

Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Standort Tübingen

Eingereicht über das Institut für Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Bedeutung der Glykosylierung für die Pathogenese der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
ERDMUTE NEUENDORF

Gießen 2003

Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Standort Tübingen

Betreuer: PD Dr. M.H. Groschup

Eingereicht über das Institut für Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. H.-J. Thiel

Bedeutung der Glykosylierung für die Pathogenese der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
ERDMUTE NEUENDORF geb. DIEHL
Tierärztin aus Schopfheim

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan : Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

1. Berichterstatter : PD Dr. M.H. Groschup

2. Berichterstatter : Prof. Dr. H.-J. Thiel

Tag der mündlichen Prüfung: 02. August 2002

Diese Arbeit entstand mit Hilfe der Europäischen Förderung durch das Projekt BIOMEDII.
Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Veranstaltungen vorgestellt:
Biomed-Treffen in Kreta, Griechenland (1998); Vortrag
Biomed-Treffen in Santorini, Griechenland (1999); Vortrag
Biomed-Treffen in Lech, Österreich (2000); Vortrag

Diehl, E., Saalmueller, A., Pfaff, E. und M.H. Groschup (1999) Analysis of PrP glycosylation mutants in tissue culture. Symposium on Characterization and Diagnosis of Prion Diseases in Animals and Man, Tübingen, Poster

Abkürzung

A	Adenin
AA	Aminosäure
A. bidest.	bidestilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
Bp	Basenpaare
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
C	Cytosin
°C	Grad Celcius
CHO	Chinese hamster ovary
CJD	Creutzfeldt-Jakob Disease
CMV	Zytomegalie-Virus
CO ₂	Kohlendioxid
C-terminal	Carboxy-terminal
CWD	Chronic Wasting Disease
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
Endo H	Endoglykosidase H
env	Gen für glykosylierte Hüllproteine
ER	Endoplasmatisches Retikulum

EtOH	Alkohol
FACS	Fluorescent activated cell sorting; Durchflusszytometrie
FCS	Fetal calf serum; Fötales Kälberserum
FDC	follicular dendritic cells, follikulär dendritische Zellen
FFI	Fatale (tödliche) familiäre Insomnie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie
G	Guanin
g	Gravitationskonstante
gag	Strukturprotein-Gen
G α M	goat-anti-mouse
G α R	goat-anti-rabbit
GPI	Glykophosphatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
i.c.	intrazerebral
Ig	Immunglobulin
I.U.	International Unit; internationale Einheit
kb	Kilobasenpaare
mAk	Monoklonaler Antikörper
M	Molar; Mol/liter
mA	Milliampere
MEM	Minimal Essential Medium
mM	Millimolar
Mus	Maus
mU	Milliunit; Millieinheit
NEAA	Non Essential Amino Acids (nicht essentielle Aminosäuren)
nt	nicht translatiert
N-terminal	Amino-terminal

N2a	Maus-Neuroblastomzellen
OD	Optische Dichte
ORF	Open-Reading-Frame; Offener Leserahmen
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pmol	Picomolar
PIPLC	Phosphatidylinosit-Phospholipase C
PJ	Propidiumjodid
PK	Proteinase K
pmol	Picomolar
PNGase F	N-Glykosidase F
PO	Peroxidase
pol	Gen für die Reverse Transkriptase
PrP	Prionprotein
Prnp	Prionprotein-Gen
Prnpa	Prionprotein-Gen (i.d.R. assoziiert mit verkürzter Inkubationszeit)
Prnpb	Prionprotein-Gen (i.d.R. assoziiert mit verlängerter Inkubationszeit)
PrP ^{Sc}	PrP Scrapie Infektiöses Prionprotein;
PrP ^{sen}	Proteinase K-sensitives Prionprotein; zelluläres Prionprotein
PrP ^{res}	Proteinase K-resistentes Prionprotein
PrP [%]	Prionprotein-„Knock-out“
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Ra	Rabbit
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Basen Guanin und Cytosin
SFF	Friend Spleen Focus Forming Virus

SOE	Splicing by overlap extension
S-PO	Streptavidin-Peroxidase
SPF	Spezifisch pathogenfrei
S-S	Disulfid
T	Thymin
TME	Transmissible Mink (Nerz) Enzephalopathie
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
U	Unit (Enzymeinheit)
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
vCJD	new-variant-CJD; (neue Variante der CJD)
VT	Versen-Trypsin
W	Basen Adenin und Thymin
Wt	Wildtyp
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
Zeo	Zeocin
ZNS	Zentrales Nervensystem

Aminosäuren (Ein- bzw. Drei-Buchstaben-Kode)

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
D	Asp	Asparaginsäure	L	Leu	Leucin	T	Thr	Threonin
E	Glu	Glutaminsäure	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin	W	Trp	Tryptophan
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin
H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin			

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE)	1
1.1.1	TSE beim Tier: Scrapie, BSE, CWD, TME, FSE und weitere prion- protein-assoziierte neurodegenerative Krankheiten	1
1.1.2	TSE beim Menschen: CJD, vCJD, Kuru, FFI und GSS	6
1.2	Die Pathogenese der TSE	9
1.2.1	Molekulare Pathogenese der TSE	10
1.2.2	Biologische Pathogenese der TSE	11
1.3	Das Prionprotein	15
1.3.1	Die Struktur von PrP	15
1.3.2	Das PrP-Gen (Prnp)	15
1.3.3	Prozessierung des primären Translationsproduktes	16
1.3.4	Die Glykosylierung von PrP	18
1.3.5	PrP als Zellmembranprotein	21
1.3.6	Die Funktion von PrP	22
1.3.7	Doppel (Dpl) - Der PrP-Doppelgänger	23
1.4	Die TSE: Speziesbarriere und Vorkommen von Stämmen	24
1.4.1	Speziesbarriere	24
1.4.2	Stämme	25
1.5	Fragestellung und Ziel der Arbeit	26
2	Material	29
2.1	Geräte	29
2.2	Chemikalien	31
2.3	Enzyme	34
2.4	Antibiotika und Hormone	35
2.5	Verbrauchsmaterial	36
2.6	Plasmide	37
2.7	Bakterien	37
2.8	Antikörper, Antiseren, Konjugate	38

2.8.1	Antikörper	38
2.8.2	Antiseren	39
2.8.3	Konjugate	40
2.9	Medien	41
2.9.1	Bakterienkultur	41
2.9.2	Zellkultur	41
2.9.3	Mikroinjektion	42
2.10	Puffer und Lösungen	44
2.10.1	Standardpuffer	44
2.10.2	Lösungen und Puffer für „Miniprep“ und DNA-Isolierung	45
2.10.3	Lösungen und Puffer für Zellkultur	45
2.10.4	Agarose-Gel-Elektrophorese: Lösungen, Puffer und Längenmarker	46
2.10.5	Puffer zur Lyse und Homogenatherstellung	47
2.10.6	Puffer zum Verdau mit PNGase F und Endo H	47
2.10.7	Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie	48
2.10.8	SDS-PAGE und Westernblot: Puffer, Lösungen und Molekulargewichts- marker	48
2.10.9	Puffer und Lösungen für Disulfidtest	49
2.10.10	Lösungen für Sequenzierung	50
2.10.11	Puffer und Lösungen für Immunpräzipitation	50
2.10.12	Puffer und Lösungen zur Aufreinigung von Primern	51
2.10.13	Komplettsysteme (Kits)	52
2.10.14	Zellen und Inokulate	52
2.11	Arbeiten mit infektiösem Material	53
2.11.1	Arbeiten mit Scrapie- und BSE-Material	53
2.11.2	Arbeiten mit dem Retrovirussystem	53
2.12	Tiere und Tierhaltung	54
2.12.1	Tiere	54
2.12.2	Tierhaltung	54
2.12.3	Narkose	55
2.13	Computer und Software	55

3 Methoden	57
3.1 Molekularbiologische Methoden	57
3.1.1 Gewinnen von DNA	57
3.1.2 Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren	60
3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	61
3.1.4 Sequenzierung von DNA	69
3.2 Bakterienkultur	70
3.2.1 Anzucht von E. coli-Stämmen	70
3.2.2 Transformation	71
3.2.3 Herstellung kompetenter Bakterien	71
3.2.4 Lagerung von Bakterienkulturen	72
3.3 Zellkultur	72
3.3.1 Zellkultivierung	72
3.3.2 Klonierung von Zellen	73
3.3.3 Bestimmung der Anzahl lebender Zellen	73
3.3.4 Transfektion von Zellen	74
3.3.5 Ernte und Konservierung von retrovirushaltigem Zellüberstand	75
3.4 Konversionsexperiment in permanent scrapie-infizierten Maus-Neuroblastomzellen (ScN2a-Zellen)	76
3.5 Proteinbiochemische Verfahren	77
3.5.1 Herstellung von Homogenaten	77
3.5.2 Fällung und Vorbehandlung von Protein	78
3.5.3 Enzymatische Behandlung der Proteine	78
3.5.4 Sonstige analytische Verfahren	80
3.5.5 Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	80
3.5.6 Oberflächenbiotinylierung	82
3.5.7 Nachweis von Disulfidbrücken	83
3.6 Immunochemische Verfahren	83
3.6.1 Westernblot	83

3.6.2	Durchflusszytometrische Analysen (FACS; Fluorescent activated cell sorting)	84
3.6.3	Immunpräzipitation	86
3.6.4	Immunfluoreszenz	87
3.7	Herstellung und Zucht transgener Mäuse	88
3.7.1	Generierung transgener Mäuse	88
3.8	Infektionsversuche	90
3.8.1	Infektion von Zellkulturen	90
3.8.2	Infektion von Versuchstieren	90
4	Ergebnisse	93
4.1	Ergebnisse aus Zellkulturarbeiten	93
4.1.1	Herstellung und Charakterisierung verschiedener monoglykosylierter PrP-Mutanten	93
4.1.2	Herstellung einer unglykosylierten Mutante	96
4.1.3	Vergleich der Maus-PrP ^{sen} -Mutanten T182N, T182N/T198A mit den in der Literatur beschriebenen T182A-, T198A- und T182A/T198A-Mutanten: Verhalten in verschiedenen Zelllinien	101
4.1.4	Konversionsexperiment in permanent scrapie-infizierten ScN2a-Zellen	117
4.1.5	Nachweis von Disulfidbrücken	127
4.1.6	Infektion von transduzierten N2a-Zellen mit verschiedenen Scrapiestämmen	129
4.1.7	Vorhersage der Proteinstruktur	131
4.1.8	Tabellarische Zusammenfassung	136
4.2	Ergebnisse aus dem transgenen Tiermodell	137
4.2.1	Herstellung der Plasmide	137
4.2.2	Überprüfung der Plasmide in Zellkultur	139
4.2.3	Generierung, Nachweis, Vitalität und Zucht transgener Mäuse (Mikroinjektion, Vitalität und Vermehrung der Foundertiere)	142

4.2.4	Westernblotuntersuchung zur Bestimmung der PrP-Expressionslevel im Gehirn	148
4.2.5	Westernblot-Untersuchung zur Bestimmung der PrP-Expression in verschiedenen Organen	152
4.2.6	Untersuchung der Kopienzahl	152
4.2.7	Inokulation der Mäuse mit Scrapiestämmen und BSE	153
4.2.8	Tabellarische Auflistung der transgenen Mauslinien	156
4.2.9	Tabellarische Zusammenfassung der transgenen Mauslinien	163
5	Diskussion	165
5.1	Zellkulturarbeiten	166
5.1.1	Charakterisierung von Erkennungssequenz-mutiertem PrP	166
5.1.2	Konversion von Erkennungssequenz-mutiertem PrP in ScN2a-Zellen	173
5.1.3	Infektion von N2a-Zellen, die Erkennungssequenz-mutiertes PrP ex- primieren	177
5.2	Transgenes Tiermodell	179
5.2.1	Überprüfung der Expression von Erkennungssequenz-mutiertem PrP unter der Kontrolle des Prionprotein-Promotors in Zellkultur	180
5.2.2	Untersuchung der transgenen Mäuse	180
6	Zusammenfassung	187
7	Summary	191

1 Einleitung

1.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE)

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien umfassen eine Gruppe tödlich verlaufender, neurodegenerativer Krankheiten, die bei Tieren und Menschen auftreten. Unter natürlichen Bedingungen werden nach einer langen Inkubationszeit zentralnervöse Symptome wie Koordinationsstörungen und Demenz beobachtet, in deren Folge immer der Tod eintritt. Neuropathologische Untersuchungen des Gehirns ergeben ein weitgehend einheitliches Bild, das durch den Untergang der Neuronenzellpopulation, daraus resultierender Vakuolisierung und reaktiver Astrozytose gekennzeichnet ist. Immunhistologisch kann die Akkumulation eines Proteins (Prionprotein) nachgewiesen werden; daher auch der Name Prionerkrankung. Sowohl klassische Erreger als auch nackte DNA oder RNA werden nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft als Krankheitsursache ausgeschlossen. In Abhängigkeit von der Wirtsspezies und der Pathologie werden die TSE unterschiedlich bezeichnet.

1.1.1 TSE beim Tier: Scrapie, BSE, CWD, TME, FSE und weitere prionprotein-assoziierte neurodegenerative Krankheiten

TSE-Erkrankungen der Tiere sind im Gegensatz zur TSE des Menschen immer infektiöser Genese. Autochthone Herde wurden bislang nur bei Scrapie und CWD beobachtet. Alle anderen Krankheiten stehen im direkten Zusammenhang mit der Aufnahme von kontaminierten Futtermitteln.

Scrapie bei Schaf und Ziege Die Scrapie bei Schaf und Ziege stellt den Prototyp der TSE-Erkrankungen dar. Beschrieben wurde sie erstmals 1732 bei Schafen (McGowan 1922) und aufgrund der unbekannt Genese lange Zeit mit deskriptiven Namen belegt (Greig 1950). Die Klinik ist im typischen Fall gekennzeichnet durch starken Juckreiz (to scrape: kratzen), Ataxien (Traberkrankheit), Tremor (la tremblante: Zittern) und Übererregbarkeit. Im Endstadium tritt der völlige Koordinationsverlust ein, und die Tiere liegen fest. Es werden jedoch auch klinische Fälle beschrieben, bei denen der Juckreiz fehlt und Apathie im Vordergrund steht. Scrapie kommt weltweit vor. Lediglich Aus-

tralien und Neuseeland werden als scrapiefrei angesehen. Eine besonders hohe Prävalenz herrscht in Großbritannien. Morgan (Morgan, Nicholas, et al. 1990) hielt 1990 fest, dass in etwa 30% der Schafherden Fälle von Scrapie aufgetreten sind. Die Vorkommenshäufigkeit in Deutschland ist vergleichsweise gering. Seit dem Zweiten Weltkrieg wurden elf Scrapieausbrüche registriert; der letzte im Dezember 2001. Die natürlichen Übertragungswege der Scrapie in der Natur sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Seit 1936 gilt die Übertragbarkeit der Krankheit auf Schafe (Cuillé & Chelle 1936) und seit 1939 auch die Übertragbarkeit auf Ziegen (Cuillé & Chelle 1939) als gesichert. Die erregerehaltige Nachgeburt wird heute als Infektionsquelle für die horizontale Ausbreitung der Scrapie innerhalb einer Herde angesehen (Pattison, Hoare, et al. 1972; Dickinson, Stamp, et al. 1974). Isländische Studien belegen (Sigurdarson 1991; Sigurdarson 1998), dass kontaminierte Böden bei der Scrapiebekämpfung als Infektionsquelle berücksichtigt werden müssen, da der Erreger länger als drei Jahre im Boden stabil bleibt (Brown & Gajdusek 1991). Zur vertikalen Übertragung liegen widersprüchliche Publikationen vor, die alle auf Embryonentransfer-Experimenten beruhen. Während die Studien von Foster et al. die vertikale Transmission belegen, lassen die Ergebnisse von Foote et al. einen derartigen Übertragungsweg als unmöglich einschätzen (Foster, McKelvey, et al. 1992; Foote, Clark, et al. 1993; Foster, Hunter, et al. 1996). Die Inkubationszeit der Scrapie-Erkrankung beträgt mindestens ein Jahr (Hunter 1991) und variiert in Abhängigkeit vom Genotyp des Empfängertieres. Die klinische Phase dauert bei Schafen vier bis neun Monate, bei Ziegen ist sie häufig kürzer (Andrews, Laven, et al. 1992). Histologisch ist das Bild der Scrapie-Erkrankung durch spongiforme Vakuolisierung im Gehirn und durch Astrozytose gekennzeichnet (Zlotnik 1958). Amyloide Plaques werden indes nur selten beobachtet (Wood, McGill, et al. 1997). Eine natürliche Übertragung der Scrapie auf den Menschen wurde bisher nicht beobachtet.

CWD - Chronic Wasting Disease - bei Zerviden In den USA wurde diese Erkrankung der Zerviden erstmals 1967 bei in Gefangenschaft gehaltenen Maultierhirschen und Wapiti beschrieben (Williams & Young 1980). Eine 2000 veröffentlichte Studie deutet darauf hin, dass im Nordosten Colorados und im Südosten Wyomings bis zu 15% der Population wildlebender Hirsche und Wapitis mit der CWD infiziert sind (Miller, Williams,

et al. 2000). Der Ursprung und die Übertragungswege dieser Erkrankung sind jedoch noch ungeklärt. Unbekannt ist bislang auch die Übertragbarkeit auf Mensch und Tier. Bislang liegen nur in vitro Studien vor, die das Übertragungsrisiko auf Mensch, Rind und Schaf als gering einschätzen lassen (Raymond, Bossers, et al. 2000). Die Beobachtung der TSE-Freiheit von Bighorn Schafen im Feld liefert lediglich den Hinweis auf ein geringes Ansteckungsrisiko, da diese gemeinsam mit CWD-befallenen Hirschen eine ökologische Nische besiedeln (Raymond, Bossers, et al. 2000).

BSE - Bovine Spongiforme Enzephalopathie - bei Rindern Im April 1985 wurde erstmals die Klinik einer BSE-Erkrankung bei Rindern in Großbritannien beobachtet. Geschildert wurden unspezifische Symptome wie Gewichtsverlust und Rückgang der Milchleistung, die dann von Schreckhaftigkeit, Zähneknirschen, exzessivem Lecken, Koordinationsstörungen bis hin zum Festliegen gefolgt wurden. Als BSE diagnostiziert wurde diese zunächst unbekannte ZNS-Erkrankung bei Rindern jedoch erst ein Jahr später. Die erste histologische Untersuchung eines solchen Falles wurde im November 1986 im CVL (Central Veterinary Laboratory) in Weybridge durchgeführt. Festgestellt wurde eine spongiforme Enzephalopathie unbekannter Ätiologie (Wells, Scott, et al. 1987; Wilesmith, Wells, et al. 1988; Wells, Hawkins, et al. 1998). Tiere im Alter zwischen 20 Monaten und 15 Jahren erkrankten. In epidemiologischen Studien wurde ein mittleres Erkrankungsalter von fünf Jahren ermittelt. Als wahrscheinlichste Krankheitsursache wurde die Verfütterung von Tiermehl angesehen (Wilesmith, Wells, et al. 1988; Wilesmith, Ryan, et al. 1991). In den frühen 80er Jahren wurden die Anforderungen an die Tiermehlherstellung verändert. Tierkörperbeseitigungsanlagen verzichteten zum einen auf die Fettextraktion mit Hydrokarbonlösungsmitteln, zum anderen veränderten sie Behandlungstemperatur und -zeit (Bradley 1993; Anderson, Donnelly, et al. 1996). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln keinen Einfluss auf den Erregergehalt im Behandlungsgut hat (Taylor & Woodgate 1997; Taylor, Fernie, et al. 1998). 1988 wurde in Großbritannien der „BAN“ erlassen: die Verfütterung von wiederkäuerhaltigem Tiermehl an Wiederkäuer wurde verboten. Die Wirkung dieser Maßnahme spiegelt sich im Rückgang der Neuerkrankungen in England wider. Nach dem Höhepunkt der Epidemie im Jahr 1992, wo 37280 Fälle registriert wurden, sank die Anzahl

der Neuerkrankungen stetig ab. Allerdings wurde das Verfütterungsverbot vermutlich erst ab 1996 durch eine drastische Verschärfung der Kontrollen vollständig implementiert. Im Jahr 2000 wurden in Großbritannien nur noch 1400 BSE-Fälle gezählt. Bis heute wurden im Vereinigten Königreich insgesamt 182 581 BSE-Fälle registriert (Stand 30. Juni 2002; www.oie.int). Anlass zu Spekulationen gibt das Auftreten einzelner BSE-Fälle bei Jungtieren, die nach dem totalen Tiermehlverfütterungsverbot geboren wurden (sogenannte „BAB-Tiere“: born after the ban) und ließ zunächst eine vertikale Übertragung vermuten. Experimentell konnte der Nachweis jedoch nicht erbracht werden (Bradley 1996). Vielmehr scheinen Tiermehlkontaminationen die Ursache für das Auftreten von sogenannten „BAB-Tieren“ zu sein. Unklarheit herrscht darüber, ob es sich bei der ursprünglichen Tiermehlkontamination um Scrapie der Schafe handelte oder um eine bislang noch nicht beschriebene spontane Prionerkrankung bei einem Rind, das anschließend in die Nahrungskette gelangte. Vor dem Hintergrund einer möglichen Infektion über Speziesbarrieren hinweg wurden Übertragungsstudien auf verschiedene Tierarten durchgeführt. Krallenaffen (Baker, Ridley, et al. 1993), Mäuse (Fraser, McConnell, et al. 1988; Fraser & Foster 1993), Rinder (Dawson, Wells, et al. 1990a), Schafe, Ziegen (Foster, Hope, et al. 1993), Schweine (Dawson, Wells, et al. 1990b; Dawson, Wells, et al. 1993), Nerze (Robinson, Hadlow, et al. 1994), Hamster (Dawson, Wells, et al. 1991) und Hühner (Dawson, Wells, et al. 1993) wurden mit Gehirnmaterial BSE-kranker Rinder intrazerebral infiziert. Nur Hühner und Hamster zeigten keine Krankheitsanzeichen. Wurde infektiöses Material peroral verabreicht, so blieben nur Schweine und Hühner gesund (Dawson, Wells, et al. 1993). Mäuse (Middleton & Barlow 1993), Rinder (Wells, Dawson, et al. 1994), Schafe, Ziegen (Fraser & Foster 1993) und Nerze (Robinson, Hadlow, et al. 1994) erkrankten. Demnach könnten Schafe eine Gefahr darstellen, weil sie möglicherweise eine als Scrapie maskierte BSE-Infektion weitergeben können. Bislang wurde mit den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden jedoch noch kein solcher Fall diagnostiziert.

Zur Abschätzung des Infektionsrisikos, das von Rinderprodukten ausgehen kann, wurden verschiedene Organe des Rindes in Infektionsversuchen getestet. Diese ergaben, dass bei BSE die Infektiosität in erster Linie auf das ZNS, die Retina und ferner auch auf das distale Ileum beschränkt ist. Mäuse, die intrazerebral mit Organmaterial einer an BSE erkrankten Kuh infiziert wurden, erkrankten nicht nach Applikation von Organproben

aus dem lymphoretikulären System, dem Magen-Darmtrakt, dem Atmungstrakt und dem Geschlechtsapparat. Auch das periphere Nervengewebe, Muskulatur, Haut, Knochenmark, Milch und Blut konnten keine Krankheit in den Mäusen hervorrufen (Bradley 1996). Abzuwarten bleibt, ob ein Tier einer anderen Spezies, in diesem Fall eine Wildtyp-Maus, ein ausreichend sensitives System für den Nachweis von geringen Infektionsdosen darstellen kann.

