DeArmond,S.J., Weiner,R.I., Mobley,W.C., and Prusiner,S.B. (1997). A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J. Virol.*, **71**, 8821-8831.
112. Schmechel,D., Marangos,P.J., Zis,A.P., Brightman,M., and Goodwin,F.K. (1978). Brain endolases as specific markers of neuronal and glial cells. *Science*, **199**, 313-315.
113. Scott,M., Foster,D., Mirenda,C., Serban,D., Coufal,F., Walchli,M., Torchia,M., Groth,D., Carlson,G., DeArmond,S.J., and . (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell*, **59**, 847-857.
114. Scott,M.R., Köhler,R., Foster,D., and Prusiner,S.B. (1992). Chimeric prion protein expression in cultured cells and transgenic mice. *Protein Sci.*, **79**, 986-997.
115. Scott,M.R., Safar,J., Telling,G., Nguyen,O., Groth,D., Torchia,M., Koehler,R., Tremblay,P., Walther,D., Cohen,F.E., DeArmond,S.J., and Prusiner,S.B. (1997). Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice. *PNAS*, **94**, 14279-14284.
116. Scott,M.R., Will,R., Ironside,J., Nguyen,H.O., Tremblay,P., DeArmond,S.J., and Prusiner,S.B. (1999). Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *PNAS*, **96**, 15137-15142.
117. Shyng,S.L., Huber,M.T., and Harris,D.A. (1993). A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol. Chem.*, **268**, 15922-15928.
118. Sigurdsson,B. (1954). *Br. Vet. J.*, **110**, 341-354.
119. Soto,C., Saborio,G.P., and Anderes,L. (2002). Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends Neurosci.*, **25**, 390-394.
120. Spielhaupter,C. and Schatzl,H.M. (2001). PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, **276**, 44604-44612.

121. Stahl,N., Borchelt,D.R., Hsiao,K., and Prusiner,S.B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*, **51**, 229-240.
122. Stamler,J.S. (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, **78**, 931-936.
123. Tagliavini,F., Prelli,F., Verga,L., Giaccone,G., Sarma,R., Gorevic,P., Ghetti,B., Passerini,F., Ghibaudi,E., Forloni,G., and . (1993). Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils in vitro. *PNAS*, **90**, 9678-9682.
124. Tan,S., Maher,P., and Schubert,D. (1997). The role of protein phosphorylation in beta amyloid toxicity. *Brain Res.*, **765**, 159-163.
125. Taraboulos,A., Scott,M., Semenov,A., Avrahami,D., Laszlo,L., Prusiner,S.B., and Avraham,D. (1995). Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol.*, **129**, 121-132.
126. Taraboulos,A., Serban,D., and Prusiner,S.B. (1990). Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. *J Cell Biol.*, **110**, 2117-2132.
127. Tatzelt,J., Prusiner,S.B., and Welch,W.J. (1996). Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J*, **15**, 6363-6373.
128. Telling,G.C., Scott,M., Mastrianni,J., Gabizon,R., Torchia,M., Cohen,F.E., DeArmond,S.J., and Prusiner,S.B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell*, **83**, 79-90.
129. Vey,M., Pilkuhn,S., Wille,H., Nixon,R., DeArmond,S.J., Smart,E.J., Anderson,R.G., Taraboulos,A., and Prusiner,S.B. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *PNAS*, **93**, 14945-14949.
130. Wadsworth,J.D., Jackson,G.S., Hill,A.F., and Collinge,J. (1999). Molecular biology of prion propagation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **9**, 338-345.
131. Wang,S., Rosengren,L.E., Karlsson,J.E., Stigbrand,T., and Haglid,K.G. (1990). A simple quantitative dot-immunobinding assay for glial and neuronal marker proteins in SDS-solubilized brain tissue extracts. *J Neurosci. Methods*, **33**, 219-227.
132. Weber,T. and Aguzzi,A. (1997a). The spectrum of transmissible spongiform encephalopathies. *Intervirology*, **40**, 198-212.
133. Weber,T., Otto,M., Bodemer,M., and Zerr,I. (1997b). Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease and related human spongiform encephalopathies. *Biomed. Pharmacother.*, **51**, 381-387.
134. Weissmann,C. (1996). Prionen, Neuartige Krankheitserreger. *Naturw. Rdsch.*, **06/1996**, 211-214.
135. Wells,G.A., Scott,A.C., Johnson,C.T., Gunning,R.F., Hancock,R.D., Jeffrey,M., Dawson,M., and Bradley,R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, **121**, 419-420.
136. Wetsel,W.C., Eraly,S.A., Whyte,D.B., and Mellon,P.L. (1993). Regulation of gonadotropin-releasing hormone by protein kinase-A and -C in immortalized hypothalamic neurons. *Endocrinology*, **132**, 2360-2370.
137. Wildegger,G., Liemann,S., and Glockshuber,R. (1999). Extremely rapid folding of the C-terminal domain of the prion protein without kinetic intermediates. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 550-553.