TME, FSE und weitere prionprotein-assoziierte neurodegenerative Krankheiten bei anderen Spezies Diese Prionerkrankungen sind alle auf Infektionen durch kontaminierte Futtermittel zurückzuführen. Die Transmissible Mink Enzephalopathie (TME) wurde erstmals 1947 auf einer Nerzfarm im US-Bundesstaat Wisconsin festgestellt. Später gab es auch Fälle in Kanada, Finnland, Russland und in der ehemaligen DDR (Marsh 1991a&b). Der letzte Ausbruch in den USA wurde 1985 registriert (Marsh, Bessen, et al. 1991). Unklarheit herrscht aber auch hier darüber, welches Prion-Isolat ursprünglich das Tierfutter kontaminierte. Scrapie als Kontaminationsquelle erscheint unwahrscheinlich, da zwar eine intrazerebrale, nicht aber eine perorale Übertragung von zwei verschiedenen amerikanischen bzw. britischen Scrapie-Isolaten auf Nerze gelang (Hanson, Eckroade, et al. 1971; Marsh & Kimberlin 1975). Eine perorale BSE-Transmission auf Nerze war jedoch möglich (Robinson, Hadlow, et al. 1994), weshalb ein Zusammenhang mit der Verfütterung von gefallenem Rindern („Downer cows“) in den USA als Krankheitsursache der TME diskutiert wird (Marsh 1991b).

1990 wurde in Großbritannien das erste Mal die Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE) bei Hauskatzen festgestellt (Pearson, Gruffydd-Jones, et al. 1991; Wyatt, Pearson, et al. 1991). Weitere Fälle wurden auch in Norwegen (Bratberg, Ueland, et al. 1995), Liechtenstein (Vandeveld, persönl. Mitteilung) und Italien (Zanusso, Nardelli, et al. 1998) beschrieben. Jedoch nicht nur Hauskatzen zeigten eine BSE-ähnliche Klinik und Histopathologie. Ebenso starben zahlreiche Pumas, Geparde, Ozelote und Tiger, die in britischen Zoos gehalten wurden, an FSE.

Auch in britischer Gefangenschaft gehaltene exotische Wiederkäuer wie Nyalas, Große Kudus, Mufflons, Oryx- und Eland-Antilopen zeigten Symptome einer TSE (Kirkwood, Wells, et al. 1992). Diese Krankheit wird unter dem Begriff der „Exotic Ungulate En-

cephalopathy” (Enzephalopathie exotischer Klauentiere) zusammengefasst (Prusiner 1998). Als Ursache dieser erst im Zusammenhang mit BSE aufgetretenen Krankheiten wird die Verfütterung von BSE-kontaminiertem Fleisch oder Tiermehlen angenommen.

1.1.2 TSE beim Menschen: CJD, vCJD, Kuru, FFI und GSS

Bei den humanen Prionerkrankungen können bezüglich ihrer Genese sowohl infektiöse als auch nicht-infektiöse Krankheitsursachen wie hereditäre und idiopathische Krankheitsursachen unterschieden werden. Im Tierversuch sind jedoch alle Formen unabhängig von ihrer Ätiologie experimentell übertragbar und damit infektiös. Man unterscheidet generell fünf Hauptgruppen humaner TSE: die natürlich vorkommenden Formen wie CJD, GSS, FFI und Kuru und die erst zehn Jahre nach Erstbeschreibung von BSE festgestellte vCJD.

(klassische) CJD - Creutzfeldt-Jakob Disease Diese Erkrankung wurde erstmals 1920/21 von Creutzfeldt und Jakob als seltene Erkrankung des zentralen Nervensystems beschrieben, die mit fortschreitender Demenz und extrapyramidalen, pyramidalen und zerebellaren Ausfällen einhergeht (Creutzfeldt 1920; Jakob 1921a; Jakob 1921b). Es werden sporadische, hereditäre und infektiöse Formen der CJD unterschieden. In 85% der Fälle tritt die sporadische Form der CJD auf mit einer jährlichen Inzidenz von 1/1 000 000. Betroffen sind Patienten in einem Alter zwischen 50 und 75 Jahren. 15% der CJD-Fälle sind hereditärer Ursache und haben ihren Ursprung in autosomal-dominant vererbten Mutationen im Priongen (siehe Tabelle 1). Einzelne CJD-Patienten infizierten sich über Medikamente (z.B. Hypophysenwachstumshormone oder Gondadotropin) (Gibbs, Gajdusek, et al. 1968; Brown 1988), Transplantate (Cornea, Dura mater) (Duffy, Wolf, et al. 1974) oder kontaminiertes Operationsbesteck (Will & Matthews 1982).

vCJD - variant-Creutzfeldt-Jakob Disease Die neue Variante der CJD trat bisher vorwiegend bei jungen Menschen (16-48 Jahren) auf (Zeidler, Johnstone, et al. 1997; Zeidler, Stewart, et al. 1997) und unterscheidet sich sowohl in der Klinik als auch neurohistologisch von der klassischen Form der CJD. Während bei der sporadischen CJD die neurologischen Symptome wie Demenz und Myoklonien in der Regel rasch fortschreiten und innerhalb von zwei bis acht Monaten zum Tod führen, ist das klinische Bild der

vCJD zunächst von psychischen Störungen geprägt: veränderte Sinneswahrnehmungen wie Dysästhesien, Depression und Angstzustände sind die Vorboten nachfolgender motorischer Ausfälle, die während einer Krankheitsdauer von 7 bis 22 Monaten fortschreiten und in komatöser Demenz enden.

Immunhistologisch werden bei der klassischen Form der CJD vor allem synaptische Ablagerungen des Prionproteins im Neocortex und Thalamus diagnostiziert. Plaques werden nur selten beobachtet. Bei der vCJD dominieren indes floride Plaques (amyloide Ablagerungen umgeben von Vakuolen) das histologische Bild (Will, Ironside, et al. 1996a&b; Ironside & Bell 1997). Veränderungen sind hier vor allem in den Basalganglien und im Thalamus zu finden. PrP^{res} ist bei vCJD außer im Gehirn auch in Milz, Lymphknoten und Tonsillen nachweisbar (Hill, Desbruslais, et al. 1997; Hill, Zeidler, et al. 1997).

Bislang wurde die vCJD nur bei Patienten beschrieben, deren Kodon 129 des humanen Priongens homozygot für die Aminosäure Methionin kodiert (Collinge, Beck, et al. 1996). Auffällig für vCJD im Gegensatz zur klassischen Form ist das Fehlen typischer EEG-Veränderungen (Will, Ironside, et al. 1996).

1996, zehn Jahre nachdem die ersten BSE-Fälle beim Rind im Vereinigten Königreich diagnostiziert wurden, stellte man diese ungewöhnliche Form der CJD erstmals beim Menschen fest (Will, Ironside, et al. 1996a&b). Zunächst herrschte Unklarheit über einen möglichen Zusammenhang. In Übertragungsversuchen zeigte BSE-Material jedoch histologisch (Bruce, Will, et al. 1997), proteinbiochemisch (Collinge, Sidle, et al. 1996; Hill, Desbruslais, et al. 1997) und bezüglich der Inkubationszeit und Empfänglichkeit (Collinge, Palmer, et al. 1995; Lasmezas, Deslys, et al. 1996) die gleichen Eigenschaften wie Proben von vCJD-Patienten. Deshalb gilt die Übertragung des BSE-Erregers auf den Menschen heute als gesichert.

Kuru Infektiöser Genese ist auch Kuru, die als Lach- oder Schüttelkrankheit bezeichnet wird (papuan. Kuru = zittern) und endemisch im Stamm der Fore in Papua-Neuguinea vorkam. Die Verbreitung dieser Erkrankung, die erstmals von Gajdusek und Zigas 1957 beschrieben wurde (Gajdusek & Zigas 1957), erfolgte durch rituellen Kannibalismus. Während der Totenzeremonie wurde das Gehirn des Toten verzehrt, Frauen und Kleinkinder

wurden damit eingegeben. Seit Mitte der 50er Jahre ist dieser Totenkult verboten (Alpers 1987).

Eine Neuansteckung wurde nach dem Verbot nicht mehr registriert; allerdings werden heute noch einzelne Fälle bei Eingeborenen beschrieben, die 40 Jahre nach dem letzten Verzehr von menschlichem Gehirn noch an Kuru erkranken, woraus sich eine Inkubationszeit zwischen $4\frac{1}{2}$ und 40 Jahren ergibt. Als Infektionsweg gilt die orale und transkutane bzw. transokuläre Erregeraufnahme (Gajdusek 1996). Beobachtet wurden neurologische Symptome wie zerebellare Ataxie, spastischer Strabismus und Tremor. Im weiteren kam es zu psychischen Störungen: paradoxe Gefühlsausbrüche wie z.B. grundlose Heiterkeit wurden beschrieben (Gajdusek 1996). In der Regel trat nach Auftreten der ersten Krankheitsanzeichen nach ein bis zwei Jahren der Tod ein. Histologisch wurden intrazytoplasmatische Vakuolen, reaktive Astrozytose und in 70% der Fälle sogenannte „Kuru-Plaques“ im Kleinhirn gefunden (Beck, Daniel, et al. 1966; Klatzo, Gajdusek, et al. 1959; Bell & Ironside 1993; Gajdusek 1996).

GSS - Gerstmann-Sträussler-Scheinker, FFI - Fatale familiäre Insomnie und weitere

prionprotein-assoziierte neurodegenerative Krankheiten Gemeinsam ist dieser Gruppe der natürlich vorkommenden Prionerkrankungen ihre hereditäre Ätiologie, die mit Mutationen im Priongen einhergehen (Tab. 1). Gerstmann, Sträussler und Scheinker (Gerstmann, Sträussler, et al. 1936) beschrieben erstmals 1936 eine familiäre Störung, die klinisch vor allem durch Kleinhirnsymptomatik geprägt ist. Histologisch fand man bei dieser als Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) bezeichneten seltenen Krankheit sowohl im Großhirn als auch im Kleinhirn amyloide Plaques. Spongiforme Veränderungen wurden nicht immer beobachtet (Bell & Ironside 1993).

Auch die FFI ist genetischen Ursprungs. Die Erkrankung tritt bei Patienten im Alter zwischen 40 und 60 Jahren auf. Nach Auftreten der ersten Symptome führt sie nach 7-18 Monaten zum Tod. Die Klinik ist durch Schlafstörungen, Ataxie und Gedächtnisverlust bei erhaltener Gesamtintelligenz gekennzeichnet. Thalamusatrophie in Verbindung mit einer leichten Gliose und selten vorhandener Spongiose sind histologische Kennzeichen dieser Erkrankung (Gambetti, Petersen, et al. 1993).

Erkrankung	Mutation im Prionprotein
hereditäre CJD	D178N (Genotyp an Codon 129: V/V), V180I, E196K, E200K, V203I, R208H, E211Q, M232R und N-terminal gelegene Insertionen
GSS	P102L, P105L, A117V (assoziiert mit GSS), H187R, F198S (atyp. neurofibrilläre Strukturen), D202N, Q212P, Q217R (atyp. neurofibrilläre Strukturen)
FFI	D178N (Genotyp an Kodon 129: M/M)
Sonstige	N171S (schizoaffektive Störungen), T183A (familiäre spongiforme Enzephalopathie), T188R/K (prionprotein-assoziierte Demenz), P238S

Tabelle 1: Hereditäre Prionenkrankheiten und deren Mutationen im humanen Prionprotein Quelle: www.expasy.ch/swissprot

Neben diesen beiden seltenen Formen der familiären TSE wurden noch weitere neurodegenerative Erkrankungen beschrieben, die mit Mutationen des Prion-Gens einhergehen (Tab. 1).

1.2 Die Pathogenese der TSE

Im Verlauf einer TSE kommt es zur Ablagerung eines Proteins (PrP^{res}), das sich aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften vom zellulären Protein (PrP^{sen}) unterscheidet. Während PrP^{sen} (Abkürzung für PK-sensitiv) vollständig durch Proteinase K (PK) verdaut wird (Bolton, McKinley, et al. 1982; Oesch, Westaway, et al. 1985) und in Detergens löslich ist (Meyer, McKinley, et al. 1986), zeigt PrP^{res} (Abkürzung für PK-resistent) eine partielle PK-Resistenz und bildet unlösliche Aggregate. Diese unterschiedliche PK-Sensitivität macht man sich beim Nachweis einer TSE-Erkrankung zu Nutze: homogenisiertes Probenmaterial wird verdaut. Da PrP^{sen} PK-sensitiv ist, kann anschließend nur noch PrP^{res} detektiert werden.

Aufgrund der außerordentlichen Resistenz der TSE-Infektiosität gegenüber herkömmlichen Inaktivierungsverfahren wurde erstmals von Griffith (Griffith 1967) die Idee einer neuartigen Infektionskrankheit beschrieben, nach der das abgelagerte Protein (PrP^{res}) das infektiöse Agens darstellt. Jahre später untermauerte Prusiner (Prusiner 1982) mit Daten aus Inaktivierungsexperimenten diese These. DNA- und RNA zerstörende Behandlungen mit Nukleasen (Bellinger-Kawahara, Diener, et al. 1987; Kellings, Prusiner, et al. 1994),

1M Salzsäure, 100%igem Ethanol, Formaldehyd (Brown, Liberski, et al. 1990), trockener Hitze (Brown, Liberski, et al. 1990; Brown, Rau, et al. 2000), ultraviolettem Licht und ionisierender Strahlung (Alper, Haig, et al. 1966; Alper, Cramp, et al. 1967; Bellinger-Kawahara, Cleaver, et al. 1987) führten, wenn überhaupt, nur zu einer geringen Abnahme der Infektiosität. Proteindenaturierende Lösungen wie 6M Guanidiniumchlorid (Prusiner, Groth, et al. 1981; Prusiner 1982; Prusiner, Groth, et al. 1993), 20% Natriumhypochlorid (Kimberlin, Walker, et al. 1983; Taylor, Fraser, et al. 1994; Brown, Rohwer, et al. 1986) oder 2M Natronlauge (Ernst & Race 1993) oder Proteasen senkten die Infektiosität jedoch deutlich. Prusiner prägte den Begriff der „Protein-Only“-Theorie (Prusiner 1982), wonach die pathologische Isoform eines natürlich vorkommenden Proteins das infektiöse Agens darstellt. Er spricht daher vom Prionprotein im Sinne von „proteinaceous infectious particle“. Für seine Arbeiten erhielt er 1997 den Nobelpreis für Medizin.

1.2.1 Molekulare Pathogenese der TSE

Der Beweis jedoch, dass allein PrP^{res} das infektiöse Agens (PrP^{Sc}) darstellt, steht noch aus. In vitro gelang lediglich die „de novo“-Herstellung eines Prionproteins mit den physikochemischen Eigenschaften von PrP^{res} (Kocisko, Come, et al. 1994; Bessen, Kocisko, et al. 1995; Riesner, Kellings, et al. 1996; Raymond, Hope, et al. 1997; Hill, Antoniou, et al. 1999). Infektiös waren diese Moleküle jedoch nicht (Hill, Antoniou, et al. 1999), was durch Inokulationsexperimenten belegt werden konnte. Deshalb vermuten manche Arbeitsgruppen die Beteiligung von RNA-, DNA-Partikel oder von Viren an der Krankheitsgenese (Diener, McKinley, et al. 1982; Diringier, Braig, et al. 1988; Dickinson & Outram 1988; Diringier, Beekes, et al. 1994; Manuelidis, Sklaviadis, et al. 1995; Narang 1996). Eine Isolierung solcher Erreger ist bis jetzt aber noch nicht reproduzierbar gelungen. Gesichert ist jedoch, dass die Konformationsänderung eines physiologisch vorkommenden Proteins (PrP^{sen}) in seine pathologische Isoform (PrP^{res}) im Zentrum der molekularen Pathogenese steht.

Beide Proteine weisen dieselbe Primärstruktur auf und unterscheiden sich lediglich aufgrund ihrer Sekundärstruktur. Eine chemische Modifikation der Primärstruktur konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Während bei der zellulären Form (PrP^{sen}) α -Helix-Strukturen überwiegen, enthält PrP^{res} vor allem β -Faltblatt-Anteile. Fourier-Infrarot-

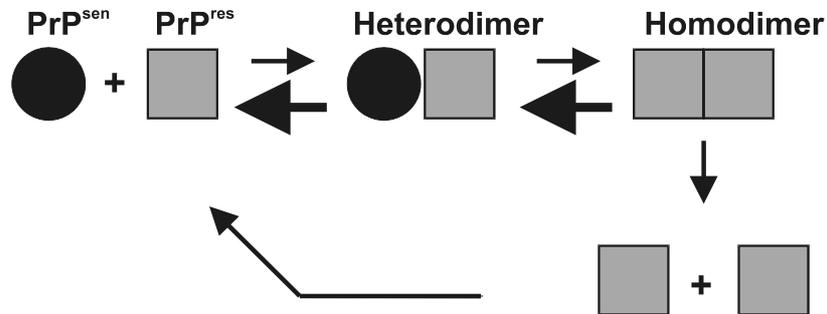
Spektroskopie-Untersuchungen ergaben für PrP^{sen} einen α -Helixanteil von 42% und einen β -Faltblattgehalt von 3%, während PrP^{res} unter Nativbedingungen einen α -Helixgehalt von 30% und einen β -Faltblattanteil von 43% aufwies (Pan, Baldwin, et al. 1993). Als Mechanismus für diese post-translationale Umfaltung (Borchelt, Scott, et al. 1990; Caughey & Raymond 1991) von PrP^{sen} in PrP^{res}, auch Konversion genannt, wurden zwei Theorien postuliert: das Heterodimer-Modell und die „Seeding“-Hypothese.

Nach dem Heterodimer-Modell (Abb. 1) soll sich PrP^{res} an das zelluläre Prionprotein (PrP^{sen}) anlagern und so ein Heterodimer bilden. Dadurch soll eine Strukturumwandlung induziert werden, bevor die Bindungspartner wieder dissoziieren (Prusiner 1991). Die Konformationsänderung erfordert vermutlich eine hohe Aktivierungsenergie. Deshalb werden in diesem Zusammenhang Chaperone wie Protein X diskutiert (Prusiner 1998). Ein Dimer konnte bislang noch nicht nachgewiesen werden. Nach der „Seeding“-Hypothese (Abb.1), auch Kristallisationskeim-Polymerisierungsmodell genannt, soll PrP stets, wenn auch nur für kurze Zeit und in kleinen Mengen in einer PrP^{res}-Konformation vorliegen. Dieser Zustand soll jedoch erst stabil werden, wenn mehrere derartige Moleküle miteinander aggregieren und dadurch weitere Kristallisationskeime „seeds“ für die Anlagerung von PrP^{res} bilden. Dieser autokatalytische Prozess soll durch den Zerfall großer Aggregate in neue Kristallisationskeime beschleunigt werden (Jarrett & Lansbury 1993). Für diese Theorie spricht, dass bislang PrP^{res} noch nie als Monomer in Lösung nachgewiesen werden konnte. Ein ähnliches Kristallisationsprinzip wurde auch bei der Bildung verschiedener Flagellentypen beobachtet (Asakura, Eguchi, et al. 1966; Asakura 1966; Aizawa, Vonderviszt, et al. 1990). Auch aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden Proteine isoliert, die wie Prionprotein in zwei, nicht genetisch verankerten, unterschiedlichen Isoformen vorkommen können: ure2p und sup35p (Wickner 1994; Sondheimer & Lindquist 2000; Li & Lindquist 2000; Santoso, Chien, et al. 2000).

1.2.2 Biologische Pathogenese der TSE

Da die TSE-Erkrankungen mit Ausnahme der erblichen Formen durch orale oder periphere, d.h. transokuläre, transmembranäre oder transkutane Erregeraufnahme erworben werden, stellt sich die Frage nach dem Infektionsweg. Aus Versuchen mit PrP[%]-Mäusen (Knockoutmäuse, die kein PrP^{sen} exprimieren) weiß man, dass eine Prionerkrankung an

Heterodimer Modell



Seeding Hypothese

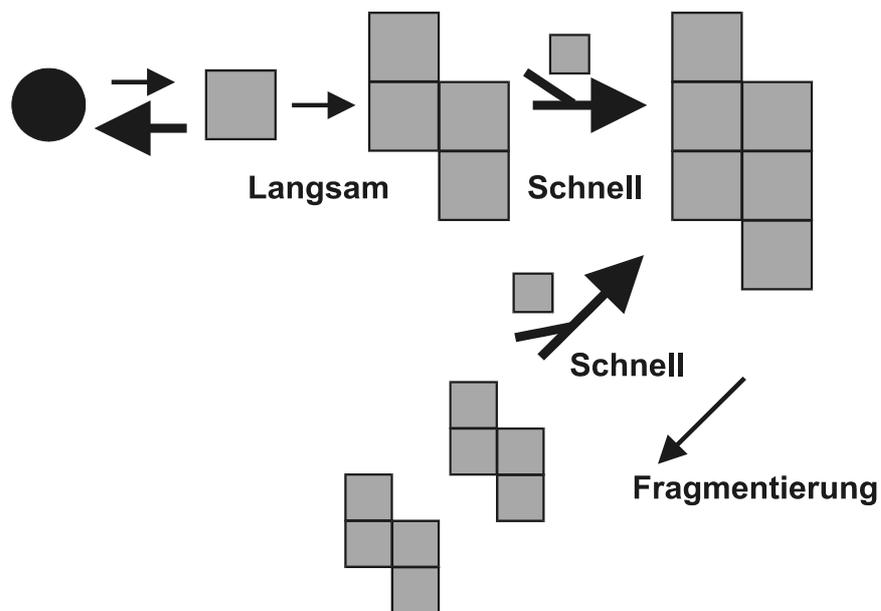


Abbildung 1: Die zwei Theorien der Umfaltung:

Beim Heterodimer-Modell katalysiert ein PrP^{res} -Monomer die Konformationsänderung von PrP^{sen} über ein Heterodimer-Intermediat. Diese Umfaltung erfordert eine hohe Aktivierungsenergie. Nach der „Seeding“-Hypothese existieren in vivo zwei Isoformen von PrP, wobei das Gleichgewicht stark auf der Seite von PrP^{sen} liegt. PrP^{res} wird nur stabilisiert, wenn es an einen bereits bestehenden Kristallisationskeim „seed“ binden kann. Die Kristallisationskeimbildung ist ein selten vorkommender Prozess. Durch Zerfall der Polymere entstehen neue, die Aggregatbildung katalysierende Kristallisationskeime.

die Expression von PrP^{sen} im Gehirn gebunden ist: Nach intrazerebraler Infektion von PrP[%]-Tieren erkrankten die Tiere nicht, und PrP^{res} konnte nicht nachgewiesen werden (Bueler, Aguzzi, et al. 1993; Sailer, Bueler, et al. 1994). Das Wiedereinführen muriner Prionogene in das Genom von PrP[%]-Mäuse ermöglichte wieder eine Infektion und führte bei diesen in Abhängigkeit der steigenden Kopienzahl zu einer Abnahme der Inkubationszeit (Fischer, Rulicke, et al. 1996). Wurden PrP[%]-Tiere intraperitoneal infiziert, denen zuvor PrP^{sen}-haltiges Nervengewebe intrazerebral implantiert worden war, kam es zu keinen pathologischen Veränderungen im PrP-haltigen Gehirnabschnitt (Brandner, Raeber, et al. 1996; Brandner, Isenmann, et al. 1996). Dieser Versuch belegt, dass für eine erfolgreiche Weiterleitung des infektiösen Agens ins Gehirn PrP-exprimierendes Gewebe auch außerhalb des ZNS anwesend sein muss.

In diesem Zusammenhang wird zum einen dem lymphoretikulären Gewebe und zum anderen dem PNS (peripheren Nervensystem) (Kimberlin & Walker 1980) eine zentrale Rolle zugeschrieben. Bei einer oralen Infektion wird die Erregeraufnahme über die M-Zellen der Peyerschen Plaques vermutet. Von dort sollen sie auf noch nicht geklärte Weise in die Milz gelangen, wo sie sich in follikulär dendritischen Zellen (follicular dendritic cells; FDC) (Kitamoto, Muramoto, et al. 1991; McBride, Eikelenboom, et al. 1992) replizieren. Auch in Lysosomen der TBMs (tingible body macrophages) konnten sie nachgewiesen werden (Jeffrey, McGovern, et al. 2000). Anschließend werden sie via peripheres Nervensystem mit einer Geschwindigkeit von etwa 1mm pro Tag (Kimberlin, Hall, et al. 1983; Glatzel & Aguzzi 2000) ins ZNS transportiert: entweder über eine dominoeffektartige Umfaltungskaskade entlang der Nervenzelle oder durch einen axonalen Transportmechanismus.

Im Gehirn kommt es dann zur Proteinakkumulation in Astrozyten und Neuronen (Diedrich, Bendheim, et al. 1991) und schließlich durch Apoptose (Giese, Groschup, et al. 1995; Forloni 1996; Schatzl, Laszlo, et al. 1997) zum neuronalen Zelltod. Ob diese Schäden infolge der PrP^{res}-Ablagerung entstehen oder durch den Verlust der physiologischen Funktion von PrP^{sen} ist noch ungeklärt. In diesem Zusammenhang wurden Störungen im Metabolismus verschiedener Neurotransmitter (Lu, Sturman, et al. 1995; Rubenstein, Deng, et al. 1991; Kristensson, Feuerstein, et al. 1993), Veränderung der Hitzeschockproteinantwort (Tatzelt, Zuo, et al. 1995; Tatzelt, Voellmy, et al. 1998), eine Erhöhung

von Zytokinen (Campbell, Eddleston, et al. 1994; Williams, Lawson, et al. 1994) und CD8+-Zellen (Betmouni, Perry, et al. 1996), und auch die Neurotoxizität eines amyloidogenen PrP-Fragments (huPrP aa106-126) diskutiert (Brown, Herms, et al. 1997; Forloni, Angeretti, et al. 1993). Die Klinik und die Pathologie der Scrapie-Erkrankung ist nicht an einen bestimmten Zelltyp gebunden. Versuche an transgenen Mäusen, die PrP^{sen} nur auf Neuronen (Race, Oldstone, et al. 2000) bzw. nur auf Astrozyten (Raeber, Race, et al. 1997) exprimierten, zeigten, dass diese sich nicht in Krankheitsanzeichen und Histopathologie unterscheiden. Daraus kann geschlossen werden, dass die bei TSE-Erkrankungen beobachtete Neuronendegeneration nicht direkte Folge einer Zellpopulationschädigung durch PrP^{res}-Akkumulation ist, sondern auch sekundär vermittelt sein kann.

Versuche zur Pathogenese der TSE-Erkrankungen wurden meistens in der Maus, im Hamster oder seltener im Schaf mit Scrapiematerial durchgeführt und sind deshalb nur bedingt übertragbar auf den Infektionsverlauf spongiformer Enzephalopathien bei anderen Spezies. Schon bei Arbeiten im Mausmodell mit unterschiedlichen Scrapiestämmen fielen Unterschiede auf. Während der Scrapiestamm Me7 z.B. in PrP-haltigen FDCs (follicular dendritic cells; follikulär dendritische Zellen) der Milz repliziert wird (Brown, Stewart, et al. 1997), hängt beim Stamm RML die Replikation in der Milz offenbar von PrP-haltigen B-Zellen ab (Klein, Frigg, et al. 1997; Blattler, Brandner, et al. 1997). Auch die Bedeutung der Milz ist im Infektionsgeschehen bei Hamster und Maus unterschiedlich: zeigten splenektomierte Mäuse nach peripherer Infektion eine Verlängerung der Inkubationszeit (Fraser & Dickinson 1978), so blieb diese bei splenektomierten Hamstern (Kimberlin & Walker 1986) unbeeinflusst. Diese Unterschiede belegen zum einen, dass es wahrscheinlich keine uniforme Pathogenese für die verschiedenen TSE-Erreger und -Stämme gibt, und zum anderen, dass der im Nagetier untersuchte Infektionsweg nicht zwingend dem des natürlichen Wirts entsprechen muss. Darüber hinaus wird auch der völlige Bypass des lymphoretikulären Systems beobachtet (Kimberlin & Walker 1989; Lasmezas, Cesbron, et al. 1996; Beekes, Baldauf, et al. 1996a; Beekes, Baldauf, et al. 1996b; Beekes, McBride, et al. 1998).

1.3 Das Prionprotein

1.3.1 Die Struktur von PrP

Die Struktur des Prionproteins konnte bislang nur für die zelluläre Isoform PrP^{sen} bestimmt werden. In NMR-Studien konnte die räumliche Anordnung von murinem (Riek, Hornemann, et al. 1996), humanem (Zahn, Liu, et al. 2000), bovinem (Lopez, Zahn, et al. 2000) und Hamster-PrP (Donne, Viles, et al. 1997) geklärt werden. Eine detaillierte Strukturbestimmung von PrP^{res} gelang bislang nicht, da es unlösliche Aggregate bildet. PrP^{sen} besteht aus zwei Bereichen: einem unstrukturierten flexiblen N-terminalen Schwanz (aa23-120) und einer C-terminalen strukturierten, globulären Domäne (aa121-230).

Im N-Terminus liegen mögliche Transmembranbereiche, die amyloidogene, neurotoxische Region und Spaltungsstellen für Proteinase K und andere Proteasen. Im weiteren sind Oktarepeatregionen (sich wiederholende Oktapeptidmotive PHGGGWGQ) N-terminal lokalisiert, die Kupferionen binden können.

C-terminal enthält PrP^{sen} drei α -Helizes und zwei β -Faltblattstrukturen. Bei der Maus sind diese wie folgt lokalisiert: Helix1 aa143-153, Helix2 aa174-192, Helix3 aa199-218; β 1 aa127-130; β 2 aa160-163. In diesen Abschnitten vermutet man Umfaltungsprozesse während der PrP^{res}-Bildung und die Interaktion mit Protein X.

1.3.2 Das PrP-Gen (Prnp)

PrP^{sen} wird durch ein einziges Exon im Prnp-Gen kodiert. Das Gen, das bei der Maus auf Chromosom 2 und beim Menschen auf Chromosom 20 lokalisiert ist, besteht bei Maus, Ratte, Schaf und Rind aus drei Exons, wobei der offene Leserahmen (ORF) im dritten Exon liegt. Das Prnp-Gen des Menschen und des Hamsters enthält lediglich zwei Exonbereiche, mit dem ORF im zweiten Exon (Lee, Westaway, et al. 1998). Der Promotor ist 5'-terminal des Exon 1 gelegen (Inoue, Tanaka, et al. 1997).

Für Maus-Prnp gibt es zwei Polymorphismen: Prnpa (Kodon 108L; 189T) kodiert in der Regel für eine verkürzte Inkubationszeit, während Prnpb (Kodon 108F; 189V) mit einer langen Inkubationszeit einhergeht. Bei weitergehenden Genanalysen fiel auf, dass Prnpa im Gegensatz zu Prnpb im Bereich des zweiten Introns retrovirale Anteile enthält

(Lee, Westaway, et al. 1998).

1.3.3 Prozessierung des primären Translationsproduktes

Das Priongen der Maus kodiert für ein primäres Translationsprodukt, das aus 254 Aminosäuren besteht (Abb. 2). Noch während der Translation wird die entstehende Peptidkette über eine 22 Aminosäuren umfassende N-terminale Signalsequenz zum ER dirigiert. Dort kann das Prionprotein auf drei verschiedene Arten prozessiert werden. In der Regel wird das gesamte Molekül ins Lumen transloziert. Dort wird vermittelt durch das C-terminale GPI-Anker-Additionssignal ein GPI-Anker „en bloc“ angehängt, der das Molekül später in der Zellmembran verankert.

Hegde et al. (Hegde, Mastrianni, et al. 1998) fanden zusätzlich zwei transmembranäre Expressionsformen: die ctm- (C-Terminus im Lumen des ER lokalisiert) und die ntm-Form (N-terminus im Lumen des ER lokalisiert). Für diese Topologie sollen zwei Abschnitte des Prionproteins verantwortlich sein: die von aa103-111 reichende hydrophile STE-Region (Stop-Transfer-Effektor Sequenz) und der nachfolgende (aa112-138) hydrophobe TM- (Trans-Membran)-Bereich. Das STE-Signal soll das Anordnen der TM-Region in der Membran (Hegde, Mastrianni, et al. 1998) ermöglichen. Hegde et al. demonstrierten, dass transgene Mäuse, die Prionproteine mit einer ctm-Form begünstigenden Mutation in der TM-Region exprimierten, klinisch und histologisch dieselben Symptome zeigten wie scrapiekrankte Tiere. Darüberhinaus fanden sie in scrapieinfizierten Mäusen eine Anhäufung der ctm-Form (Hegde, Mastrianni, et al. 1998; Hegde, Tremblay, et al. 1999). Daher postulierten Hegde et al., dass das klinische und pathologische Bild einer Prionerkrankung nicht durch PrP^{res} selbst, sondern durch eine Anhäufung der ctm-Form ausgelöst werde. In gesunden Tieren käme es durch regulatorische Prozesse zu einem schnellen Abbau dieser Isoform. Dafür spricht, daß bislang in gesunden Wildtyp-Mäusen keine transmembranäre Form nachgewiesen werden konnte (Dr. Eiden, unveröffentlicht).

Die N-terminale Signalsequenz und das GPI-Additionssignal werden im ER abgespalten. Während der Translokation wird das entstehende Protein noch weiter modifiziert. Zum einen wird im ER eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Schwefelatomen der Cysteinreste an den Positionen 178 und 213 ausgebildet, zum anderen wird die Glykosylierung des Prionproteins eingeleitet.

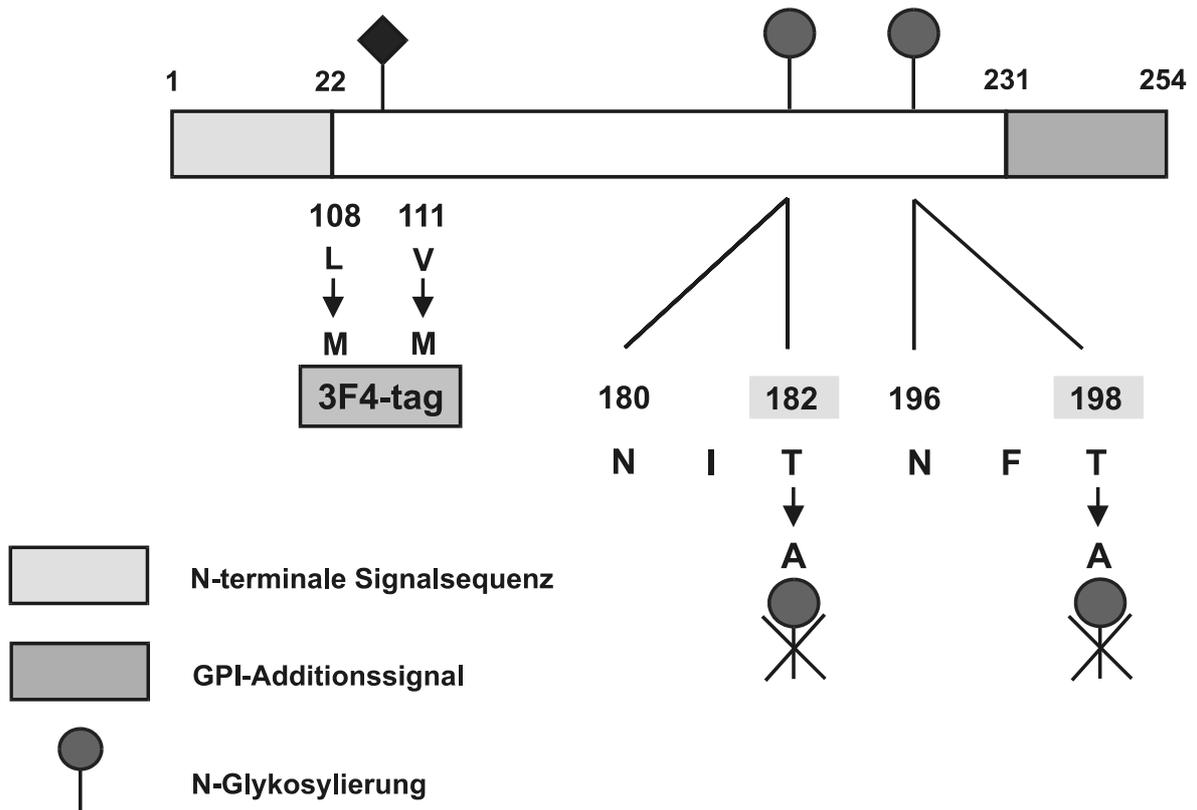


Abbildung 2: Schematik von Maus-PrP^{sen}:

Nummern zeigen die Aminosäureposition an. N-I-T und N-F-T sind „Consensus-Sites“ (Erkennungssequenzen) für N-Glykosylierung. Durch Aminosäureaustausch in der Erkennungssequenz wird die Glykosylierungsstelle zerstört. Zur gezielten Detektion des mutierten Genproduktes wurde das Epitop des mAk3F4 eingeführt, indem Leucin an Kodon 108 und Valin an Kodon 111 zu Methionin mutiert wurden.

1.3.4 Die Glykosylierung von PrP

Glykosylierung allgemein Generell können bei Proteinen zwei Bindungsarten der Glykosylierung unterschieden werden: die N- und die O-glykosidische Bindung. Während die N-Glykosylierung einem genauen Bauplan unterliegt, verläuft die O-Glykosylierung weniger gesetzmäßig: Sauerstoffatome (O) der Seitenkette von Serin- oder Threoninresten können O-glykosyliert werden. Wird im ER eine Erkennungssequenz abgelesen, die aus der Aminosäureabfolge N-X-T oder N-X-S besteht, wird N-glykosyliert. Dabei darf X nicht Prolin sein. Dann wird ein einheitliches „Core“ (Pentasaccharidgrundstruktur) aus drei Mannose- und zwei N-Acetylglucosamin-Einheiten an den entsprechenden Asparaginrest (N) gehängt. An diese Grundstruktur können nun verschiedene Zucker angehängt werden, wonach man den mannosereichen (zusätzliche Mannoseeinheiten) vom komplexen (zusätzlich N-Acetylglucosamin, Galactose, Sialinsäure und L-Fucose) Typ der N-gebundenen Glykosylierung unterscheidet.

Im ER erfolgt die sogenannte „Core-Glykosylierung“. Hier entstehen zunächst Moleküle des mannosereichen Typs. Unter Zuhilfenahme des Carrier-Lipids Dolicholphosphat, das in der ER-Membran verankert ist, werden Zucker aus dem Zytoplasma an die endständige Phosphorylgruppe gebunden. Dolicholphosphat klappt mit dem zuckertragenden Teil ins ER-Lumen und überträgt schließlich in Zusammenarbeit mit einer Transferase „en block“ den Zuckerbaum, bestehend aus zwei N-Acetylglucosamin-, neun Mannose- und drei Glucoseresten, auf die entsprechende Glykosylierungsstelle. Drei Glucosereste und ein Mannoserest werden sofort wieder enzymatisch abgespalten. Das Glykoprotein verlässt dann über Transfervesikel das ER zur terminalen Glykosylierung im Golgi-Apparat. Hier werden die Kohlenhydrateinheiten modifiziert. Im cis-Golgi-Kompartiment werden drei Mannosereste entfernt, im mid-Golgi zwei weitere Mannosereste entfernt, N-Acetylglucosamin und Fucose gebunden, während im trans-Golgi schließlich Galactose und Sialinsäure angehängt werden. Die Struktur der N-gebundenen Oligosaccharideinheiten von Glykoproteinen wird von der Protein-Konformation und der Zusammensetzung der Glykosyltransferasen der Zelle bestimmt, in der sie prozessiert werden. Die Information zur weiteren Steuerung der Proteine (Trafficking) wird durch ihre dreidimensionale Struktur (signal patches) determiniert.

Die genaue biologische Bedeutung der angefügten Oligosaccharide ist noch weitgehend ungeklärt. Man weiss lediglich, dass Sialoglykoproteine die Verweildauer von Immunglobulinen und Peptidhormonen im Blut bestimmen können. Auch Rezeptorfunktion wird Oligosacchariden zugeschrieben. Bei *E.coli* beispielsweise wird die Erkennung der Zielzelle durch Lectine (kohlenhydratbindende Proteine) vermittelt, die Zuckerstrukturen auf der Oberfläche der Zielzelle erkennen. Kohlenhydratstrukturen spielen auch eine Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion während der Entwicklung von Tieren.

Glykosylierung von PrP^{sen} und PrP^{res} Maus-PrP besitzt zwei Erkennungssequenzen für N-Glykosylierung. Die erste Anheftungsstelle für Oligosaccharide befindet sich an Aminosäure-Position 180, die zweite an Position 196 (bei Hamster und Mensch an 181 und 197) (Locht, Chesebro, et al. 1986). Das Protein kann demnach in drei unterschiedlichen Glykosylierungszuständen vorkommen. Anhand des Molekulargewichts können un- (24 kDa), einfach- (29-31 kDa) und zweifachglykosylierte (35-45 kDa) Moleküle unterschieden werden. Alle drei Formen werden auf der Zelloberfläche exprimiert, jedoch zu unterschiedlichen Anteilen am Gesamt-PrP. Stahl et al. (Stahl, Borchelt, et al. 1990) ermittelten, dass etwa 5% an Hamster-PrP^{sen} unglykosyliert, 25% mono- und 70% diglykosyliert vorliegen. Beim Vergleich der Spezies fällt Hühner-PrP bezüglich der Glykosylierung aus der Reihe: statt der üblichen zwei Erkennungsstellen für N-Glykosylierung verfügt es über drei; an den Positionen 194 (NIT), 210 (NTS) und 218 (NQT).

Die Untersuchungen von Hamster-PrP^{res} ergaben eine Mischung aus zwei-, drei- und vierfachverzweigten Oligosacchariden vom komplexen Typ, an deren terminale Galactosereste Sialinsäure gebunden ist und deren Core fucosyliert vorliegt (Haraguchi, Fisher, et al. 1989; Endo, Groth, et al. 1989). Endo et al. berechneten aufgrund ihrer Daten 400 verschiedene Prionprotein-Varianten aufgrund der unterschiedlichen Zuckerseitenketten.

Massenspektrometrie ermöglichte schließlich die Untersuchung von PrP^{sen} und damit den Vergleich der Oligosaccharidstrukturen von PrP^{sen} und PrP^{res}. Rudd et al. (Rudd, Endo, et al. 1999) ermittelten, dass beide Isoformen dieselbe Ausstattung an 52 verschiedenen zwei-, drei- und vierfachverzweigten N-gebundenen Zuckerketten aufweisen, die Anteile der verschiedenen Fraktionen sich jedoch unterscheiden. Während bei PrP^{sen} 51% der Zuckerketten zweifach-, 32% dreifach- und 17% vierfach-verzweigt sind, ist im

Vergleich bei PrP^{res} der Anteil an biantennären Zuckern (37%) vermindert und der an tri- und tetraantennären (36%, 27%) erhöht. Die konservierten Zuckerketten werden als Hinweis gewertet, dass die Konversion nicht zielgerichtet nur in bestimmten Zell-Subpopulationen stattfindet, die über eine spezielle Zuckerausstattung von PrP^{sen} verfügen. Die Ursache für die Verschiebung des Verhältnisses von biantennären zu nicht-biantennären Strukturen wird in einem Verlust der Aktivität der vor allem im Gehirn exprimierten N-AcetylglucosamyltransferaseIII (GnTIII) vermutet, die als Bestandteil der N-Acetylglucosamin-Transferase-Maschinerie die Ausbildung von nicht-biantennären Zuckern verhindert.

Eine Korrelation von gestörten Glykosylierungsabläufen mit dem Fortschreiten von Krankheiten wurde z.B. im Zusammenhang mit der rheumatoiden Arthritis beschrieben (Parekh, Dwek, et al. 1985; Young, Sumar, et al. 1991). Ob eine gestörte Oligosaccharidsynthese im Zusammenhang mit der Prionerkrankung lediglich Ausdruck der Zellschädigung ist oder kausale Bedeutung in der Pathogenese hat, ist bislang noch ungeklärt. Es gibt weder Verlaufsstudien, die eine Enzymstörung mit dem Fortschreiten der Scrapie-Erkrankung in Korrelation setzen, noch konnte gezeigt werden, dass auch andere Glykoproteine in ihrer Glykosylierung gestört sind.

Massenspektrometrische Analysen ermöglichten erstmals eine diskriminierende Analyse der einzelnen Zuckerbäume. Untersuchungen von Stimson et al. (Stimson, Hope, et al. 1999) ergaben, dass durch Scrapiestamm Me7 hervorgerufenes Maus-PrP^{res} etwa 60 verschiedene Oligosaccharidstrukturen des Komplex-Typs enthält. Die Zuckerseitenketten der ersten Glykosylierungsstelle sind vor allem durch bi- und triantennäre Strukturen dominiert, welche neutral sind und eine höhere Stabilität aufweisen. Das Molekulargewicht dieser Zuckerbäume wurde auf 1.6-2.3 kDa berechnet. Oligosaccharide an Kodon 196 werden vor allem aus tetra- und triantennären Zuckern gebildet und sind aufgrund des hohen Sialinisierungsgrades sauer. Letzteres konnte bislang noch bei keinem reifen, aus Neuronenzellen isolierten Glykoprotein beobachtet werden. Das Molekulargewicht dieser Zucker bewegt sich zwischen 2-3 kDa. Die Zucker der ersten Glykosylierungsstelle sind daher weniger heterogen als die der zweiten.

Beiden Glykosylierungsstellen gemeinsam ist das Vorkommen von Lewis^x- und Sialyl-Lewis^x-Epitopen, welche im Zusammenhang mit lektinvermittelten Zell-Zell-Interaktionen

während der ZNS-Entwicklung diskutiert werden (Hakomori 1992; Roberts, Platt, et al. 1991; Streit, Stern, et al. 1995; Eggens, Fenderson, et al. 1989). Lewis-Epitope stellen die hervorstechende nicht-reduzierende Struktur der Glykosylierung an Kodon 180 dar. Ungewöhnlich ist indes, dass für PrP kein α -Galactosyl-Epitop gefunden werden konnte, das üblicherweise Bestandteil von N-glykosylierten Glykanen ist (Galili, Clark, et al. 1987).

1.3.5 PrP als Zellmembranprotein

PrP^{sen} wird nach der Modifikation im Golgi-Apparat auf die Zelloberfläche transportiert und über den GPI-Anker in der Lipid-Doppelschicht verankert (Stahl, Borchelt, et al. 1990; Borchelt, Scott, et al. 1990). Als GPI-Protein ist PrP^{sen} in Caveolae ähnlichen Strukturen (Caveolae-Like-Domains = CLD) der Zellmembran lokalisiert (Taraboulos, Raeber, et al. 1992; Taraboulos, Scott, et al. 1995; Gorodinsky & Harris 1995; Taraboulos, Scott, et al. 1995; Vey, Pilkuhn, et al. 1996). Es gibt jedoch auch Hinweise für dessen Vorkommen in Clathrin-Coated-Pits (Shyng, Huber, et al. 1993). Die Halbwertszeit von PrP^{sen} beträgt drei bis sechs Stunden (Caughey 1993). 10% des PrP^{sen} wird in den Extrazellulärraum abgegeben (Stahl, Borchelt, et al. 1990), während die restlichen Moleküle in einem cholesterinreichen, nicht-sauren Zellkompartiment abgebaut werden (Taraboulos, Scott, et al. 1995). Shyng et al. (Shyng, Huber, et al. 1993) beschreiben einen Endozytoseprozess, der nach einer Halbwertszeit von 20 Minuten stattfindet und auf den ein etwa einstündiger Recyclingprozess folgt.