-
138. Wille,H., Michelitsch,M.D., Guenebaut,V., Supattapone,S., Serban,A., Cohen,F.E., Agard,D.A., and Prusiner,S.B. (2002). Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *PNAS*, **99**, 3563-3568.
 139. Williams,E.S. (2002). The transmissible spongiform encephalopathies: disease risks for North America. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.*, **18**, 461-473.
 140. Zerr,I., Bodemer,M., and Weber,T. (1997). The 14-3-3 brain protein and transmissible spongiform encephalopathy. *N. Engl. J Med.*, **336**, 874-875.
 141. Zhang,Z.G., Chopp,M., Gautam,S., Zaloga,C., Zhang,R.L., Schmidt,H.H., Pollock,J.S., and Forstermann,U. (1994a). Upregulation of neuronal nitric oxide synthase and mRNA, and selective sparing of nitric oxide synthase-containing neurons after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res.*, **654**, 85-95.
 142. Zhang,Z.G., Chopp,M., Maynard,K.I., and Moskowitz,M.A. (1994b). Cerebral blood flow changes during cortical spreading depression are not altered by inhibition of nitric oxide synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **14**, 939-943.

Anhang

Abkürzungen

A	Ampère	ORF	offener Leserahmen („ <i>open reading frame</i> “)
AP	Alkalische Phosphatase	OsO ₄	Osmiumtetroxid
APS	Ammoniumpersulfat	p	Pico (10 ⁻¹²)
AS	Aminosäure	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	PBS	Phosphatgepufferte Saline
BAA	N,N'-Methylenbisacrylamid	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
b	Basen	PIPLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
bp	Basenpaare	PK	Proteinase K
BSA	Rinderserumalbumin („ <i>bovine serum albumin</i> “)	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
bzw.	beziehungsweise	P/S	Penicillin/Streptomycin
°C	Grad Celsius	PVDF	Polyvinylidendifluorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonuklein- säure	RNA	Ribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	rpm	Umdrehungen pro Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid	RT	Raumtemperatur
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
DOC	Desoxycholsäure	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick end labelling</i>
EM	Elektronenmikroskop	U	Unit(s), Enzymeinheit
ER	Endoplasmatisches Retikulum	u.a.	unter anderem
EtOH	Ethanol	V	Volt
FCS	fötale Kälberserum („ <i>fetal calf serum</i> “)	Vol.	Volumen
FHS	fötale Pferdeserum („ <i>fetal horse serum</i> “)	v/v	Volumen pro Volumen
g	Gramm, auch Erdbeschleunigung	W	Watt
GPI	Phosphatidylinositolglykolipid	wt	Wildtyp
GdnSCN	Guanidiniumisothiocyanat	w/v	Gewicht pro Volumen
h	Stunde	x	Vielfaches von
ID	infektiöse Dosis	XTT	Natrium-3'-[1-[(phenylamino)carbo- nyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6- nitro) benzolsulfonsäurehydrat
k	Kilo		
kb	Kilobasenpaare		
kDa	Kilodalton		
μ	Mikro (10 ⁻⁶)		
M	molar		
mA	Milliampère		
MEM	Modified Eagle's Medium		
ml	Milliliter		
mM	millimolar		
mU	Milliunit(s), Enzymeinheit		
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure		
n	Nano (10 ⁻⁹)		
NaOH	Natriumhydroxid		
NaOCl	Natriumhypochlorit		
NGF	neuronaler Wachstumsfaktor („ <i>nerve growth factor</i> “)		
NO	Stickstoffmonoxid („ <i>nitric oxide</i> “)		
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase		

Eigene Veröffentlichungen

Publikationen

1. Schätzl,H.M., Gilch,S., Scelsi,M., Westner,I. and Prusiner,S.B. (1997). Prion Diseases: cell culture models for the study of pathogenesis. *Biotest Bull.* **5**,367-368
2. Goebel,F.D. and Westner,I. (2001). Metabolic disorders and lipodystrophy. Adverse effects of antiretroviral therapy. *MMW Fortschr Med.* 2001 Apr 2; **143** Suppl 1:40-4.
3. Petzold,G.C., Westner,I.M., Windl,O., Landeghem,F.K.H., Köhler,W., Einhäupl,K.M., Kretzschmar,H.M. and Valdueza,J.M. (2003). Creutzfeldt-Jakob disease in a young person – variant or sporadic? submitted to *Lancet Neurology*.
4. Michl,G.M., Eberle,J., Westner,I.M. and Goebel,F.D. (2003). Hepatitis B seroconversion under HAART including lamivudine in a HBV-HIV coinfecting patient. submitted to *AIDS*.

Kongressbeiträge

1. Schätzl, H.M., Gilch, S., Scelsi, M., Westner, I. and Prusiner, S.B. (1997). Prion-Erkrankungen: Zellkulturmodelle zum Studium der Pathogenese. Vortrag Jahresversammlung der Gesellschaft für Virologie.
2. Westner, I., Wopfner, F., Gilch, S., Spielhauer, C., Laszlo, L. and Schätzl, H.M. (1997). Cell culture models for the study of early moments of prion infection. Posterpräsentation Großhadern Research Festival.
3. Westner, I., Wopfner, F., Gilch, S., Spielhauer, C., Laszlo, L. and Schätzl, H.M. (1998). Cell culture models for the study of early moments of prion infection. Posterpräsentation Jahresversammlung der Gesellschaft für Virologie.
4. Gilch, S., Westner, I., Spielhauer, C., Groschup, M. and Schätzl, H.M. (1998). Suramin reversibly uncouples PrP^C from PrP^{Sc} biogenesis and generates a potential prion protein conversion intermediate. Posterpräsentation Jahresversammlung der Gesellschaft für Virologie
5. Westner, I.M., Weber, P. und Kretzschmar, H.A. (2002). Infektiositätsvermittlung in Zellkultur durch metallgebundenes PrP^{Sc}. Posterpräsentation 1. Jahresversammlung der deutschen TSE-Plattform

Danksagung

Allen voran danke ich Herrn Prof. Dr. Hermann M. Schätzl für Überlassung des Themas, die Betreuung meiner Arbeit, die Vermittlung wissenschaftlicher Arbeitstechnik und seine ewig währende Geduld.



Herrn Prof. Dr. Ulrich Koszinowski danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.



Ich danke Hermanns „*Mad Cows*“ für die produktive Zusammenarbeit und die großartige Arbeitsatmosphäre: Vor allem Sabine Gilch für die zahlreichen Techniken, die ich von ihr lernen konnte und ihre stetige Unterstützung. Meinen Mitdoktoranden Franziska Wopfner, Georg Weidenhöfer, Marco Scelsi und Christian Spielhauer danke ich für ihre Kollegialität, hilfreichen Beistand und ihre gute Laune.



Besonderer Dank geht an Petra Weber und Jürgen Haas für Korrekturlesen und „*moral support*“.



Des weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Lajos Laszlo für die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen und seine wissenschaftlichen Diskussionsbeiträge bedanken.



Dank an meine Eltern. Für alles.



Ich widme diese Arbeit meiner Frau Yumi.

Lebenslauf

Name: Westner, Ingo Michael

Geburtsdatum: 03. August 1973 in Prien

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: verheiratet mit Yumi Yamamoto, geb. 24.09.1968, geborene Yamamoto

Vater: Johann Westner

Mutter: Marianne Westner, geborene Angermeier

1979 – 1992: Grundschule Neubeuern

1992 – 1999: Ignaz-Günther-Gymnasium, Rosenheim

Mai 1992 : Abitur

November 1992: Beginn des Studiums der Medizin an der Universität München

August 1994: Ärztliche Vorprüfung

März 1996: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

März 1998: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Oktober 1999: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

18. Juli 2001: Approbation

Famulaturen: Kreiskrankenhaus Bad Aibling (Innere Medizin)
Laborgemeinschaft Bavaria (Labormedizin)
Kyoto University Hospital, Japan (Chirurgie)

Praktisches Jahr: Kyoto University Hospital, Japan (Chirurgie)
Klinikum Großhadern (Innere Medizin)
Klinikum Großhadern (Anästhesie)

Arzt im Praktikum: Max von Pettenkofer-Institut der LMU (Virologie)
Poliklinik der LMU (Innere Medizin)

Assistenzarzt: Institut für Neuropathologie der LMU (Neuropathologie)