Obwohl PrP^{res} ebenfalls einen GPI-Anker besitzt, erscheint es nicht auf der Zelloberfläche. PrP^{res} akkumuliert intrazellulär in sekundären Lysosomen (McKinley, Taraboulos, et al. 1991) und wird in der Zelle nicht abgebaut (Caughey 1993). Nur etwa 5% des PrP^{sen} wird zu PrP^{res} umgefaltet (Taraboulos, Scott, et al. 1995). Diese Umfaltungsreaktion findet spät-posttranslational statt: entweder auf der Zelloberfläche oder nach der Internalisierung von PrP^{sen} in den Lysosomen (Caughey 1991; Caughey & Raymond 1991; Borchelt, Taraboulos, et al. 1992; Taraboulos, Raeber, et al. 1992; Shyng, Huber, et al. 1993; Shyng, Heuser, et al. 1994). Taraboulos et al. (Taraboulos, Scott, et al. 1995) beschreiben eine im Bereich von aa128 getrimmte 17kDa Version von Maus-PrP^{res}, die mit der Konversion einhergeht.

1.3.6 Die Funktion von PrP

Obwohl die Aminosäure-Sequenz des PrP-Gens bei den verschiedenen Säugetierspezies hochkonserviert ist und deshalb auf eine wichtige Funktion schließen lässt, ist die genaue Rolle des Prionproteins noch ungeklärt. Knockoutmäuse (PrP⁰), die kein zelluläres Prionprotein exprimieren, entwickeln und verhalten sich wie Wildtypmäuse (Bueller, Fischer, et al. 1992). Genauere Untersuchungen von PrP⁰-Mäusen ergaben eine veränderte elektrophysiologische Signalübertragung (synergistische Hemmung der GABA (γ -Aminobuttersäure)-Wirkung; Hemmung der NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren), beeinträchtigt Lernverhalten (Collinge, Whittington, et al. 1994; Colling, Collinge, et al. 1996; Herms, Kretschmar, et al. 1995) und einen gestörten zirkadianen Rhythmus (Tobler, Gaus, et al. 1996; Tobler, Deboer, et al. 1997). Im weiteren wurde eine Zerstörung der zerebellären Moosfaserstruktur festgestellt (Colling, Khana, et al. 1997).

Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* belegen die Beteiligung des Prionproteins am Kupferstoffwechsel der Zelle. Fünf bis sechs Kupferionen können an der N-terminal gelegenen Oktarepeatregion des zellulären Prionproteins gebunden werden (Brown, Qin, et al. 1997; Brockes 1999), und die unstrukturierte Oktarepeatregion formiert sich darauf in eine α -Helix-Domäne (Miura, Hori-i, et al. 1996). PrP⁰-Mäuse weisen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine um 20fach verminderte Kupferkonzentration der Membranfraktion auf und zeigen eine verminderte Aktivität der SOD (Superoxid Dismutase) auf oxidativen Stress (Brown, Qin, et al. 1997). Andere Studien weisen darauf hin, dass PrP^{sen} am Axonwachstum beteiligt sein könnte (Moya, Sales, et al. 2000), an der Antigenpräsentation durch FDCs mitwirkt (Bruce, Brown, et al. 2000) und unter Mangelbedingungen Zellen vor Apoptose schützt (Kuwahara, Takeuchi, et al. 1999). Ausgehend von seiner Eigenschaft als GPI-verankertes Protein wird PrP^{sen} auch im Zusammenhang mit Zelladhäsion, Ligandenaufnahme und Signalübertragung diskutiert (Rieger, Edenhofer, et al. 1997; Rieger, Lasmezas, et al. 1999; Mouillet-Richard, Ermonval, et al. 2000).

Die Lebensfähigkeit der PrP⁰-Mäuse deutet jedoch entweder auf eine geringe Bedeutung oder auf die Kompensierbarkeit der Prionproteinfunktion während der Entwicklung hin (Bueller, Fischer, et al. 1992).

1.3.7 Doppel (Dpl) - Der PrP-Doppelgänger

Die physiologische Funktion von PrP^{sen} konnten die PrP[%]-Mäuse bislang nicht aufklären. Sie führten jedoch auf die Spur eines Doppelgängers von PrP: PrP-Doppel. PrP[%]-Mäuse wurden auf zwei verschiedene Arten hergestellt. Bei den einen Mäusen (Bueler, Fischer, et al. 1992; Manson, Clarke, et al. 1994) wurde nur der mittlere Teil des ORF, bei den anderen (Sakaguchi, Katamine, et al. 1996; Moore, Lee, et al. 1999; Weissmann & Aguzzi 1999) der gesamte ORF zerstört. Während letztere nach etwa 70 Wochen neurologische Störung wie Ataxie und Purkinjenzellverlust zeigten, blieben erstere symptomfrei. Die Ursache der neurologischen Störungen sahen die Autoren in einer Überexpression des Proteins Doppel (Dpl), dessen Gen Prnd 16 kb downstream von Maus-Prnp liegt. Die vollständige Zerstörung des ORF geht mit dem Verlust einer „Splice Acceptor“-Stelle einher. Dadurch kommt es bei der Transkription des Prion-Gens zum vermehrten „Intergenic Splicing“: an Exon 2 des Prnp-Gens schließen sich direkt die Exonanteile von Prnd an. Diese m-RNA kann bei Nagasaki-Mäuse in großen Mengen im Gehirn nachgewiesen werden, bei Wildtypmäusen jedoch nicht.

Das aus 179 Aminosäuren bestehende primäre Translationsprodukt des Doppel-Proteins selbst konnte in vivo noch nicht nachgewiesen werden. PrP-Doppel ähnelt PrP, weil Strukturanalysen drei α -Helizes, zwei N-Glykosylierungsstellen, einen GPI-Anker und neben einer zusätzlichen eine Helix2 und -3 verbindende Disulfidbrücke vorhersagen (Moore, Lee, et al. 1999; Silverman, Qin, et al. 2000). Eine Okatrepeatregion fehlt jedoch und C-terminal besteht lediglich zu 25% Sequenzhomologie.

Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit soll nun PrP-Doppel in der Lage sein mit PrP und anderen potentiellen Liganden um Rezeptorbindungsstellen zu konkurrieren, ohne selbst intrinsische Aktivität zu besitzen. Es wird vermutet, dass es so zur Störung des Zellstoffwechsels und zu neurologischen Symptomen kommen kann (Weissmann & Aguzzi 1999).

1.4 Die TSE: Speziesbarriere und Vorkommen von Stämmen

1.4.1 Speziesbarriere

Als Speziesbarriere bezeichnet man die verminderte Empfänglichkeit einer Tierart gegenüber einer Infektion mit Prionprotein einer anderen Spezies. Diese verminderte Empfänglichkeit spiegelt sich in extrem langen und uneinheitlichen Inkubationszeiten wider, die unter Umständen die Lebenszeit des Individuums übersteigen (Priola & Chesebro 1995; Priola 1999). Das infektiöse Agens kann durch serielle Passagen in einer neuen Wirtsspezies an die neue Spezies adaptiert werden. Eine erhöhte Empfänglichkeit ist die Folge. Nach drei Passagen pendelt sich in der Regel die Inkubationszeit auf einen einheitlichen Wert ein, Standardfehler unter 2% (Bruce & Fraser 1991). Bei Übertragung über die Speziesbarrieren hinweg bleiben die Stammeigenschaften des Erregers i.d.R. erhalten (Prusiner, Scott, et al. 1990). Die Speziesbarriere wird vor allem durch die Primärsequenz der beteiligten Prionproteine beeinflusst. Sequenzhomologie, wie sie bei Infektion innerhalb der Spezies vorliegt, fungiert als Empfänglichkeitsfaktor, während heterologe PrP-Moleküle zu einer verminderten Übertragbarkeit führen. Werden Wildtyp-Mäuse mit Hamster-PrP^{Sc} infiziert, so erkranken diese nicht (Kimberlin, Walker, et al. 1975, Kimberlin & Walker 1978), sondern entwickeln eine subklinische Infektion mit symptomloser Akkumulation von PrP^{res} (Hill, Joiner, et al. 2000). Hamster-PrP-exprimierende transgene Mäuse zeigen jedoch nach Infektion mit hamsteradaptiertem Scrapieinokulat Zeichen einer Scrapie-Erkrankung (Scott, Foster, et al. 1989; Prusiner, Scott, et al. 1990).

In-vitro-Versuche belegen, dass der limitierende Faktor bei der speziesübergreifenden Übertragung nicht die Bindungsfähigkeit der beteiligten Moleküle, sondern die Konversionsreaktion ist: sowohl homologe als auch heterologe PrP-Moleküle lagern sich mit derselben Affinität zusammen; die Umfaltung verläuft jedoch ineffizient (Horiuchi, Priola, et al. 2000). Liegen in einem System sowohl homologe als auch heterologe Prionmoleküle vor, so kommt es zur Interferenz. Heterologe Moleküle behindern die Umfaltung homologer und vermitteln so durch Verminderung der PrP^{res}-Neubildung eine Art Schutz vor Prioninfektion (Priola, Caughey, et al. 1994; Priola & Chesebro 1995; Priola 1999; Horiuchi, Priola, et al. 2000).

1.4.2 Stämme

Die Existenz verschiedener Scrapie-Stämme wurde erstmals 1961 beobachtet. Serielle Passagen von zwei Scrapie-Isolaten in Wiederkäuern und Nagetieren führten zu auffälligen Unterschieden in der Klinik, die schließlich zur Unterscheidung der Stämme „drowsy“ und „scratching“ führten (Pattison & Millson 1961). Bislang konnten nach mehrfacher Passage von TSE-Erregern in Inzuchtmäusen mehr als 20 verschiedene experimentelle Scrapie-Stämme identifiziert werden (Bruce 1993; Bruce 1996). Diese unterscheiden sich in Mäusen mit definiertem Genotyp in der Inkubationszeit (Dickinson & Fraser 1977), dem histopathologischen Verteilungsmuster von Vakuolen und PrP^{res}-Ablagerungen (Hecker, Taraboulos, et al. 1992; Telling, Haga, et al. 1996; Prusiner 1997), den klinischen Symptomen (Carp, Callahan, et al. 1984), dem Wirtsspektrum (Kimberlin & Walker 1978), der PK-Resistenz (Bessen & Marsh 1992; Bessen & Marsh 1994), der Tenazität (Dickinson & Taylor 1978; Kimberlin, Walker, et al. 1983), dem Molekulargewicht und dem Glykosylierungsmuster (Hill, Desbruslais, et al. 1997; Somerville, Chong, et al. 1997; Kuczius, Haist, et al. 1998). Das Glykosylierungsmuster wird ermittelt, indem nach SDS-PAGE-Auftrennung und Westernblot der Anteil an un-, mono- und diglykosyliertem Prionprotein zu Gesamt-PrP ins Verhältnis gesetzt wird.

Zwei Fragen ergeben sich: wie erklärt sich diese Stammdiversität auf der Basis eines nicht-genetischen Mechanismus wie der Protein-Only-Theorie, und wie kann eine Polypeptidkette zu verschiedenen Stammphänotypen führen? Als Erklärung für die Existenz von Prion-Stämmen werden zwei Theorien diskutiert: Zum einen die „Konformations“- und zum anderen die „Targeting-Theorie“.

Nach der „Konformations-Theorie“ hat jeder TSE-Stamm eine individuelle Tertiärstruktur, die er während des Umfaltungprozesses auf PrP^{sen}-Moleküle überträgt. So lassen sich die Eigenschaften der ursprünglich aus dem Nerz isolierten Hamsterstämme „HY“ (hyper) und „DY“ (drowsy) auch *in vitro*, d.h. zellunabhängig auf PrP^{sen} übertragen (Bessen, Kocisko, et al. 1995). Zudem können Stämme in Antikörper-Affinitätsstudien (Safar, Wille, et al. 1998) und in spektrometrischen Untersuchungen der β -Faltblattstruktur (Caughy, Raymond, et al. 1998) unterschieden werden. Nach der „Targeting-Theorie“ könnte ein Stamm durch spezifische Modifikationen der Glykosylierung von PrP^{res} definiert

sein. Verschiedene Zellpopulationen verfügen über eine individuelle Enzymausstattung und exprimieren so nur einen bestimmten Glykosylierungstyp an PrP^{sen}, der als eine Art Rezeptor für PrP^{res} fungieren kann und so das PrP^{res}-Trafficking bestimmt. Dafür spricht, dass sich verschiedene Stämme im Glykosylierungsmuster unterscheiden und zu Läsionen in unterschiedlichen Hirnregionen führen. Zudem unterscheiden sich die Glykosylierungsmuster verschiedener Hirnbezirke (Hecker, Taraboulos, et al. 1992; Somerville & Ritchie 1990; Collinge, Sidle, et al. 1996; Parchi, Capellari, et al. 1997; DeArmond, Qiu, et al. 1999; Somerville 1999).

Den Beweis für die Gültigkeit einer der beiden Theorien können nur transgene Mäuse bringen, die unglykosyliertes Prionprotein exprimieren. Diese können dann mit verschiedenen Scrapiestämmen inokuliert werden. Nach dem Erkranken der Mäuse könnte dann in Subpassagen ermittelt werden, ob Stammeigenschaften erhalten bleiben.

1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung der Glykosylierung des Prionproteins für die Pathogenese der Scrapie-Erkrankung untersucht werden und dabei die Frage bearbeitet werden, ob Glykosylierungsunterschiede Stammeigenschaften von Scrapiestämmen vermitteln können. Aus diesem Grund sollten verschiedene transgene Mäuse hergestellt werden, die un- bzw. monoglykosyliertes Maus-Prionprotein exprimieren.

Ziel war es, Glykosylierungsmutanten von PrP^{sen} zu finden, die sich möglichst wie Wildtyp-PrP verhalten. Sie sollten auf der Zelloberfläche nachweisbar und in eine Proteinase K-resistente Isoform umfaltbar sein und so eine Infizierbarkeit transgener Tiere gewährleisten. Deshalb wurden zunächst verschiedene an der Erkennungsstelle für die Glykosylierung mutierte Maus-Prionproteine in Zellkultur exprimiert und charakterisiert. Um den möglichen Einfluss der Zelle auf die Glykosylierung und Expression zu untersuchen, wurden die Konstrukte in unterschiedlichen Zelllinien exprimiert.

PrP-Mutanten mit wildtypähnlichem Verhalten wurden anschließend zur Herstellung transgener Mäuse verwendet.

Der Ausgangspunkt der Arbeit ging im Wesentlichen auf zwei Publikationen zurück. Lehmann und Harris (Lehmann & Harris 1997) arbeiteten mit Glykosylierungsmutan-

ten in Zellkultur, während DeArmond et al. (DeArmond, Sanchez, et al. 1997) transgene Mäuse untersuchten (Tab. 2). Beide Gruppen führten durch Zerstörung der jeweiligen Erkennungssequenz für N-Glykosylierung (N-X-T wurde zu N-X-A mutiert) (Abb. 2) einen Verlust der entsprechenden Zuckerseitenkette herbei. Zellkulturversuche zeigten, dass PrP-Mutanten, denen die erste Glykosylierungsstelle fehlt, und unglykosylierte Mutanten nicht auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Dagegen waren PrP-Moleküle, denen die zweite Glykosylierungsstelle fehlte, und unter dem Einfluss von Glykosylierungshemmer synthetisiertes Wildtyp-PrP auf der Zelloberfläche nachweisbar.

Bei Versuchen mit transgenen Mäusen zeigten sich Parallelen: Die Deletion der ersten Glykosylierungsstelle alleine oder beider Glykosylierungsstellen führte zu einer geringen Prionprotein-Expression in den Tieren. Diese transgenen Mäuse waren resistent gegenüber einer Scrapie-Infektion. Eine Zerstörung der zweiten Glykosylierungsstelle störte weder PrP-Expression noch Infizierbarkeit. Die Tiere erkrankten allerdings erst nach einer sehr langen Inkubationszeit (>500 Tage). Es scheint, dass ein physiologischer PrP-Transport auf die Zelloberfläche Voraussetzung für die Infizierbarkeit ist.

Deshalb stellte sich hier die Aufgabe transgene Tiere herzustellen, deren glykosylierungsmutiertes PrP möglichst authentisch synthetisiert und auf die Zelloberfläche transportiert wird, um so eine Infizierbarkeit zu erhalten. Zunächst musste jedoch die grundsätzliche Frage geklärt werden, ob die beschriebenen Unterschiede im zellulären Stoffwechsel von PrP^{sen} Ursache der fehlenden Glykosylierung oder der eingeführten Mutationen waren. Die Tatsache, dass Wildtyp-PrP in Gegenwart des Glykosylierungshemmers Tunicamycin auf der Zelloberfläche detektiert werden konnte, legte die Vermutung nahe, dass es sich um eine mutationsbedingte Synthesestörung handelte. Deshalb wurden zunächst verschiedene an der Erkennungsstelle für die Glykosylierung mutierte PrP-Moleküle auf Synthese, Transport und Umfaltbarkeit in Zellkultur untersucht. PrP-Mutanten mit wildtypähnlichem Verhalten wurden dann zur Herstellung transgener Mäuse verwendet.

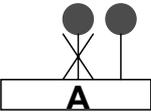
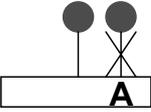
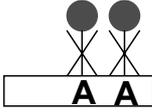
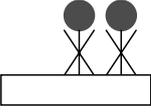
		Lehmann et al. 1997 CHO (Chinese hamster ovary)-Zellen, die 3F4 getagtes Maus-PrP exprimieren		DeArmond et al. 1997 transgene Mäuse, die Hamster-PrP exprimieren		
Mutation	Glykosyliert	Oberflächenexpression	PIPLC-Ablösbarkeit	PrP ^{sen} -Expression im Gehirn im Vergleich zu Wildtyp-SHa-PrP	Infektion mit Stamm Sc237	Infektion mit Stamm 139H
T182A 	Mono-	Lokalisation in Kompartiment proximal des mid-Golgi	nicht durchgeführt	Geringe Expression, Akkumulation intrazellulär	-	-
T198A 	Mono-	+	-	Expression wie Wildtyp-PrP	+ Inkubationszeit >500d im Vergleich zu 50d bei Wildtyp-PrP	-
T182A/T198A 	Un-	Lokalisation in Kompartiment proximal des mid-Golgi	nicht durchgeführt	Geringe Expression, Akkumulation intrazellulär	-	-
Wildtyp-PrP synthetisiert unter dem Einfluss von Tunicamycin 	Un-	+	+			

Tabelle 2: Literaturübersicht verschiedener Glykosylierungsmutanten

2 Material

2.1 Geräte

Blottinggerät, Trans-Blot, Semin-Dry Transfer Cell	Fa. Biorad, München
Brutschrank für Zellkultur	Fa. Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA
Downser	Fa. Hanting GmbH, Gattikon, Schweiz
Durchflusszytometer, FACStar ^{Plus}	Fa. Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Belgien
Elektrophoresekammer für Agarose-Gele	Eigenbau der BFAV, Tübingen
Elektrophoresekammern für SDS-PAGE, Mini-Gel-Elektrophorese-Apparatur	Fa. Bio-Rad, München
Filmkassette, Filmkassette „Gevamatic“	Fa. AGFA, Köln
Kühlzentrifuge (klein), Centrifuge 5417R	Fa. Eppendorf , Hamburg
Kühlzentrifuge (groß), Centrifuge J2-21	Fa. Beckmann, Stuttgart
Heraeus-Kühlzentrifuge, Varifuge 3.0R	Fa. Heraeus, Hanau
Mikroskope:	
Fluoreszenzmikroskop	Fa. Leitz, Wetzlar
Invertmikroskop	Fa. Leitz, Wetzlar
Mikroskope und Lupen zur Herstellung transgener Mäuse	Fa. Leitz, Wetzlar
PCR-Block, Trio-Thermocycler	Fa. Biometra, Göttingen
Rotoren:	
Ja 17	Fa. Beckmann, Stuttgart
TLA100.4	Fa. Beckmann, Stuttgart

Schüttelinkubator, Model G25	Fa. Brunswick Scientific CO-INC, New Jersey, USA
Sequenziergerät, 377 DNA Sequencer (ABI-PRISM)	Fa. Perkin Elmer, Weiterstadt
Sofortbildkamera, MP4 land camera	Fa. Polaroid, St.Albanus, England
Spannungsquellen, Power Supply Pac 200 und 300	Fa. Bio-Rad, München
Spektrometer, DU-40	Fa. Beckmann, Stuttgart
Thermomixer, Thermomixer 5436	Fa. Eppendorf, Hamburg
Tischhomogenisator, Ultra-Turrax	Fa. Janke und Kunkel, Breisgau
Tischzentrifuge, Biofuge pico	Fa. Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge, Optima, TL Ultracentrifuge	Fa. Beckmann, Stuttgart
UV-Transilluminator,	Fa. UVP, San Gabriel, Kalifornien,
UV-Transilluminator-Illumimeter	USA
Vortex, Vortex-Genie	Fa. Bachofer, Reutlingen

2.2 Chemikalien

Acrylamid für Sequenzier-Gel	Fa. Bio-Rad, München
Aether für Narkose	Fa. Riedel-de Haen, Seelze
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Fa. Merck, Darmstadt
Azeton	Fa. Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Fa. Difco Laboratories, Michigan, USA
Bis-Acrylamid für Westernblot	Fa. Roth, Karlsruhe
Borsäure, Borat	Fa. Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau-Natriumsalz, reinst	Fa. Serva, Heidelberg
CaCl ₂ , Kalziumchlorid	Fa. Sigma, Deisenhofen
DABCO, Diazabicyclol	Fa. Sigma, Deisenhofen
DOC, Deoxycholat, reinst	Fa. Serva, Heidelberg
DMSO, Dimethylsulfoxid	Fa. Merck, Darmstadt
DTT, 1,4, Dithiothreitol	Fa. Merck, Darmstadt
EDTA, Ethylendiamintetraacetat	Fa. Sigma, Deisenhofen
EGTA, Ethylenglycerol-bis- (β -aminoethylether)-N,N,N,N-Tetraacetat	Fa. Sigma, Deisenhofen
Essigsäure (100% Eisessig)	Fa. Merck, Darmstadt
Ethanol, rein	Fa. Roth, Karlsruhe
Ethanolamin	Fa. Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Fa. Boehringer, Mannheim
Formamid	Fa. Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Fa. Merck, Darmstadt
Glycin	Fa. Scharlau, Barcelona, Spanien
Guanidiniumhydrochlorid (Aminomethanamidine)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Harnstoff für Sequenzier-Gele	Fa. Bio-Rad, München
Harnstoff	Fa. Bio-Rad, München
HCl, Salzsäure 37%	Fa. Riedel-de Haen, Seelze
Isopropanol	Fa. Sigma, Deisenhofen
KCl, Kaliumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt

KH ₂ PO ₄ , Kaliumdihydrogenphosphat	Fa. Sigma, Deisenhofen
Loading Puffer für Sequenzier-Gele	Fa. Bio-Rad, München
Magermilchpulver	Fa. Heirler Genovis GmbH, Radolfzell
MgCl ₂ , Magnesiumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Fa. Sigma, Deisenhofen
Methanol	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumzitat	Fa. Merck, Darmstadt
NaCl, Kochsalz	Fa. Riedel-de Haen, Seelze
sterile Kochsalzlösung 0.9%	Fa. Braun, Mehlsungen
NaOH, Natronlauge	Fa. Riedel-de Haen, Seelze
NaHCO ₃	Fa. Fluka, Neu-Ulm
NaH ₂ PO ₄ , Natriumdihydrogen-Phosphat-Monohydrat	Fa. Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ , Di-Natriumhydrogen-Phosphat-Dihydrat	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumazid	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Fa. Sigma, Deisenhofen
NEM, N-Ethylmaleinimide	Fa. Calbiochem, La Jolla, Kalifornien, USA
NP-40, Nonidet P40	Fa. Roth, Karlsruhe
Orange G	Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
Paraformaldehyd	Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid	Fa. Boehringer, Mannheim
Polybrene, Hexadimethrinbromid	Fa. Sigma, Deisenhofen
PJ, Propidiumiodid	Fa. Sigma, Deisenhofen
Protein A-Sepharose	Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Sarkosin	Fa. Sigma, Deisenhofen
Sepharose, CNBr-activated	Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
SDS, Dodecylsulfat Natriumsalz	Fa. Merck, Darmstadt

Sucrose=Saccharose	Fa. Sigma, Deisenhofen
Sulfo-Biotin-X-NHS	Fa. Calbiochem, La Jolla, Kalifornien, USA
Temed (N, N, N, N Tetramethylethylendi- amin)	Fa. Bio-Rad, München
Triethylamin	Fa. Merck, Darmstadt
TRIS, Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan	Fa. Life Technologies, Eggenstein
Triton X-100, t-Oktylphenoxypoly- Ethoxyethanol	Fa. Serva, Heidelberg
TritonX-114, Oktylphenoxypoly- Ethoxyethanol	Fa. Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Fa. Serva, Heidelberg
Trypsin (Trypsin 250)	Fa. Difco, Detroit, Michigan, USA
Trypton	Fa. Difco, Michigan, USA
Tween 20 (Polyoxy-Ethylensorbitan- Monolaurat)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Versen (EDTA-disodium)	Fa. Serva, Heidelberg
Xylencyanolblau, Xylencyanol FF	Fa. Fluka, Neu-Ulm
Yeast-Extrakt	Fa. Difco, Detroit, Michigan, USA

2.3 Enzyme

Endo H, Endoglykosidase H	Fa. Boehringer, Mannheim
PIPLC; Phosphatidylinosit-Phospholipase C	Fa. Sigma, Deisenhofen
PK, Proteinase K	Fa. Boehringer, Mannheim
PNGase F, N-Glykosidase F, rekombinant	Fa. Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzyme	Fa. NEB, Schwalbach
RNase A	Fa. Boehringer, Mannheim
SAP (Shrink alkaline phosphatase)	Fa. Amersham Lifescience, Little Chalfont, England
Taq-Polymerase Kit	Fa. Qiagen, Hilden
T4-Ligase	Fa. Boehringer, Mannheim
Vent-Polymerase Kit	Fa. NEB, Schwalbach

2.4 Antibiotika und Hormone

Ampicillin	Fa. Boehringer, Mannheim
Stammlösung: 50mg/ml in ddH ₂ O	
Verwendet: 1ml Stammlösung/l	
Kanamycin	Fa. Sigma, Deisenhofen
Verwendet: 30µg/ml	
Penicillin, Natriumsalz	Fa. Grünenthal, Stolberg
Stammlösung: 1Mega/5ml BFA 37	
Verwendet: 1ml Stammlösung/l	
Streptomycin, Natriumsalz	Fa. Serva, Heidelberg
Stammlösung: 1g/5ml BFA 37	
Verwendet: 0.5ml Stammlösung/l	
Zeocin	Fa. Invitrogen, Leek, Niederlande
Stammlösung: 100mg/ml	
Verwendet: 5mg/l	
PMSF, pregnant mare serum gonadotropin	Fa. Intervet GmbH, Tönisvorst
Intergonan	
HCG, Human chorionic gonadotropin	Fa. Intervet GmbH, Tönisvorst
Ovogest	

2.5 Verbrauchsmaterial

Blotmembran Immobilon P (PVDF)	Fa. Millipore, Bedford, M.A.
Bluecap; sterile Plastikzentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Fa. Greiner, Nürtingen
Eppendorfgefäße	Fa. Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyerkolben	Fa. Schott, Mainz
Einfrierröhrchen für Zellen	Fa. Greiner, Nürtingen
Einfrierröhrchen für retrovirushaltigen Überstand	Fa. G. Kisker, Mühlhausen
FACS-Röhrchen	Fa. Falcon-Crest, Becton-Dickinson, New Jersey, USA
Gewebekulturflaschen	Fa. Greiner, Nürtingen
Gewebekulturplatten	Fa. Greiner, Nürtingen
Gitternetz, feinmaschig	Fa. Regina Zindler, Auerbach
Kanülen	Fa. Terumo, Leuven, Belgien
Kimwipe	Fa. Kimberley-Clark
Plastikplatten für Agar	Fa. Greiner, Nürtingen
Polaroidfilm 667	Fa. Polaroid, St. Albanus, Hertford- shire, U.K.
Polaroidfilm (Negativ)	Fa. Polaroid, St. Albanus, Hertford- shire, U.K.
Reagenzgläser	Fa. Schott, Mainz
Spritzen	Fa. Braun, Melsungen
Transponder ID-100, Trovan	Fa. EuroI.D. Identifikationssysteme GmbH, Weilerswist
Whatmanpapier	Fa. Maidstone, Kent, UK
Zentrifugenröhrchen Centrifuge Tubes, Polycarbonate Thick Wall, 3,2ml; 13×56mm	Fa. Beckmann, Palo Alto, Kalifornien, USA

2.6 Plasmide

pcDNA3.1/Zeo(+)

pcDNA3.1/Zeo(+)_{mus3F4}

pEGFP-N3

phgPrP

pSFF

Fa. Invitrogen, Leek, Niederlande

Dieses Plasmid wurde von Berthold Teufel im Rahmen seiner Dissertation innerhalb der Arbeitsgruppe M.H. Groschup an der BFAV hergestellt.

Fa. Clontech, Heidelberg

Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von M. Fischer aus der Arbeitsgruppe C. Weissmann, Zürich, zur Verfügung gestellt (Fischer, Rulicke, et al. 1996)

Dieses Plasmid wurde uns freundlicherweise vom Rocky-Mountain-Laboratory, Montana, USA, zur Verfügung gestellt (Bestwick, Kozak, et al. 1988)

2.7 Bakterien

E. coli XL1-Blue

E. coli JM-109

Fa. Stratagene, Heidelberg

Fa. Stratagene, Heidelberg

2.8 Antikörper, Antiseren, Konjugate

2.8.1 Antikörper

mAk3F4-Aszites Fa. Senetek, Maryland Heights, Montana, USA; erkennt Methionin an Position aa109 und 112 des humanen, hamster und felinen PrP (Kascsak, Rubenstein, et al. 1987). Maus-PrP wird nicht erkannt. Die Aminosäuren Methionin an Position aa109 und aa112 liegen tief in zwei getrennten hydrophoben Taschen, in die das Fab-Stück des Antikörpers hineingreift und bindet (Kanyo, Pan, et al. 1999). Dieser Antikörper (IgG2a, kappa-Kette) wurde, sofern nichts anderes vermerkt, in der Verdünnung 1:3000 zur Westernblot-Analyse eingesetzt.

mAk3F4-Berlin Dieser Antikörper wurde uns freundlicherweise von Dr. Michael Beekes vom Robert-Koch-Institut, Berlin zur Verfügung gestellt und erkennt dasselbe Epitop wie mAk3F4-Aszites. Dieser Antikörper wurde aus konzentriertem Hybridomaüberstand gewonnen. Sofern nichts anderes vermerkt, wurde er in der Verdünnung 1:3000 zur Westernblot-Analyse eingesetzt.

mAkSAF70 Dieser monoklonale Antikörper wurde gegen saure acidophile Fibrillen vom Hamster hergestellt mit dem Hamsterpeptid PrP aa142-160 (GNDWEDRYREN-MNRYPNQ) und detektiert PrP von Hamster, Rind, Schaf, Maus und Mensch (Demart, Fournier, et al. 1999). Dieser IgGg2bk-Antikörper wurde, sofern nichts anderes vermerkt, in der Verdünnung 1:6000 zur Westernblot-Analyse eingesetzt.

mAk6H4 Fa. Prionics, Zürich; ist gegen die Sequenz DYEDRYRE gerichtet (aa144-152 im humanen PrP) (Korth, Stierli, et al. 1997). Er erkennt Schaf-, Mensch-, Hase-, Nerz-, und Rinder-PrP. Maus-, Ratte- und Hamster-PrP wird detektiert, obwohl an Position 145 bei diesen Tierarten Tyrosin durch Tryptophan ersetzt ist. Dieser Antikörper wurde, sofern nichts anderes vermerkt, in der Verdünnung 1:10000 zur Westernblot-Analyse eingesetzt.

mAk3B5 bindet an die Oktarepeatregion des Prionproteins und wurde mit dem Peptid aa51-72 (human) hergestellt. Dieser Antikörper erkennt PrP von Maus, Mensch, Schaf und Rind (Bodemer 1999). Der Antikörper wurde, sofern nicht anders vermerkt, im Verhältnis 1:200 zur Westernblot-Analyse eingesetzt.

mAk anti His Dieser Antikörper wird von der Fa. Quiagen, Hilden vertrieben und erkennt Proteine mit dem „His-tag“ (Aminosäureabfolge, die dieser Antikörper spezifisch erkennt). Dieser Antikörper wurde, sofern nicht anders vermerkt, im Verhältnis 1:2000 zur Westernblot-Analyse eingesetzt.

mAk2D6 Dieser Antikörper wurde von Jeanne Grosclaude (INRA, Paris) zur Verfügung gestellt. Er erkennt aa146-182 im Schafprionprotein und die entsprechende Region des Maus-Prionproteins. Dieser Antikörper wurde noch nicht veröffentlicht. Sofern nichts anderes vermerkt, wurde er im Verhältnis 1:10000 eingesetzt.

2.8.2 Antiseren

Ra5/7 und Ra10/7 Diese polyklonalen Antiseren wurden durch die Immunisierung von Kaninchen mit einem synthetischen Peptidkonjugat nach der murinen Aminosäuresequenz THNQWVKPSKPTNLK (entspricht aa94-109 im murinen PrP) gewonnen (Groschup & Pfaff 1993). Sie erkennen Maus-PrP. Schaf- und Rinder-PrP werden nur schlecht erkannt. Diese Antiseren wurden, sofern nicht anders vermerkt, im Verhältnis 1:2000 zur Westernblot-Analyse eingesetzt.

Ra18/4 Das Serum wurde durch Immunisierung eines Kaninchens mit einem synthetischen Peptidkonjugat nach der Schaf-Aminosäuresequenz RYPGQGSPGGNRYP-PQG (entspricht aa37-53 im murinen PrP) gewonnen (Groschup, Harmeyer, et al. 1997). Es erkennt PrP^{sen} von Schaf, Rind, Ziege, Schwein, Mensch, Hund, Katze, Nerz, Ratte, Maus und Hamster. PrP^{sen} von Kaninchen und Meerschwein werden nicht erkannt. Dieses Antiserum wurde, sofern nicht anders vermerkt, im Verhältnis 1:100 zur Westernblot-Analyse eingesetzt.

Ra38/16 Das Serum wurde durch Immunisierung eines Kaninchens mit einem synthetischen Peptidkonjugat nach der Schaf-Aminosäuresequenz ESQAYYQRGASVILF-SSPPVI (entspricht aa220-235 im murinen PrP) gewonnen (Groschup, Harmeyer, et al. 1997). Dieser Antikörper wurde, sofern nicht anders vermerkt, im Verhältnis 1:100 zur Westernblot-Analyse eingesetzt.

2.8.3 Konjugate

FACS-Analyse

IgG G α M-PE

Jackson-ImmunoResearch-
Laboratories, West-Grove,
Pennsylvania, USA

IgG G α M-2a-FITC

Jackson-ImmunoResearch-
Laboratories, West-Grove,
Pennsylvania, USA

Westernblot

Streptavidin-Peroxidase

Fa. Dianova, Hamburg

Peroxidase gekoppelt Ziege-anti-Maus

Fa. Dianova, Hamburg

Peroxidase gekoppelt Schaf-anti-Kaninchen

Fa. Boehringer, Mannheim

Immunfluoreszenz

Biotinylierter α -Maus-AK

Fa. Dianova, Hamburg

Streptavidingekoppeltes DTAF Fluorescein-
conjugated Streptavidin

Fa. Dianova, Hamburg

2.9 Medien

2.9.1 Bakterienkultur

LB (Luria-Broth)-Medium für Flüssigkultur (1 Liter)

Trypton	10g
Yeast-Extrakt	5g
NaCl	10g
ad 1 l ddH ₂ O	

LB (Luria-Broth)-Medium für Agarplatten (1 Liter)

LB (Luria-Broth)-Medium für Flüssigkultur	1 l
Agar	15g

Zur Selektion von Bakterien mit bestimmter Resistenz erfolgte der Zusatz folgender Antibiotika:

Ampicillin	50µg/ml
Kanamycin	50µg/ml

2.9.2 Zellkultur

Kulturmedien

Die Grundmedien (MEM-NEAA (BFA 37), RPMI 1640 (BFA31), F12, Dulbecco's MEM (BFA34) wurden als Pulvermedien von der Fa. Life Technologies, Eggenstein, bezogen, während Opti-MEM und FCS als Flüssigmedium gekauft wurden.

Einfriermedium

Entsprechendes Kulturmedium	
FCS	20%
DMSO	16%

F12-Medium (1 Liter)

F12	10,6g
NaHCO ₃	3,7g
ad 1 l ddH ₂ O	

2.9.3 Mikroinjektion

Stammlösungen zur Herstellung von M2- und M16-Medium

Konzentrat A (10×)	100ml	mM
NaCl	5,533g	94,66
KCl	0,356g	4,78
KH ₂ PO ₄	0,162g	1,71
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,293g	1,19
Natriumlactat (of 60% syrup)	4,349g (=3,35ml)	
Glucose	1,000g	5,56
PenG, Ksalt (767 IU/mg)	0,060g	
Streptomycinsulfat	0,050g	

Konzentrat B (10×)	100ml	
	für M16	für M2
NaHCO ₃	2,101g	4,15g
Phenolrot	0,010g	

Konzentrat C (100×)	100ml	mM
Na-pyruvat	0,036g	0,33

Konzentrat D (100×)	100ml	mM
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,252g	1,71

Konzentrat E (10×)	100ml	
	für M16	für M2
HEPES	5,958g	20,85g
Phenolrot	0,010g	

Zur Herstellung der Puffer A-D:

Wiegegenauigkeit 1mg, dann mit Ultrapure Wasser auf jeweiliges Volumen einstellen

Zur Herstellung von Puffer E:

Hepes und Phenolrot im Becherglas einwiegen, 50ml Ultrapure Wasser dazugeben, mit 2M NaOH pH auf 7,2-7,4 einstellen (Zugabe von etwa 2,5ml) und mit Ultrapure Wasser auf 100ml auffüllen.

Zur Herstellung von M2 aus Konzentraten (100ml)

Konzentrat A	10ml
Konzentrat B	1,6ml
Konzentrat C	1,0ml
Konzentrat D	1,0ml
Konzentrat E	8,4ml
Ultrapure-H ₂ O	78,0ml
BSA	400mg

Zur Herstellung von M16 aus Konzentraten (100ml)

Konzentrat A	10ml
Konzentrat B	10ml
Konzentrat C	1,0ml
Konzentrat D	1,0ml
Ultrapure-H ₂ O	78,0ml
BSA	400mg

Da diese Lösung nicht gepuffert ist, muss sie bei Verwendung im Zellkulturbrutschrank (CO₂-Atmosphäre) gelagert werden.

Zur Herstellung von Hyaluronidase-Lösung

1%ige (w/v) Stammlösung

10mg Hyaluronidase (Typ IV-S aus Rinderhoden, Sigma H-38884) in 1ml physiologische NaCl-Lösung lösen. Diese Stammlösung (1% w/v) wird in Portionen zu 20 μ l aliquotiert und bei -20°C gelagert.

300 μ g/ml Gebrauchslösung: Zu 20 μ l Stammlösung 667 μ l M2-Medium zugeben.

2.10 Puffer und Lösungen

2.10.1 Standardpuffer

PBS, Phosphat gepufferte Salzlösung, pH 7,4, (10 Liter)

NaCl	80g	140mM
KCl	2,0g	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	11,5g	6.5 mM
KH ₂ PO ₄	2,0g	1.5 mM
CaCl ₂	1,3g	0.7 mM
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	1,0g	0.5 mM

Na₂HPO₄ und KH₂PO₄ müssen heiß gelöst werden.

TBE-Puffer (10 \times), (1 Liter)

Tris	108g	0,9M
Borsäure	55g	0,9M
0,5M EDTA, pH 8,0	40ml	50mM

mit ddH₂O auf 1 Liter auffüllen

2.10.2 Lösungen und Puffer für „Miniprep“ und DNA-Isolierung

3M Na-Azetat, pH 5,2

TE-Puffer, pH 8,0

Tris	10mM
EDTA	0,1mM

TENS (100ml)

1M Tris/HCl, pH 7,8	1ml	10mM
5M NaOH	2 ml	100mM
0,5M EDTA, pH 8	0,2 ml	1mM
20%ige SDS-Lösung	2,5 ml	

Mausschwanz-Lysispuffer (1 Liter)

KCl	3,73g	50mM
1M Tris/HCl, pH 9,0	10ml	10mM
NP40	4,5ml	0,45% (v/v)
Tween 20	4,5ml	0,45% (v/v)

2.10.3 Lösungen und Puffer für Zellkultur

Sucrose-EGTA-EDTA, pH 7,8

Sucrose	85,5g	250mM
EDTA	0,073g	0,25mM
Tris	3,63g	30mM
EGTA	0,048g	0.125mM

ad 1 Liter ddH₂O

Trypanblaulösung

0,25% (w/v) Trypanblau in 0,15M NaCl

VT-Lösung (10×), (1 Liter), d.h. 0,25% Trypsin in Versenpuffer

NaCl	80g
KCl	2g
Na ₂ HPO ₄	11,5g
KH ₂ PO ₄	2g
Trypsin	25g
Versen (EDTA) pH 7,2-7,4	12,5g

wird als Einfachlösung verwendet.

Versen (1 Liter)

NaCl	8g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,15g
KH ₂ PO ₄	0,02g
Versen	0,012g

Trypsin 5%ig

Bidest	475ml
NaCl	4g
KCl	0,2g
Trypsin	25g

1 Stunde bei Raumtemperatur rühren und dann bei 3000UPM. 15 Minuten zentrifugieren.

2.10.4 Agarose-Gel-Elektrophorese: Lösungen, Puffer und Längenmarker

TAE-Puffer (20×), pH 8,3, (2 Liter)

Tris	193,6g	800mM
Natriumazetat × 3H ₂ O	108,8g	400mM
EDTA	23,6g	40mM

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit Essigsäure (ca. 40ml).

Nativ-Farbmarker

Bromphenolblau	0,1% (w/v)
Xylencyanolblau	0,2% (w/v)
Orange G	0,2% (w/v)
EDTA	20mM
Sucrose	50% (w/v)

Ethidiumbromid

Stammlösung: 10 mg/ml

Für das Ethidiumbromidbad wurde die Lösung auf 0,5 μ g/ml mit ddH₂O verdünnt.

Längenmarker

λ -DNA/ECO47III/ECO91I	Fa. MBI, Fermentas, Litauen
λ -DNA/ECO47I (<i>AvaII</i>)	Fa. MBI, Fermentas, Litauen

2.10.5 Puffer zur Lyse und Homogenatherstellung

Sucrose-DOC-NP40-Puffer

Sucrose	0,32M
DOC	0,5% (w/v)
NP40	0,5% (v/v)

PrP^{res}-Lysispuffer (1 Liter)

1M TrisHCl, pH 7,5	10ml	10mM
5M NaCl	20ml	100mM
0,5M EDTA	20ml	10mM
TritonX100	5ml	0.5% (v/v)
DOC	5g	0.5% (w/v)

2.10.6 Puffer zum Verdau mit PNGase F und Endo H

Denaturierungspuffer (10 \times)

SDS	5%
β -Mercaptoethanol	10%

PNGase F-Inkubationspuffer (10×), pH 7,5

0,5M Natriumphosphat

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgt durch das Austitrieren von 0,5M NaH₂PO₄ (pH 4) mit 0,5M Na₂HPO₄ ,pH 9.

Endo H-Inkubationspuffer (10×), pH 5,5

0,5M Natriumzitat

2.10.7 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie

FACS-Puffer

PBS mit 2%igem FCS

PJ-Stammlösung

1mg/ml Propidiumiodid in PBS

2.10.8 SDS-PAGE und Westernblot: Puffer, Lösungen und Molekulargewichtsmarker

Proben-Puffer (10×), (20ml)

20%ige SDS	2,0g	
1M TrisHCl, pH 7,4	5ml	500mM
5%iges Mercaptoethanol	5ml	
Sucrose	3g	87,6 mM

pH 6,8 mit HCl einstellen, zum Schluß: fünf Tropfen 1%ige Bromphenolblaulösung

Blotting-Puffer, (1 Liter)

Tris	3,03g	25mM
Glycin	14,4g	192mM
Methanol	200ml	20% (v/v)
SDS	2g	0,2%

ddH₂O ad 1l; pH 8,3; **auf keinen Fall einstellen mit HCl**; zerstört Elektroden der Apparatur

Elektrophorese-Puffer (10×), (1 Liter)

Tris	30g	0,25M
Glycin	144g	1,92M
SDS	10g	1% (w/v)

Ad 1l ddH₂O; pH 8,4-8,6; zunächst nur 500ml ddH₂O zugeben, dann pH einstellen.

Molekulargewichtsmarker

ECL-Molekulargewichtsmarker (14,4kDa bis 97,4kDa)	Fa. Amersham, Freiburg
Molekulargewichtsmarker (16 bis 21kDa in 1kDa Abständen)	Dieser Marker wurde von Dr. Martin Eiden in der Arbeitsgruppe hergestellt. Die Detektion des Längenmarkers wird durch den „His-Tag“ ermöglicht.

2.10.9 Puffer und Lösungen für Disulfidtest

NEM-Lyse-Puffer, (10ml)

TritonX100	50 μ l	0,5% (v/v)
0,2M Stammlösung EDTA, pH 6,8	50 μ l	1mM
1M Stammlösung NEM (3,125g NEM in 25ml EtOH; dunkel lagern, bei -20°C 2 Jahre haltbar)	200 μ l	20mM
0,1M Stammlösung PMSF	100 μ l	1mM

in 10ml PBS lösen, dunkel verarbeiten

Probenpuffer nicht reduzierend, (10ml)

0,5M Stammlösung TrisHCl, pH 6,8	8ml	400mM
SDS	0,6g	6% (w/v)
86%iges Glycerin	2ml	20%
0,2M Stammlösung EDTA, pH 6,8	100 μ l	2mM
0,01%iges Bromphenolblau	0,001g	

DTT, (750 μ l)

DTT	0,0308g	300mM
-----	---------	-------

ad 750 μ l H₂O

2.10.10 Lösungen für Sequenzierung**Biorad Acrylamid Gel**

Harnstoff	21g
Wasser	20ml
Acrylamid 30%	8,4ml
10 \times TBE	6ml
10% APS	350 μ l
Temed	15 μ l

2.10.11 Puffer und Lösungen für Immunpräzipitation**DLPC-Puffer, (50ml)**

1M Tris HCl, pH 8,2	2,5 ml	0,05M
NaCl	0,438 g	0,15M
N-Laurylsarcosin	1g	2% (w/v)
L- α -Lecithin	0,2g	0,4% (w/v)

auf 50ml mit ddH₂O auffüllen und ultrabeschallen. Kurz vor Gebrauch Zugabe von

0.1M PMSF	250 μ l	0,5mM
25mg/ml Leupeptin	10 μ l	0,5 μ g/ml
25mg/ml Pepstatin	14 ml	0,7 μ g/ml
Pefabloc		0,1M

Sarkosinpuffer, (500ml)

0,5M von Lösung Tris, pH 7,0	50ml	50mM
NaCl	14,61g	0,5% (w/v)
Sarkosin	5g	1% (w/v)

Auffüllen mit ddH₂O

Kopplungspuffer

NaHCO ₃ , pH 8,3		0,1M
NaCl		0,5M

I-Puffer, (1 Liter)

NaCl	5,844g	100mM
EDTA	2,922g	10mM
1M TrisHCl pH7,4	10ml	10mM
NP40	5ml	0,5%
DOC	5g	0,5%

2.10.12 Puffer und Lösungen zur Aufreinigung von Primern

10% APS-Lösung

10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in 1× TBE

FA-Farbmarker

Formamid	47,5% (v/v)
EDTA	10mM
Bromphenolblau	0,025% (w/v)
Xylencyanolblau	0,025% (w/v)

1M TEAB-Puffer, pH 7,2, (500ml)

Triethylamin	50,6ml
--------------	--------

ad 500ml ddH₂O

In das zweiphasige Gemisch wurde CO₂ eingeleitet, bis sich die Phasen vermischt hatten und der pH-Wert bei 7,2 lag.

Acrylamidstammlösung

Acrylamid	10% (w/v)
Harnstoff	7M

in 0,5×TBE-Puffer

2.10.13 Komplettsysteme (Kits)

BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	ABI Prism, Perkin-Elmer, Weiterstadt
JETstar Plasmid Maxi Kit	Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
LipofectAMINE Reagent	Life Technologies, Eggenstein
Mammalian Transfection Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

2.10.14 Zellen und Inokulate

N2a-Zellen Maus-Neuroblastomzellen ATCC CCL-131 (Olmstedt 1970)

CHO-Zellen Chinese-Hamster-Ovary-Zellen ATCC CCL-61 (Puck 1958)

ScN2a-Zellen Bei dieser Zelllinie handelt es sich um die heute fast ausschließlich zur PrP^{res}-Erforschung genutzte Neuroblastomzelllinie N2a (auch MNB genannt), die von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander mit dem Scrapiestamm Chandler infiziert wurde (Race, Fadness, et al. 1987; Butler, Scott, et al. 1988).

Ψ2-Zellen Bei dieser Zelllinie handelt es sich um murine Fibroblasten NIH3T3, welche stabil die Gene gag, env und pol des ekotropen „Moloney Murinen Leukämie Virus“ (M-MuLV) exprimiert (Mann, Mulligan, et al. 1983).

PA 317 Diese Verpackungszelllinie basiert ebenfalls auf NIH3T3-Zellen, die stabil die retroviralen Gene gag, env und pol des amphotropen M-MaLV exprimiert. (Miller & Buttimore 1986)

Chandler-Inokulat Dieser mausadaptierte Scrapiestamm (Chandler 1961) wurde von C. Weissmann, Eidgenössische Hochschule Zürich, zur Verfügung gestellt und an der BFAV in CD1-Mäusen passagiert.

Me7-Inokulat Dieser in C57BL/6J-Mäusen vermehrte mausadaptierte Scrapiestamm (Dickinson & Meikle 1969) wurde von M.E. Bruce, Neuropathogenesis Unit, Edinburgh zur Verfügung gestellt.

BSE-Inokulat Dieser Stamm wurde an der BFAV in C57BL/6J-Mäusen vermehrt und passagiert. Das Inokulum stammt von dem aus England importierten, deutschen Rind „Cindy“, das 1994 an der BFAV im BSE-Test positiv war (Kaaden, Truyen, et al. 1994).

79A-Inokulat Dieser in C57BL/6J-Mäusen vermehrte mausadaptierte Scrapiestamm

wurde von M.E. Bruce, Neuropathogenesis Unit, Edinburgh zur Verfügung gestellt.

2.11 Arbeiten mit infektiösem Material

2.11.1 Arbeiten mit Scrapie- und BSE-Material

Die Arbeiten mit Scrapie- und BSE-Material wurden in gesonderten, abgeschlossenen Räumen im Isolierteil der BFAV durchgeführt. Für diese Räume gelten besondere Sicherheitsbestimmungen nach der ABAS 603 (www.baua.de) wie z.B. das Tragen zusätzlicher Schutzkleidung, das Autoklavieren der Gebrauchsmaterialien und des Abfalls bei 136°C für vier Stunden bei mindestens 2bar Dampfdruck und die Dekontamination mit 2M NaOH oder Hypochlorid (2% freies Chlor: 13% aktives Chlor der Fa. Merck 1:5 verdünnt).

2.11.2 Arbeiten mit dem Retrovirussystem

Die Arbeiten mit dem Retrovirussystem fielen unter den vom Regierungspräsidium genehmigten Gentechnikantrag Az57-05/88/17.02/BFAV.Tü.01.08-12. Arbeiten mit dem Retrovirussystem wurden an einer dafür gesondert ausgewiesenen Sicherheitswerkbank unter zusätzlichen Sicherheitsbedingungen ausgeführt. Dabei wurde zusätzliche Schutzkleidung getragen, und Materialien wurden nach dem Verlassen der Sicherheitswerkbank mit Mikro- zid (Fa. Schülke und Mayr, Norderstedt) desinfiziert oder wie unter 2.11.1 beschrieben autoklaviert. Pipetten wurden in doppelt konzentrierter Lysetol-Lösung (20ml/l, Fa. Schülke und Mayr, Norderstedt) über Nacht dekontaminiert. Retrovirusüberstand produzierende Packzellen wurden in einem nur zu diesem Zweck ausgewiesenen Brutschrank gelagert. In den Stickstofftanks erfolgte die Lagerung ausschließlich in der Gasphase des flüssigen Stickstoffs. Arbeiten mit dem retroviralen Überstand wurden ausschließlich in dem für Arbeiten mit dem Scrapiererreger ausgewiesenen Labor durchgeführt und unterlagen somit den dort üblichen strengen Sicherheitsvorschriften.

2.12 Tiere und Tierhaltung

2.12.1 Tiere

PrP[%]-Mäuse: Bei diesen Mäusen wurden die aa4-187 des murinen Prion-ORF durch das Neomycin-Resistenzgen ersetzt. Die so durch homologe Rekombination entstandenen Mäuse exprimieren kein Prionprotein mehr und verhalten sich ansonsten wie Wildtypmäuse (Bueller, Fischer, et al. 1992). Diese Mauslinie wird in der Kleintierzucht der BFAV gezüchtet und wurde freundlicherweise von der Züricher Arbeitsgruppe von C. Weissmann zur Verfügung gestellt.

Tg20-Mäuse: Diese transgene Mauslinie wurde durch Mikroinjektion eines halbgenomischen, für murines PrP kodierenden Konstrukts in befruchtete Eizellen von PrP[%]-Mäusen generiert. Bei einer Kopienzahl von etwa 60 Kopien weisen homozygote Mäuse eine bis zu zehnfache PrP^{sen}-Expression im Vergleich zu Wildtypmäusen auf. Sie besitzen das für schnelle Inkubationszeit kodierende Gen Prnpa (Fischer, Rulicke, et al. 1996). Sie wurden uns von der Arbeitsgruppe C. Weissmann zur Verfügung gestellt und in der Kleintierzucht der BFAV weitergezüchtet.

C57BL : Diese Mauslinie wird in der Kleintierzucht der BFAV als Inzuchtlinie gehalten.

NMRI: Diese Mauslinie stammte aus der Zucht der zentralen Tierversuchsanlage der Universität Ulm.

2.12.2 Tierhaltung

Die transgenen Tiere wurden in der BFAV in einem geschlossenen Stall bei konstanter Temperatur von 23°C und zwölfstündigem Lichtprogramm (6-18 Uhr) gehalten. Es wurde Zuchtfutter 1003 der Firma Alma, Kempten, verwendet. Junge Mäuse wurden ab einem Alter von 18-21 Tagen „abgesetzt“. Weibliche Tiere wurden im Alter von 9-10 Wochen mit 8-9 Wochen alten Männchen verpaart. Tiere, die in einem Infektionsversuch eingesetzt wurden, wurden individuell durch die Implantation eines Transponders der Firma Euro-ID gekennzeichnet. Infizierte Tiere wurden in mit Schleusen versehenen Ställen im

Isolierteil der BFAV in Tübingen gehalten und viermal pro Woche auf ihr Allgemeinbefinden untersucht. Tiere mit klinischen Symptomen wurden durch CO₂-Intoxikation getötet.

2.12.3 Narkose

Ketamin/Xylazin-Narkose bei der Maus

Herstellung der Gebrauchslösung:

0,8ml 2% Xylazinhydrochlorid-Lösung (Rompun 2%, Fa. Bayer, Leverkusen)

1ml 10% Ketaminhydrochlorid-Lösung (Ketamin 10%, Fa. WDT, Garbsen)

1ml A. bidest.

In einer 5ml Spritze aufziehen und bei Raumtemperatur maximal 14 Tage lagern. Pro 10g Körpergewicht werden 30 bis 40 μ g der Gebrauchslösung subkutan verabreicht. Bei pauschaler Dosierung erhielten NMRI-Auszuchtweibchen etwa 100 μ l-120 μ l Gebrauchslösung.

2.13 Computer und Software

Durchflusszytometrie-Programm „Cellquest“ (Becton Dickinson), Macintosh quadra 650
Sequenzierung „Abi Prism 377 DNA Sequencer“ - Programm (Perkin Elmer), Power
Macintosh G3

„Westernblot Tina“-Software der Firma Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH

Swissprot-Software www.expasy.ch

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Gewinnen von DNA

Plasmidaufreinigung

”Miniprep” Mit dieser Methode können 2-10 μ g Plasmid-DNA isoliert werden. Die Miniplasmidisolierung erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen. Dazu wurden einzelne Bakterienkolonien von der Agarplatte gepickt und in Reagenzröhrchen mit jeweils 3ml ampicillinhaltigem (50 μ g/ml) LB-Medium über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C angezüchtet. Am folgenden Tag wurden 1.5ml der Bakteriensuspension in ein Eppendorfröhrchen überführt und bei 13000UPM, 30 Sekunden in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend bis auf 50 μ l abgenommen und das Bakterienpellet in dieser Restmenge mittels Vortex resuspendiert. Dann erfolgte die Zellyse mit 300 μ l TENS und sofortigem viersekundigen Vortexen. Die in diesem Puffer enthaltene Natronlauge lysiert die Bakterienmembranen, SDS bindet an chromosomale DNA und Proteine der Bakterien. Durch Zusatz von 150 μ l eiskaltem Natriumazetat und drei Sekunden Vortexen wurde der pH-Wert abgesenkt, so dass an SDS gebundene und große Bestandteile ausfallen. Diese wurden mittels Zentrifugation (14000UPM, 5 Minuten, 4°C) in der Kühlzentrifuge von plasmidhaltigem Überstand getrennt. Der Überstand wurde in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt und zum Erzielen einer höheren Reinheit nochmals einer Zentrifugation unterzogen. Die DNA des nun weitgehend partikelfreien Überstandes wurde durch die Zugabe von 800 μ l 100% reinem Ethanol gefällt und zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen (Kühlzentrifuge 14000UPM, 5 Minuten, 4°C). Das Pellet wurde dann in 25 μ l TE-Puffer mit 10 μ g/ml RNase aufgenommen.

”Maxiprep” Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden entweder 30 μ l Flüssigkultur oder eine Kolonie der entsprechenden Bakterien in 100ml ampicillinhaltiges (50 μ g/ml) LB-Medium gegeben und in einem 1 Liter Erlenmeyerkolben über Nacht, bei 37°C im Schüttelinkubator angezüchtet. Die Plasmidisolierung erfolgte dann mit dem JETstar-Kit der Firma Genomed nach Angabe des Herstellers. Dieses System beruht auf

einer modifizierten alkalischen-SDS-Lyse mit anschließender Präzipitation von chromosomaler DNA und Protein. Plasmid-DNA wurde dann an ein Anionen-Austauscher-Harz gebunden, gewaschen und anschließend bei hoher Salzkonzentration eluiert.

Präparation genomischer DNA Zur Analyse des Prnp-Gens lebender Mäuse wurden Schwanzspitzenbiopate genommen, welche dann in 300 μ l Mausschwanz-Lysispuffer (S. 45) mit 3 μ l PK (10 μ g/ml) im Thermomixer bei 55°C unter Schütteln über Nacht lysiert wurden. Eine weitere Aufreinigung der DNA war für den Einsatz in die PCR-Reaktion nicht notwendig.

Auftrennung, Isolierung und Aufreinigung von genomischer und Plasmid-DNA

Auftrennung Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelen. Eine Auftrennung erfolgt, da aufgrund der Siebstruktur dieser Gele die Poren kleineren Fragmenten weniger Widerstand leisten und diese somit schneller im Gel laufen. Die Laufstrecke verhält sich dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge.

Je nach Größe des erwarteten Fragments wurde eine Agarosekonzentration von 0,8-2% gewählt. Zur Herstellung der Gele wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer in der Mikrowelle fünf Minuten bei 500 Watt gekocht und anschließend in die Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit TAE-Puffer gefüllt. Die Proben wurden etwa im Verhältnis 1:10 mit Nativfarbmarker verdünnt und in der als geeignet erscheinenden Menge aufgetragen. Zum Größen- und Mengenvergleich diente eine definierte Menge verdaute λ -DNA. Die Auftrennung erfolgte bei maximal 6 V/cm Elektrodenabstand. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 15 Minuten in Ethidiumbromidlösung (EtBr 0,5 μ g/ml) inkubiert. Ethidiumbromid bindet interkalierend an DNA und erscheint im UV-Licht orange. Dokumentiert wurden die DNA-Gele mit Sofortbildkamera, Gelbfilter und Polaroidfilm.

Isolierung und Aufreinigung Das Fragment gewünschter Länge wurde unter UV-Licht-Kontrolle mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Aufreinigung erfolgte dann mit dem QIAquick-Gel-Extraction-Kit

gemäß Herstellerangaben. Die DNA wurde in 30 μ l Elutionspuffer aufgenommen, und 2,5 μ l dieser DNA-Lösung wurden dann zur Kontrolle im Agarose-Gel auf Größe und Menge des Fragments getestet.

Auftrennung, Isolierung und Aufreinigung von Primern

Auftrennung Die an der BFAV synthetisierten Oligonukleotide wurden an Synthescharz gebunden erhalten. Zum Lösen der Nukleotide vom Harz wurden die Proben eine Stunde mit 1ml Ammoniak (25%) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend eine Minute bei 13000UPM zentrifugiert. Danach wurde der Überstand über Nacht bei 56°C inkubiert, 5-20 Minuten bei -20°C gelagert und in der Speed-Vac getrocknet. Zur Abtrennung von störenden, kürzeren Syntheseprodukten wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 140ml 10% Acrylamidlösung mit 1ml 10% APS-Lösung und 40 μ l TEMED gemischt und in die Gelkammer gegossen. Nach der Auspolymerisation des Gels wurde ein Vorlauf von 30 Minuten bei 35 W mit 7M Harnstoff in den Geltaschen durchgeführt. Dann wurden die getrockneten Oligonukleotidproben in 200 μ l Farbmarker aufgenommen, bei 95°C fünf Minuten denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 35W, für ein bis zwei Stunden. Anschließend wurde unter UV-Kontrolle die Hauptbande eng ausgeschnitten.

Isolierung und Aufreinigung Die Gelstücke wurden über Nacht in 5ml 1M TEAB-Puffer bei 56°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine Sep-Pak-C18 Säule mit 500 μ l Acetonitril, 500 μ l 10mM TEAB-Puffer und mit 1ml 1M TEAB-Puffer äquilibriert und anschließend der Überstand des über Nacht inkubierten jeweiligen Gelstücks langsam auf die Säule geladen. Die Säule wurde dann mit 20ml 10mM TEAB-Puffer gewaschen und dreimal mit je 1ml 10mM TEAB-Puffer mit 30% (v/v) Acetonitril eluiert. Das Eluat wurde dann in der Speed-Vac getrocknet und in 100 μ l ddH₂O aufgenommen. Die Konzentration der Oligonukleotide wurde schließlich photometrisch bestimmt.

Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen Zur Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung wurden die Proben im Spektrum von 320nm bis 220nm Wellenlänge im Photometer gemessen. Über den gemessenen OD 260nm-Wert wurden die Nukleinsäurekonzentrationen bestimmt.

trationen nach folgenden Formeln bestimmt:

Für doppelsträngige DNA:

$OD\ 260nm \times \text{Verdünnung der DNA-Lösung} \times 50 = \mu\text{g DNA/ml}$

Für einsträngige DNA:

$OD\ 260nm \times \text{Verdünnung der Oligonukleotid-Lösung} \times 33 = \mu\text{g DNA/ml}$

Zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäurelösungen wurde die Absorption der DNA (OD 260nm) ins Verhältnis zur Absorption von Protein (OD 280nm) gesetzt. Bei einem Wert über 1,8 wurde die Reinheit der Nukleinsäurelösung als zufriedenstellend bewertet.

3.1.2 Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren

Spaltung mit Restriktionsenzymen Verdaut wurden immer 4 μg DNA des entsprechenden Vektors, bzw. 40 μl des entsprechenden PCR-Produkts oder 2 μl „Miniprepansatz“.

***Bsu36I*- und *BsteII*-Verdau**

Verdaut wurde mit *Bsu36I* für drei Stunden bei 37°C unter Zugabe von BSA (bovines Serumalbumin); anschließend wurde bei 60°C mit *BsteII* über Nacht geschnitten. Puffer: NebIII.

***NarI*- und *BsteII*-Verdau**

Mit *NarI* wurde über Nacht verdaut bei 37°C in Puffer NebI und anschließend mit *BsteII* bei 60°C in NebIII-Puffer geschnitten für drei Stunden.

***Bsu36I*- und *NarI*-Verdau**

Verdaut wurde über Nacht mit *NarI* bei 37°C in NebI-Puffer. Am folgenden Tag wurde mit *Bsu36I* in NebIII-Puffer für fünf Stunden weiterschnitten nach BSA-Zugabe.

***XmaI*- und *NarI*-Verdau**

Der Verdau erfolgte mit beiden Enzymen über Nacht in NebI-Puffer bei 37°C.

***XhoI*- und *BamHI*-Verdau**

Der Vektor pSFF wurde mit *XhoI* bei 37°C unter Zugabe von BSA in NebU-Puffer über Nacht verdaut. Anschließend wurde mit „Staraktivität“ aufweisendem *BamHI*-Enzym für zwei Stunden bei 37°C weiterverdaut. Konstrukte im Plasmid pcDNA3.1/Zeo(+) wurden mit *XhoI* und *BamHI* in NebU-Puffer in einem Ansatz über Nacht verdaut.

***NdeI*-, *SspI*-, *ApoI*-Verdau**

Erfolgte nach Herstellerangaben.

***PstI*- und *BstEII*-Verdau**

Der Vektor pcDNA3.1/Zeo(+)_{mus3F4} und die Inserts wurden für drei Stunden mit *PstI* in NEBIII-Puffer bei 37°C und anschließend mit *BstEII* für zwei Stunden bei 60°C im selben Puffer geschnitten.

Entfernen randständiger Phosphatgruppen Nach dem Restriktionsverdau bleiben an den 5'-Enden der DNA-Fragmente Phosphatreste zurück, die für die Ligation benötigt werden. Entfernt man diese mit einer Phosphatase, kann keine Selbstligation des Vektors mehr stattfinden. Das einzufügende Insert besitzt jedoch noch beide Phosphatreste und kann daher seinerseits immer noch mit der Vektor-DNA ligieren.

Dieses Verfahren wurde nur bei pcDNA3.1/Zeo(+)-Vektoren angewandt, da bei den großen Plasmiden pSFF und phgPrP mit dieser Methode ein Größtenverlust der Vektoren beobachtet wurde. Gearbeitet wurde mit SAP (Shrimp alkaline phosphatase). 25µl verdauter geleluierter Vektor wurden für drei Stunden bei 37°C mit 1,5µl Enzym und 2,8µl 10×Probenpuffer verdaut und anschließend für 20 Minuten auf 65°C erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren. Dieser Inaktivierungsschritt ist wichtig, damit in der nachfolgenden Ligation das Insert nicht durch das Enzym dephosphoryliert wird.

Ligation Bei der Ligation werden Vektor und gewünschtes Insert über 5'-Phosphatgruppen mit Hilfe des Enzyms Ligase und unter Anwesenheit von ATP verbunden.

Die Ligation wurde mit 0,5µl T4-Ligase, 1,5µl ATP-haltigem 10×Probenpuffer in einem Volumen von 15µl durchgeführt. Die jeweilige DNA-Menge der zu ligierenden Fragmente wurde zuvor im Agarose-Gel abgeschätzt. DNA-Fragment und Vektor wurden im molekularen Verhältnis 5:1 eingesetzt und die Reaktion über Nacht bei 14°C durchgeführt.

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR zur Einführung von Mutation, Schnittstelle oder Deletion

Zielgerichtete („site-directed“) PCR-Mutagenese Sie wurde zum zielgerichteten Austausch der Aminosäure Threonin gegen Alanin eingesetzt, um dadurch die Erkennungsstellen für N-Glykosylierung zu zerstören.

3'-Primer:

ngly182.rev: 5'-GGT GGT GGT GAC CGT GTG CTG CTT GAT GGC **a**AT ATT GAC GC-3'

(Position: bp 533-573 des Maus-ORF)

Dieser Primer führt an Kodon 182 des Maus-ORF einen Austausch von Threonin zu Alanin ein (fett) und enthält an Position bp 543 eine stille Mutation (Kleinbuchstaben), die eine zusätzliche Schnittstelle für das Enzym *SspI* einführt, welche zur Erkennung des mutierten Plasmids genutzt werden kann.

musnarxxho.rev: 5'-**CCC CCC TCG AGG** GCG CCA TCC CCA AAC AGT GGC TTC TTT GGT TG-3'

(Position bp 1138-1170 im 3'untranslatierten Bereich von Maus-Prnp und führt 3' eine *XhoI*-Schnittstelle an Position bp 1172 ein (fett))

5'-Primer:

ngly198.seq: 5'-GCA CAC GGT CAC CAC CAC CAC CAA GGG GGA GAA **t**TT CGC CGA GAC CG-3'

(Position: bp 555-601 des Maus-ORF)

Führt an Kodon 198 des Maus-ORF einen Austausch von Threonin zu Alanin ein (fett) und enthält an Position bp 588 eine stille Mutation (Kleinbuchstaben), die eine zusätzliche Schnittstelle für das Enzym *ApoI* einführt, welche zur Erkennung des mutierten Plasmids genutzt werden kann.

mu5.seq: 5'-GCG AAC CTT GGC TAC TGG CTG-3'

(Position: bp 4-24 des Maus-ORF)

Es wurden jeweils Reaktionen durchgeführt mit den Primern ngly198.seq und musnarxho.rev und dem Primerpaar mu5.seq und ngly182.rev. Die PCR-Reaktion wurde in einem TRIO-Thermoblock der Firma Biometra durchgeführt. Die Primer wurden an der BFAV synthetisiert. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50 μ l mit einer Konzentration der Nukleotidtriphosphate dGTP, dATP, dTTP und dCTP von jeweils 0,2mM, mit je 50pmol der entsprechenden Primer und der Zugabe von 5 μ l PCR-Puffer und 1U vent-Polymerase durchgeführt, welche über „Proof-reading“-Aktivität verfügt. Als Template wurden 0,2 μ g des Vektors pcDNA3.1/Zeo(+)/mus3F4 zugegeben.

Die PCR-Reaktion wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

2 Minuten initiales Schmelzen der DNA-Stränge bei 92°C

30 Schleifen mit

60 Sekunden Schmelzen bei 94°C (Denaturation)

60 Sekunden Anlagern der Primer bei 50°C (Annealing)

60 Sekunden Synthese von DNA-Strängen bei 72°C (Extension)

dann: 7 Minuten abschließende DNA-Synthese bei 70°C (Final extension)

Kühlen der Proben auf 4°C

„Wobble“-Mutagenese

5'-Primer:

mu5.seq : 5'-GCG AAC CTT GGC TAC TGG CTG-3'

(Position: bp 4-24)

3'-Primer:

PI.rev: 5'-GGT GGT GGT GAC CGT GTG CTG CTT GAT **SWW** GAT ATT GAC
GC-3'

PII.rev: 5'-GGT GGT GGT GAC CGT GTG CTG CTT GAT **SSS** GAT ATT GAC
GC-3'

PIII.rev: 5'-GGT GGT GGT GAC CGT GTG CTG CTT GAT **SSW** GAT ATT GAC
GC-3'

PIV.rev: 5'-GGT GGT GGT GAC CGT GTG CTG CTT GAT **SWS** GAT ATT GAC
GC-3'

(Position: bp 533-573 des Maus-ORF)

Diese Primer enthalten jeweils eine Mischung verschiedener Primer, wobei S die Basen G und C und W die Basen A und T symbolisiert. In der auf Seite 61 beschriebenen PCR-Reaktion wurde jeweils der Primer mu5.seq mit einem der „Wobble“-Primer kombiniert. In diesen vier PCR-Ansätzen sollten sich dann theoretisch alle Triplets befinden, die die 20 möglichen Aminosäuren an Kodon 182 einführen. Für die Aminosäureaustausche zu Arginin, Tryptophan, Methionin, Lysin, Valin, Glutamin, Glutaminsäure und Asparaginsäure hin wurde mit diesen „Wobble“-Primern kein entsprechend kodierendes Triplett erhalten. Deshalb wurde dann mit folgenden 3'-Primern gearbeitet:

Val182.rev: 5'-GGT GGT GGT GAC CGT GTG CTG CTT GAT **AAC** GAT ATT GAC
GC-3'

Gln182.rev: 5'-GGT GGT GGT GAC CGT GTG CTG CTT GAT **CTG** GAT ATT
GAC GC-3'

Glu182.rev: 5'-GGT GGT GGT GAC CGT GTG CTG CTT GAT **CTC** GAT ATT GAC
GC-3'

Asp182.rev: 5'-GGT GGT GGT GAC CGT GTG CTG CTT GAT **GTC** GAT ATT
GAC GC-3'

Lys182.rev: 5'-GGT GGT GGT GAC CGT GTG CTG CTT GAT **CTT** GAT ATT GAC
GC-3'

Met182.rev: 5'-GGT GGT GGT GAC CGT GTG CTG CTT GAT **CAT** GAT ATT
GAC GC-3'

Arg182.rev: 5'-GGT GGT GGT GAC CGT GTG CTG CTT GAT **TCT** GAT ATT GAC
GC-3'

Trp182.rev: 5'-GGT GGT GGT GAC CGT GTG CTG CTT GAT **CCA** GAT ATT GAC
GC-3'

(Position: bp 533-573 des Maus-ORF)

Fusions-PCR, auch „SOE-PCR“ genannt (splicing by overlap extension)

Diese Technik ermöglicht es an jeder beliebigen Stelle eines Gens gezielt Deletionen einzufügen. Man amplifiziert zwei sich überlappende Fragmente in getrennten Reaktionen mit Primern, die zur Sequenz vor und nach der Deletion komplementär sind. In einer weiteren Reaktion werden diese Fragmente dann zum gewünschten PCR-Produkt amplifiziert. Die PCR-Reaktion wurde mit der vent-Polymerase durchgeführt wie auf Seite 61 beschrieben. Es wurden folgende Primer verwendet.

5'-Primer:

N-sig-seq: 5'-gaA TCA GTC ATC **ATG** AAG CGG CCA AAG CCT GGA GGG-3'

(bindet an Position 12bp upstream vom Maus-ORF bis 90bp ORF; enthält 10bp vom Maus-Prnp upstream des Maus-ORF und 2bp (Kleinbuchstaben) vom pcDNA3.1/Zeo(+). Die ersten 23 Kodons des Maus-ORF fehlen, das **Startkodon** sitzt jetzt an Kodon 23.)

CMV.seq: 5'-cat atg cca agt acg ccc cct att gac g-3'

(bindet an Position 494-466bp upstream vom Maus-ORF im CMV-Promotor vom pcDNA3.1/Zeo(+))

3'-Primer:

BSTEII.rev: 5'-CAT CGG TCT CGG TGA AGT TCT CCC CCT TGG-3'

(bindet an Position 574-604bp im Maus-ORF)

N-sig.rev: 5'-CGC TTC **ATG** ATG ACT GAT tct aga tct gc-3'

(bindet an Position 21 upstream des Maus-ORF im pcDNA3.1/Zeo(+)) bis 74bp im Maus-ORF. Die ersten 23 Kodons des Maus-ORF fehlen, das Startcodon (fett gedruckt) sitzt jetzt an Kodon 23.)

Als Template wurde das Plasmid pcDNA3.1/Zeo(+)_{mus3f4} verwendet, das den Maus-ORF mit einem Epitop für den mAk3F4 enthält. Zunächst wurde je eine PCR mit dem Primerpaar CMV.seq und N-Sig.rev bzw. N-Sig.seq und BsteII.rev durchgeführt. In einer weiteren PCR wurden dann je 1µl dieser gelaufgereinigten PCR-Produkte eingesetzt und mit den Primern CMV.seq und BsteII.rev amplifiziert.

PCR zur Untersuchung transgener Mäuse Die PCR-Reaktion wurde in einem TRIO-Thermoblock der Firma Biometra durchgeführt. Die Primer zur Untersuchung der transgenen Mäuse wurden von der Firma Life Technologies synthetisiert, um die bei einer Synthese im eigenen Labor bestehende Kontaminationsgefahr mit laborspezifischer DNA auszuschließen. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50µl mit einer Konzentration der Nukleotidtriphosphate dGTP, dATP, dTTP und dCTP von jeweils 0,2mM, mit je 50pmol der entsprechenden Primer, 2,5mM MgCl₂ und der Zugabe von 10µl Q-Solution und 5µl PCR-Puffer durchgeführt. Die Menge an Taq-Polymerase und an Template wurde je nach PCR variiert.

PCR zum Nachweis von transgenem- und PrP^{Sc}-Gen Diese PCR wurde zum Standardscreening von Foundertieren verwendet. Es wurden drei Primer eingesetzt. Da der 3'-Primer an transgenes und PrP^{Sc}-Gen bindet, während die 5'-Primer spezifisch für das jeweilige Gen sind, handelt es sich hier um eine semikompetitive PCR. Diese PCR konnte deshalb auch bedingt zur Unterscheidung heterozygoter und homozygoter Trägartiere angewandt werden. Diese Primerkombination wurde von Bueler et al. (Bueler

et al., 1992) veröffentlicht und zum Screening von PrP⁰-Mäusen benutzt.

5'-Primer:

P3 (PrP-Gen): 5'-ATT CGC AGC GCA TCG CCT TCT ATC GCC-3'

(Position: im Neomycingen der PrP⁰-Mäuse)

P10 (Prnp-ORF): 5'-GTA CCC ATA ATC AGT GGA ACA AGC CCA GC-3'

(Position: bp 277-306 im Maus-ORF)

3'-Primer:

3'nc (3'-UTR): 5'-ATA ACC CCT CCC CCA GCC T-3'

(Position: bp 806-824 im 3'untranslatierten Bereich des Prnp der Maus)

Dieser PCR wurden 1,5µl Mausschwanzlysat als Template und 0,75U Taq-Polymerase zugegeben. Die PCR-Reaktion wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

2 Minuten initiales Schmelzen der DNA-Stränge bei 93°C

35 Schleifen mit

45 Sekunden Schmelzen bei 93°C (Denaturation)

45 Sekunden Anlagern der Primer bei 62°C (Annealing)

60 Sekunden Synthese von DNA-Strängen bei 72°C (Extension)

dann: 7 Minuten abschließende DNA-Synthese bei 72°C (Final extension)

Kühlen der Proben auf 4°C

PCR zur Unterscheidung von transgenen und Wildtyp-Mäusen Um transgene von Wildtyp-Mäusen unterscheiden zu können, wurde folgende PCR etabliert:

5'-Primer:

ExonII.seq: 5'-GCG TGA CTC TTT AGT ATT GGT T-3'

Bindet im Exon II (Position bp 221-242 upstream des ORF) des Prnp, das bei den hier vorgestellten transgenen Mäusen unmittelbar upstream des ORF liegt. Bei Wildtyp-Mäusen ist das Exon II etwa 6kb-12kb upstream vom ORF entfernt, so dass unter den gewählten Bedingungen kein PCR-Produkt für Wildtyp-Mäuse entstand.

3'-Primer:

P10rev.: 5'-GCT GGG CTT GTT CCA CTG ATT ATG GGT CA-3'

Bindet im ORF des Prnp (Position: bp 277-306 im Maus-ORF).

Auch dieser PCR wurden 1.5µl Mausschwanzlysat als Template und 1U Taq-Polymerase

zugegeben. Die PCR-Reaktion wurde mit einem „Touch-down“-Programm durchgeführt; bei einer „Touch-down-PCR“ wird bei jedem Zyklusdurchlauf die „Annealing“-Temperatur von hohen auf kleinere Werte verringert. Im vorliegenden Fall wurde die Temperatur schrittweise von 65 auf 55°C abgesenkt. Die Änderung pro Zyklusdurchlauf betrug 0,5°C.

2 Minuten initiales Schmelzen der DNA-Stränge bei 93°C

35 Schleifen mit

45 Sekunden Schmelzen bei 93°C (Denaturation)

60 Sekunden Anlagern der Primer bei 65°C-55°C (Annealing)

60 Sekunden Synthese von DNA-Strängen bei 72°C (Extension)

dann: 7 Minuten abschließende DNA-Synthese bei 72°C (Final extension)

Kühlen der Proben auf 4°C

Quantitative PCR

Quantitative PCR zur Bestimmung der Kopienzahl des transgenen Allels Verdünnungen von Schwanzlysat einer C57BL-Maus und transgener Foundertiere wurde in die PCR-Reaktion eingesetzt und anschließend verglichen. Pro Mauslinie wurden 100ng, 10ng, 1ng und 0.1ng Mausschwanz-DNA als Template eingesetzt. Gearbeitet wurde mit 1U Taq-Polymerase, 50pmol 5'-Primer P10 und 100pmol 3'-Primer 3'nc. Der 3'-Primer wurde im Überschuss eingesetzt, um Verfälschungen zu vermeiden: 3'nc bindet auch an das %-Gen, das in den transgenen Mauslinien vorhanden ist, jedoch nicht in der C57BL-Maus. Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen ausgeführt:

2 Minuten initiales Schmelzen der DNA-Stränge bei 93°C

25 Schleifen mit

60 Sekunden Schmelzen bei 93°C (Denaturation)

60 Sekunden Anlagern der Primer bei 62°C (Annealing)

60 Sekunden Synthese von DNA-Strängen bei 72°C (Extension)

dann: 7 Minuten abschließende DNA-Synthese bei 72°C (Final extension)

Kühlen der Proben auf 4°C

Quantitative PCR zum Auffinden homozygot transgener Tiere Gearbeitet wurde mit dem 5'-Primer P10 und dem 3'-Primer 3'nc. Als Template wurden 0,4µg DNA

eingesetzt und 1U Taq-Polymerase. Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

2 Minuten initiales Schmelzen der DNA-Stränge bei 93°C

20 Schleifen mit

60 Sekunden Schmelzen bei 93°C (Denaturation)

60 Sekunden Anlagern der Primer bei 62°C (Annealing)

60 Sekunden Synthese von DNA-Strängen bei 72°C (Extension)

dann: 7 Minuten abschließende DNA-Synthese bei 72°C (Final extension)

Kühlen der Proben auf 4°C

Die Schleifenanzahl wurde auf 20 reduziert, um zu gewährleisten, dass man sich im linearen Bereich der DNA-Vermehrungsrate befindet. Die PCR wurde eingestellt, indem Mausschwanzlysat einer tg20-Maus im 1:1 Verhältnis mit dem Lysat einer PrP^{sc}-Maus vermischt und mit dem reinen Lysat einer tg20-Maus verglichen wurde. Es wurden die PCR-Bedingungen ausgewählt, die eine deutliche Unterscheidung der beiden Ansätze erlaubte. Diese Testreaktion simulierte das Verhältnis einer homozygoten zur heterozygoten Maus.

3.1.4 Sequenzierung von DNA

Sequenzierung von „Maxipreps“

Sequenzierreaktion Die Reaktion wurde mit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit in einem Volumen von 10 μ l durchgeführt. 0,4 μ g DNA, 4 μ l BigDye, 1,5pmol Primer und ddH₂O wurden zugegeben und mit folgendem Programm im Trio-Thermoblock durchgeführt:

25 Schleifen wie folgt:

96°C 30 Sekunden

50°C 15 Sekunden

60°C 4 Minuten

Abschließend Kühlen bei 4°C

Sequenzierprimer

t7.seq: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

1p: 5'-CAG GGA AGC CCT GGA GGC AAC C-3'

1m: 5'-GGT TGC CTC CAG GGC TTC CCT G-3'

2p: 5'-GGC TAC ATG CTG GGG AGC G-3'

2m: 5'-CGC TCC CCA GCA TGT AGC C-3'

3p: 5'-CAC ACG GTC ACC ACC ACC AC-3'

3m: 5'-GTG GTG GTG GTG ACC GTG TG-3'

4m: 5'-AGA GCT ACA GGT GGA TAA CC-3'

psff.seq: 5'-GTA CCT CAC CCT TTC CGA GTC GG-3'

moutr.seq: 5'-CAG TGA CAC ATG TAA CTT AGC-3'

Fällung 25 μ l 100% Ethanol und 2 μ l Natriumazetat (pH 4,7) wurden bei Raumtemperatur in einem Eppendorfgesäß vorgelegt und die Probe aus der Sequenzierreaktion zugegeben. Dann erfolgte eine zehnmünütige Inkubation auf Eis, und die Proben wurden bei 14000 UPM für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefällt und mit 150 μ l 70% (v/v)

Ethanol gewaschen (14000 UPM, 10 Minuten, RT). Anschließend wurden die Proben in der Speed-vac getrocknet und bei -20°C eingefroren.

Sequenziergel Die Proben wurden in $5\mu\text{l}$ Probenpuffer ($40\mu\text{l}$ Loading Puffer, $160\mu\text{l}$ Formamid) gekocht, $1,5\mu\text{l}$ Probe wurden dann mittels eines Biorad Acrylamid Gels (36cm, 5% Acrylamid, 7M Harnstoff und 1xTBE) aufgetrennt und mit Hilfe des Sequenziergerätes „ABI PRISM 377 DNA Sequencer“ analysiert für 10h, 48Watt, 51°C . Die Auswertung erfolgte mittels ABI-PRISM-Software an einem Macintosh Computer und im GCG-Programm.

Sequenzierung von „Minipreps“ $20\mu\text{l}$ eines Miniprepsatzes wurden mit $20\mu\text{l}$ Isopropanol gefällt (14000 UPM, 10 Minuten), mit $100\mu\text{l}$ 70% (v/v) Ethanol gewaschen (14000 UPM, 5 Minuten) und in $20\mu\text{l}$ ddH₂O gelöst. $5\mu\text{l}$ des Ansatzes wurden in die Sequenzierreaktion eingesetzt.

Sequenzierung genomischer DNA $5\mu\text{l}$ säulenaufgereinigte genomische DNA wurden in die Sequenzierreaktion eingesetzt.

3.2 Bakterienkultur

Für die Anzucht von großen Plasmiden wie phgPrP und pSFF wurden E.colis des Stammes JM109 benutzt, während kleine Plasmide wie pcDNA3.1/Zeo(+), pEGFP-N3 oder pblue-script in Bakterien des Stammes XL1-Blue vermehrt wurden.

3.2.1 Anzucht von E. coli-Stämmen

Anzucht in Flüssigmedium Das mit einer Bakterienkolonie bzw. einer Vorkultur von E. coli XL1-Blue oder JM109 beimpfte LB-Medium wurde im Schüttelinkubator über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Bedarf wurde auf Antibiotikaresistenz selektiert (Ampicillin $50\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. Kanamycin $50\mu\text{g}/\text{ml}$).

Anzucht auf festen Nährböden Etwa $50\mu\text{l}$ einer Bakterienlösung wurde auf LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur Selektion wurde an-

tibiotikahaltiger Agar verwendet (Seite 41).

3.2.2 Transformation

Die bei -70°C gelagerten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und die Hälfte eines Ligationsansatzes ($7,5\mu\text{l}$) oder $1\mu\text{l}$ eines Maxi- bzw. Minipreps zur Bakteriensuspension gegeben und sofort mit Hilfe des Vortex kurz gemischt. Nach einer Inkubation für 30 Minuten auf Eis folgte eine zweiminütige Hitzeschockbehandlung bei 42°C im Thermoblock. Nach zweiminütigem Abkühlen der Bakterien auf Eis wurde 1ml LB-Medium der Zellsuspension zugegeben, und die Bakterien wurden bei 37°C für 45 Minuten im Thermoblock geschüttelt. Im Anschluss an diese Wachstumsphase wurden die Bakterien bei 13000 UPM in der Tischzentrifuge für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf $50\mu\text{l}$ abgenommen, das Bakterienpellet in diesem Restvolumen resuspendiert und schließlich auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.3 Herstellung kompetenter Bakterien

E. coli Bakterien aus einem Glycerolstabilat wurden auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Dann wurde eine Bakterienkolonie in 200ml LB-Medium gegeben und bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator hochgezogen. Anschließend wurde diese Flüssigkultur im Verhältnis $1:50$ mit LB-Medium (Gesamtvolumen 200ml) verdünnt und weitere zwei bis drei Stunden bei 37°C geschüttelt bis eine OD 550nm von $0,2-0,5$ erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt des exponentiellen Wachstums der Bakterien wurde die Kultur fünf Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend die Suspension bei 3000 UPM , 4°C , fünf Minuten in einer Heraeus-Kühlentrifuge zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde dann in der Hälfte der Ausgangsmenge 50mM steriler CaCl_2 -Lösung (100ml) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (2000 UPM , 4°C , 5 Minuten) wurde das Pellet dann in einem 20stel der Ausgangsmenge 30mM steriler CaCl_2 -Lösung (10ml) aufgenommen. Zu dieser Lösung wurde dann tropfenweise steriles Glycerol zugegeben bis zu einer Endkonzentration von 15% . Jeweils $200\mu\text{l}$ wurden dann in Eppendorfgefäße gefüllt, in flüssigen Stickstoff gegeben und bei -70°C gelagert.

3.2.4 Lagerung von Bakterienkulturen

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterien wurden je 500 μ l Flüssigkultur mit demselben Volumen an sterilem Glycerol gemischt, sofort auf Eis gestellt und anschließend bei -70°C gelagert.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Zellkultivierung

Die Zellen wurden, sofern nichts anderes vermerkt, im Brutschrank bei 37°C, ausreichender Luftfeuchte und einer Gaszufuhr von 5% CO₂ gehalten.

Kultivierung von Maus-Neuroblastomzellen (N2a-Zellen) N2a-Zellen wurden in BFA37 (MEM-NEAA), 10% FCS und Penicillin, Streptomycin gehalten. Jeden fünften Tag wurden die Zellen einer T75er-Flasche mit VT abgelöst, in Medium resuspendiert, und ein Achtel der Zellsuspension wurde wieder in 15ml Medium ausgesät.

Kultivierung von Chinese-Hamster-Ovary-Zellen (CHO-Zellen) CHO-Zellen wurden in BFA34 (Dulbecco's MEM), 25% F12, 10% FCS, Penicillin und Streptomycin kultiviert. Jeden fünften Tag wurden die Zellen einer T75er-Flasche mit VT abgelöst, in Medium resuspendiert, und ein Sechzehntel der Zellsuspension wurde wieder in 15ml Medium ausgesät.

Kultivierung von transfizierten N2a- und CHO-Zellen Auf transfizierte Zellpopulationen wurde mit dem jeweiligen Medium zugesetzten Antibiotikum Zeocin in einer Konzentration von 500 μ g/ml selektioniert. Diese stabilen Zellpopulationen wurden dann kloniert und diese Klone weiterhin in zeocinhaltigem Medium (250 μ g/ml) gehalten. Das Auftauen, Einfrieren und Umsetzen transfizierter Zellen erfolgte jedoch in zeocinfreiem Medium, da es ansonsten zu übermäßigem Zellsterben gekommen wäre.

Kultivierung von Packzellen (PA317-; Ψ 2-Zellen) Die Packzellen wurden in BFA31 (RPMI1640), 10% FCS, Penicillin und Streptomycin kultiviert. Jeden dritten Tag wurden

die Zellen eines Sixwells mit VT abgelöst, in Medium resuspendiert, und ein Fünftel der Zellsuspension wurde wieder in 5ml Medium in einem neuen Sixwell ausgesät.

Kultivierung von permanent scrapie-infizierten Maus-Neuroblastomzellen

ScN2a-Zellen wurden in Opti-MEM oder BFA37 (MEM-NEAA), 10% FCS und Penicillin, Streptomycin gehalten. Jeden fünften Tag wurden die Zellen einer T75er-Flasche mit VT abgelöst, in Medium resuspendiert, und ein Achtel der Zellsuspension wurde wieder in 15ml Medium ausgesät. Wachstum erfolgte im Brutschrank bei 35°C und 5% CO₂.

Auftauen und Einfrieren von Zellen $8 \cdot 10^6$ Zellen wurden in 0,5ml Einfriermedium vermischt mit 0,5ml Kulturmedium aufgenommen, in ein Einfrierröhrchen gegeben, auf -20°C und dann auf -70°C heruntergekühlt. Nach 48 Stunden wurden die Proben in flüssigen Stickstoff überführt. Eingefrorene Zellen wurden im 37°C Wasserbad aufgetaut, sofort in 5ml Kulturmedium überführt, gewaschen (1000 UPM, 10 Minuten, 4°C in Heraeus-Kühlzentrifuge) und ausgesät.

3.3.2 Klonierung von Zellen

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die antibiotikaresistenten, transfizierten Zellpopulationen so verdünnt, dass theoretisch in jedem 96er-well nur eine Zelle sitzt. Die Klonierung wurde in Selektionsmedium durchgeführt.

3.3.3 Bestimmung der Anzahl lebender Zellen

Zur Vitalitätsbestimmung wurde der „Trypanblau-Exklusionstest“ durchgeführt. Der Farbstoff wird passiv in die Zellen aufgenommen, kann aber nur von stoffwechselaktiven Zellen wieder sezerniert werden; tote Zellen erscheinen daher blau gefärbt. Aliquots der Zellsuspensionen wurden mit Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 versetzt und die ungefärbten Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer mikroskopisch ausgezählt. Die Zellzahl wurde nach folgender Zählung bestimmt:

Zellzahl = Zahl der Zellen in 5 Kleinquadraten \times 1000 \times Verdünnungsfaktor

3.3.4 Transfektion von Zellen

Bestimmung der Transfektionseffizienz Die Transfektionseffizienz ist das Verhältnis transfizierter Zellen zur Gesamtzellzahl. Die Transfektion erfolgte entweder mit Lipofectamine oder Kalziumphosphat entsprechend der ansonsten gewählten Bedingungen. Als Plasmid wurde pEGFP-N eingesetzt, das für das verstärkt autofluoreszierende, grün fluoreszierende Protein (EGFP) kodiert. Am dritten Tag nach der Transfektion wurde die Zellkultur dann mittels Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskop auf GFP-exprimierende Zellzahl untersucht und so im Verhältnis zur Gesamtzellzahl die Transfektionseffizienz ermittelt.

Transfektion mit Lipofectamine Bei dieser Methode wird die DNA in Liposomen verpackt und über Endozytose in die Zelle geschleust. N2a und CHO Zellen wurden auf T25er-Flaschen ausgesät, so dass am folgenden Tag eine Konfluenz von 80% erreicht war (Zellzahl = $2 \cdot 10^6$). $3 \mu\text{g}$ Plasmid wurden in $300 \mu\text{l}$ MEM-NEAA (N2a-Zellen) bzw. Dulbecco's MEM (CHO-Zellen) und $7,5 \mu\text{l}$ Lipofectamine in $300 \mu\text{l}$ MEM-NEAA (N2a-Zellen) bzw. Dulbecco's MEM (CHO-Zellen) gegeben. Die beiden Ansätze wurden vermischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit MEM-NEAA (N2a-Zellen) bzw. Dulbecco's MEM (CHO-Zellen) wurde das Plasmid-Lipofectamine-Gemisch mit $2,4 \text{ ml}$ MEM-NEAA (N2a-Zellen) bzw. Dulbecco's MEM (CHO-Zellen) aufgefüllt und auf die Zellen gegeben. Nach fünfstündiger Inkubation im Brutschrank wurden 3 ml MEM-NEAA (N2a-Zellen) bzw. Dulbecco's MEM (CHO-Zellen) mit 20% FCS zugegeben und über Nacht inkubiert. Das Medium wurde dann abgezogen und durch MEM-NEAA (N2a-Zellen) bzw. Dulbecco's MEM, 25% F12 (CHO-Zellen), 10% FCS, Penicillin/Streptomycin ersetzt. Zwei Tage später wurden die Zellen dann auf transiente Expression bzw. Transfektionseffizienz getestet oder das Medium durch zeocin-haltiges ($500 \mu\text{g}/\text{ml}$) Medium zur Selektion stabiler Zellpopulationen ersetzt. Nach etwa vier Wochen erhielt man so stabile Zellpopulationen. Als Kontrolle wurden nicht-transfizierte Zellen mitgeführt oder Zellen, die lediglich mit dem insertfreien, also „leeren“ Vektor transfiziert wurden (mock-Kontrolle).

Transfektion mittels Kalziumphosphatpräzipitation Diese Methode geht auf die Entdeckung zurück, dass Zellen die DNA in Form eines Präzipitats mit Kalziumphosphat effizient aufnehmen. Frühere Arbeiten zeigten, dass zweiwertige Kationen wie Kalzium oder Magnesium die Aufnahme von DNA in Bakterien fördern. DNA wird in eine phosphatgepufferte Lösung gegeben und anschließend Kalziumchlorid dazugegeben. Jetzt bilden sich feine Präzipitate aus Kalziumphosphat und DNA, die über ihre Phosphatgruppen mitpräzipitiert wird. Die Zellen nehmen dann die ausgefällte DNA auf.

In einem Sixwell wurden je $1,2 \cdot 10^5$ PA317- und Ψ -Zellen in 2ml Dulbecco's MEM, 10% FCS, Penicillin/Streptomycin ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Zur Kontrolle gleichmäßigen Wachstums beider Zelllinien wurde je ein Sixwell mit nur einer Zelllinie ausgesät. Bei gleichmäßigem Wachstum wurden die Zellen dann am folgenden Tag transfiziert. $10 \mu\text{g}$ DNA wurden mit $9 \mu\text{l}$ SolI vermischt und auf ein Volumen von $89 \mu\text{l}$ mit ddH_2O aufgefüllt. Diesem Reaktionsansatz wurden dann langsam $89 \mu\text{l}$ SolII zugegeben. Dabei wurde ein Vortex mit 800 Scherbewegungen pro Minute zu Hilfe genommen, um eine optimale Durchmischung zu erreichen. Dieser Ansatz wurde dann 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, die Zellen zweimal mit Dulbecco's MEM, 10% FCS, Penicillin/Streptomycin gewaschen und pro well 2ml Medium zugegeben. Anschließend wurde das Präzipitat vorsichtig über das Sixwell getropft. Am folgenden Tag wurde das Medium durch 4ml RPMI1640, 10% FCS, Penicillin/Streptomycin ersetzt. Die Transfektion wurde mit Dulbecco's MEM durchgeführt, da der hohe Salzgehalt von RPMI1640 die Transfektionsreaktion stören würde. Die Zellen wurden dann jeden zweiten Tag mit VT abgelöst, das sofort wieder von den Zellen entfernt wurde, und im Verhältnis 1:5 auf ein neues Sixwell gesplittet. Nach etwa zwei Wochen wurden die Zellen dann auf 24er wells, T25er- und auf T75er-Flaschen gesetzt und mittels Immunfluoreszenz, Durchflusszytometrie und Westernblot auf Expression untersucht.

3.3.5 Ernte und Konservierung von retrovirushaltigem Zellüberstand

Nachdem die Packzellkulturen auf Expression des eingeführten Inserts in Immunfluoreszenz, Durchflusszytometrie und Westernblot getestet waren, wurden sie auf T75er-Flaschen in 15ml Zellkulturmedium umgesetzt. Nach Erreichen einer Zelldichte von 80-100% Konfluenz wurde der retrovirushaltige Zellkulturüberstand abgenommen, bei

1000UPM, 4°C und fünf Minuten in der Heraeuszentrifuge von Zellüberresten befreit und anschließend in 2ml Aliquots bei -70°C in Einfrierröhrchen weggefroren.

3.4 Konversionsexperiment in permanent scrapie-infizierten Maus-Neuroblastomzellen (ScN2a-Zellen)

$3 \cdot 10^5$ ScN2a-Zellen wurden pro Sixwell in 2ml Opti-MEM, 10% FCS, Penicillin, Streptomycin ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium entfernt und durch je 2ml polybrenehaltiges Medium ($4\mu\text{g}/\text{ml}$) ersetzt. Nach zweistündiger Inkubation der Zellen im Brutschrank wurde ein Gesamtvolumen von 1ml Virusüberstand in entsprechenden Verdünnungen (Pur, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) pro Sixwell zugegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium entfernt und pro Sixwell die Zellen mit 1ml VT-Lösung abgelöst. Pro Sixwell wurden dann $600\mu\text{l}$ Zellsuspension auf eine T75er-Flasche in 15ml Medium, $300\mu\text{l}$ Zellsuspension in eine T25er in 5ml und ein Tropfen in ein 24er-well in 2ml Medium ausgesät. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz im Brutschrank gehalten und dann auf Transduktionseffizienz per Immunfluoreszenz und auf PrP^{res} und PrP^{sen} im Westernblot untersucht.

Proben für PrP^{sen}: Das Medium wurde entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und in der Flasche mit $250\mu\text{l}$ Sucrose-DOC-NP40 lysiert. Dem Lysat wurden anschließend $20\mu\text{l}$ RNase ($1\text{mg}/\text{ml}$) zugegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Debris wurde durch Zentrifugation bei 9000UPM, zwei Minuten in einer Heraeus Tischzentrifuge entfernt und $50\mu\text{l}$ Überstand direkt mit $12,5\mu\text{l}$ $10\times$ Probenpuffer vermischt oder einer Guanidiniumbehandlung mit anschließender Azetonpräzipitation unterzogen.

Proben für PrP^{res}: Tote Zellen im Medium wurden mit 800UPM, fünf Minuten in einer Varifuge 3.0 von Heraeus herunter zentrifugiert. Die Zellen in der Flasche wurden mit 2ml VT-Medium abgelöst, in 6ml Medium resuspendiert und gemeinsam mit den toten Zellen einer Zentrifugation (800UPM, 5 Minuten) unterzogen. Die Zellpellets wurden dann bei -20°C weggefroren im 15ml Bluecap oder sofort in 3ml PrP^{res}-Lysispuffer gelöst. Nach zehnminütiger Inkubationszeit war im Reaktionsansatz eine weiße DNA-Wolke zu sehen. Diese wurde durch Zentrifugation bei 800UPM, fünf Minuten in einer Varifuge 3.0 von Heraeus pelletiert und entfernt. Der Überstand wurde dann mit $75\mu\text{l}$ Proteinase K

(1mg/ml) für 1h bei 37°C verdaut und der Verdau mit 25µl 100mM PMSF abgestoppt. Das verdaute Lysat wurde dann in Zentrifugenröhrchen (13×56mm) umgefüllt und bei 70000UPM, 60 Minuten bei 4°C in einem Beckmannrotor TLA100.4 ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 100µl 2×Probenpuffer mittels fünfminütiger Ultraschallbehandlung gelöst und bei -20°C sofort weggefroren oder im Gel aufgetrennt.

3.5 Proteinbiochemische Verfahren

3.5.1 Herstellung von Homogenaten

Zellhomogenate In der Regel wurden 10%ige Zellhomogenate hergestellt. Die Zellen einer konfluenten T75er-Flasche wurden mit 10ml Sucrose-EGTA-EDTA-Lösung abgelöst und bei 1000UPM, fünf Minuten bei 4°C in der Heraeus-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in Sucrose-DOC-NP40-Puffer resuspendiert, RNase in einer Endkonzentration von 100µg/ml zugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (9000UPM, 2 Minuten, Tischzentrifuge) wurde das Zellhomogenat von DNA-Resten gereinigt, indem der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß umgefüllt wurde. Das Ablösen der Zellen erfolgte nicht mit proteinablösendem Versen-Trypsin, um den Verlust von auf der Oberfläche exprimiertem Prionprotein zu vermeiden.

Organhomogenate

Gehirn Hergestellt wurden 10%ige Gehirnhomogenate. Dazu wurden die Gehirne frisch toter Mäuse entnommen und in Sucrose-DOC-NP40-Puffer mit Hilfe eines Tischhomogenisators homogenisiert.

Weitere Organe Hergestellt wurden 10%ige Homogenate. Zum zerkleinerten Organ frisch toter Mäuse wurde Sucrose-DOC-NP40-Puffer zugegeben und dann durch mehrmaliges Aufziehen in Spritzen mit 18-gauge, 20-gauge und 23-gauge Kanülen homogenisiert.

3.5.2 Fällung und Vorbehandlung von Protein

Methanolfällung Proben wurden im Verhältnis von mindestens 1:10 mit eiskaltem Methanol versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden sie bei 4000UPM in der Heraeus Varifuge 3.0 für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach dem Trocknen des Pellets wurde dieses in $30\mu\text{l}$ $2\times$ Probenpuffer aufgenommen und mittels fünfminütiger Ultraschallbehandlung gelöst.

Azetonfällung Proben wurden 1:1 in 100% Azeton aufgenommen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4000UPM, zehn Minuten in einer Heraeus Varifuge 3.0 oder bei 14000UPM, zehn Minuten in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Pellets wurden dann in einem geeigneten Volumen $3\times$ Probenpuffer aufgenommen.

Denaturierung mit Guanidiniumhydrochlorid Guanidinium führt zu einer Denaturierung des Prionproteins, indem die Sekundärstruktur von PrP zerstört wird. Dadurch werden Epitope für Antikörper freigelegt. Denaturierungsschritte mit Guanidiniumhydrochlorid sind ab einer Molarität von 6M irreversibel (Prusiner et al. 1993), darunter reversibel. Die Denaturierung mit Guanidiniumhydrochlorid wurde durchgeführt, um Hintergrundprobleme zu minimieren.

Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit 6M Guanidiniumhydrochlorid für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Endkonzentration 3M). Anschließend wurden sie mit Azeton, wie oben beschrieben, gefällt.

3.5.3 Enzymatische Behandlung der Proteine

PNGase F (N-Glykosidase F) Durch die PNGase F werden N-glykosylierte Proteine deglykosyliert, da dieses Enzym alle Typen Asparagin-gebundener N-Glykanketten spaltet, vorausgesetzt, dass sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe in peptidischer Bindung vorliegen und dass das Oligosaccharid die Mindestgröße der Chitobiose-Core-Einheit aufweist.

Zu $10\mu\text{l}$ Zellhomogenat wurden $20\mu\text{l}$ Sucrose-DOC-NP40-Puffer und $3\mu\text{l}$ Denaturierungspuffer (10fach) gegeben und bei 95°C für zehn Minuten gekocht. Nach dem Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur wurden $3,8\mu\text{l}$ PNGase F-Inkubationspuffer (10fach), $3,8\mu\text{l}$

10% NP40 und 2 μ l PNGase F (0,4U) zugegeben und über Nacht bei 37°C verdaut. Durch die Denaturierung wird die Deglykosylierungsrate des Enzyms PNGase F gesteigert. Da das Enzym durch SDS gehemmt wird, ist die Zugabe eines zweiten Detergens in fünf- bis zehnfachem Überschuss im Hinblick auf die SDS-Konzentration notwendig. Hier wurde als Detergens NP40 verwendet.

Endo H Endoglykosidase H spaltet den Chitobiose-Core von N-Glykanen des „high-Mannose“-Typs und der einiger Komplex-Typen.

Zu 10 μ l Zellhomogenat wurden 20 μ l Sucrose-DOC-NP40-Puffer und 3 μ l Denaturierungspuffer (10fach) gegeben und bei 95 °C für zehn Minuten gekocht. Nach dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurden 3,8 μ l Endo H-Inkubationspuffer (10fach) und 2-5 μ l Endo H (10-25mU) zugegeben und über Nacht bei 37°C verdaut. Durch die Denaturierung wird die Deglykosylierungsrate des Enzyms Endo H gesteigert.

Als Kontrolle wurden nicht-transfizierte Zellen ebenfalls mit Endo H behandelt. Ferner wurden Proben mitgeführt, die nicht mit Endo H, ansonsten aber gleich, behandelt wurden.

PIPLC (Phosphatidylinosit-Phospholipase C) Phosphatidylinosit-Phospholipase C wird zur Freisetzung von GPI-membranverankerten Proteinen eingesetzt und schneidet zwischen Diacylglycerol und Inositolphosphat.

Zellen einer T75er-Flasche wurden bei einer Konfluenz von 80% mit PIPLC behandelt. Dazu wurde das Medium abgezogen, und die Zellen wurden dreimal mit BFA37 gewaschen. Anschließend wurden 0,4U PIPLC in 4ml BFA37 (pH 7,4) gegeben und die Zellen darin vier Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde dann abgenommen, in ein Bluecap überführt und Zellreste in der Heraeus-Kühlzentrifuge (800UPM, 5 Minuten, 4°C) abzentrifugiert. Die Proteine des Überstandes wurden dann entweder mit Methanol oder Azeton gefällt und die Pellets in 30 μ l 2 \times Probenpuffer aufgenommen.

Die Zellen wurden mit EDTA-EGTA-Sucrose von der Zellkulturflasche abgelöst, in der Heraeus-Kühlzentrifuge (800UPM, 5 Minuten, 4°C) pelletiert und zu Zellhomogenat (siehe Seite 77) weiterverarbeitet.

Als Kontrolle dienten jeweils Zellen, die nicht mit PIPLC, ansonsten aber gleich, behandelt wurden.

Proteinase K Zellhomogenate in Sucrose-DOC-NP40 oder PrP^{res}-Lysis-Puffer wurden mit verschiedenen Konzentrationen Proteinase K behandelt und bei 37°C für unterschiedliche Zeit inkubiert (3,3µg/ml PK für 10 Minuten, 1µg/ml für 30 Minuten, 0,5µg/ml für 30 Minuten oder mit 25µg/ml für 60 Minuten). Der Verdau wurde anschließend abgestoppt durch zehnminütiges Kochen bei 95°C. Die Proben wurden dann mit Guanidinium denaturiert und mit Azeton gefällt. Das Pellet wurde in 3×Probenpuffer gelöst, weggefroren oder sofort im SDS-PAGE aufgetrennt.

3.5.4 Sonstige analytische Verfahren

Löslichkeitsassay Zellpellets wurden gewonnen wie für PrP^{res} (Seite 76) beschrieben, bei -20°C weggefroren, die Pellets dann in 3ml Löslichkeitstest-Puffer (10mM TrisHCl pH 7,5, 150mM NaCl, 10mM EDTA, 0,5% TritonX100, 0,5% DOC) aufgenommen und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Detritus wurde durch Zentrifugation bei 800UPM, fünf Minuten in einer Varifuge 3.0 von Heraeus pelletiert und entfernt. Anschließend wurde der Probe 25µl 100mM PMSF zugegeben und bei 70000UPM, 60 Minuten bei 4°C in einem Beckmannrotor TLA100.4 ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 175µl 2×Probenpuffer mittels fünfminütiger Ultraschallbehandlung gelöst und bei -20°C sofort weggefroren, oder 25µl der Probe wurden sofort im Gel aufgetrennt. Der Überstand wurde einer Guanidiniumbehandlung mit anschließender Azetonfällung unterzogen und dann in 175µl 3×Probenpuffer aufgenommen und davon wurden 25µl im 13% SDS-PAGE aufgetrennt.

3.5.5 Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proben wurden mittels SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli 1970) in einer Mini-Gel-Elektrophorese-Apparatur aufgetrennt. Proben wurden vor dem Auftrag mit CVL-Puffer versetzt und fünf Minuten bei 95°C gekocht. Die Fokussierung der Proben erfolgte zunächst bei 100 Volt, die anschließende Trennung der Fraktionen nach Erreichen

des Trenngels bei 200 Volt. Proben wurden bis zum Verschwinden der Lauffront aufgetrennt. Zur Kontrolle des Molekulargewichts wurden 0,5 μ l ECL-Marker (Fa. Amersham, Freiburg) in 10 μ l Probenpuffer oder ein BFAV eigener Marker benutzt (Dr. Eiden: unveröffentlicht)

12% Gele, 0,6mm dick: für 2 Gele;

Da dem Trenngel Sucrose zugegeben wurde, können Trenn- und Taschengel gleichzeitig gegossen werden.

13% Gele, 1,2mm dick: für 2 Gele;

Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet. Das Taschengel wurde erst nach dem Auspolymerisieren des Trenngels gegossen.

Trenngel:

ddH ₂ O	4,5ml
1.5M TrisHCl, pH 8.8	3,75ml
30% Bis-Acrylamid	6,5ml
10% SDS	750 μ l
TEMED	10 μ l
10% APS	100 μ l

Taschengel:

ddH ₂ O	6ml
0.5M TrisHCl, pH 6.8	2,5ml
30% Bis-Acrylamid	1,3ml
10% SDS	500 μ l
TEMED	20 μ l
APS	200 μ l

16% Gele, 1,2mm dick: für 2 Gele;

Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet. Das Taschengel wurde erst nach dem Auspolymerisieren des Trenngels gegossen.

Trenngel:

ddH ₂ O	3ml
1,5M TrisHCl, pH 8,8	3,75ml
30% Bis-Acrylamid	8ml
10% SDS	750 μ l
TEMED	10 μ l
APS	100 μ l

Taschengel: siehe 13% Gele

3.5.6 Oberflächenbiotinylierung

Mit dieser Methode werden alle auf der Zelloberfläche anwesenden Proteine mit zellimpermeablem Biotin markiert, durch die anschließende Immunpräzipitation PrP isoliert und anschließend auf dem Blot mit an Biotin-bindender Streptavidinperoxidase entwickelt. Auf dem Blot ist demzufolge nur noch oberflächenexprimiertes PrP zu sehen. $1,8 \cdot 10^6$ Zellen wurden in einer T25er-Flasche in 5ml Medium ausgesät und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fünf Minuten auf Eis inkubiert, dreimal mit eiskaltem Biotinylierungspuffer I (PBS, 0,1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, pH 7,4) gewaschen und in 250 μ g/ml Sulfobiotin-X-NHS in 2ml Biotinylierungspuffer I zehn Minuten auf Eis inkubiert. Abgestoppt wurde die Biotinylierungsreaktion dann durch dreimaliges Waschen mit Biotinylierungspuffer II (50mM Glycin in PBS, pH 7,4). Dann wurden die Zellen in der Flasche mit 250 μ l Sucrose-DOC-NP40-Puffer lysiert, in ein Eppendorfgesäß umgefüllt und mit 20 μ l Protein A-Sepharose (10% w/v) bei Raumtemperatur für eine Stunde vorgeklärt. Der Überstand wurde nach Zentrifugation bei 5000UPM, zehn Minuten in einer Heraeus-Tischzentrifuge wieder in ein Eppendorfgesäß umgefüllt und dann immunpräzipitiert mit mAk3F4 (siehe Seite 86). Die Proben wurden dann im SDS-PAGE aufgetrennt, gebloftet und mit Streptavidin-Peroxidase 1:1000 in 5% Magermilch entwickelt. Als Kontrolle wurden Zellen mitgeführt, die nicht mit Biotin, ansonsten aber gleich behandelt wurden.

3.5.7 Nachweis von Disulfidbrücken

Dieser Test beruht auf der Tatsache, dass Proteine bei geschlossenen Schwefelbrücken ein anderes Laufverhalten im SDS-PAGE zeigen als in der nicht geschlossenen Form. Im oxidierten Zustand liegen Schwefelgruppen immer geschlossen als S-S-Brücken vor, während im reduzierten Zustand die Disulfidbrücken aufgebrochen werden und SH-Gruppen vorliegen. Als Reduktionsmittel kann Mercaptoethanol oder wie im folgenden Protokoll DTT (1,4-Dithiothreitol) verwendet werden. Um eine vorzeitige Oxidation von PrP zu vermeiden, wurde dem Lyse-Puffer NEM (N-Ethylmaleinimide) zugegeben, das durch Alkylierung Sulfhydrylgruppen der Proteine blockiert und so vor oxidativer Veränderung während der Zellyse schützt.

Konfluente Zellen einer T75er-Flasche wurden mit 750 μ l (N2a-Zellen), bzw. 1ml (Packzellen) NEM-Lysis-Puffer für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln lysiert, das Lysat dann in ein Eppendorfgefäß umgefüllt, bei 9000UPM in einer Tischzentrifuge der Detritus entfernt und das Lysat sofort 1:1 mit nicht-reduzierendem Probenpuffer vermischt und bei 95°C fünf Minuten gekocht. Anschließend wurden 30 μ l dieser Probe entnommen und mit 5 μ l 300mM DTT versetzt und ebenfalls sofort gekocht. Die Proben wurden anschließend im 12% SDS-PAGE in dünnen Gelen aufgetrennt. Zwischen reduzierter und nativer Probe wurde jeweils eine Spur freigelassen, um eine mögliche Diffusion von DTT im Gel zu vermeiden.

3.6 Immunochemische Verfahren

3.6.1 Westernblot

Beim Blotten werden die in einem Gel aufgetrennten Proteine (SDS-PAGE) elektrophoretisch auf eine Membran übertragen.

Der Transfer der Proteine erfolgte nach dem „Semi-dry“-Verfahren mit der Trans-Blot SD-Apparatur bei 15 Volt während 45 Minuten auf eine PVDF-(Polyvinylidendifluorid)-Membran. Die Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungen für 30 Minuten in Blockinglösung (5% Magermilchpulver, PBS, 0,1% Tween20) inkubiert. Die Bindung des ersten Antikörpers bzw. Antiserums (mAk 3F4 1:3000, mAk 6H4 1:10000, 3B5 1:200, mAk SAF70 1:6000, mAk anti-His 1:2000, Ra 5/7 1:2000) erfolgte über Nacht in Block-

inglösung. Nach drei Waschschritten mit PBS, 0,1% Tween20 für je zehn Minuten wurde der Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus bzw. Schaf-anti-Kaninchen) in einer Verdünnung von 1:3000 in PBS, 0,1% Tween20 für 45 Minuten zugegeben. Die Membranen wurden anschließend dreimal für je zehn Minuten gewaschen und anschließend mit dem ECL-System (Enhanced Chemiluminescent Detektionssystem) nach Angaben des Herstellers entwickelt. Die Membranen wurden in Klarsichtfolie verpackt, und der Röntgenfilm (Hyperfilm ECL) wurde je nach Notwendigkeit für fünf Sekunden bis fünf Minuten in einer Filmkassette belichtet.

3.6.2 Durchflusszytometrische Analysen (FACS; Fluorescent activated cell sorting)

Durchflusszytometrische Analysen werden mit fluoreszenzmarkierten Zellen in Suspension durchgeführt. Dabei werden die Zellen in Trägerflüssigkeit (FACS-Puffer) so verdünnt, dass jeweils nur eine Zelle einen im rechten Winkel zum Flüssigkeitsstrom angeordneten Laser passiert. Nach Auftreffen des Laserlichts auf die jeweiligen Zellen können unterschiedliche Zellparameter mit Hilfe verschiedener Detektoren erfasst werden:

Das **Vorwärtsstreulicht (forward scatter)** als Streulicht der Zellen, das in einem geringen Winkel (3°) abgelenkt wird. Das Vorwärtsstreulicht stellt ein relatives Maß für die Größe der Zelle dar.

Das **Seitwärtsstreulicht (sideward scatter)** als Streulicht der Zellen, das in einem Winkel von 90° abgelenkt wird. Das Seitwärtsstreulicht stellt ein relatives Maß für die intrazelluläre Granulation der Zellen dar.

Fluoreszenzabhängige Parameter: Die zur spezifischen Markierung verwendeten Farbstoffe emittieren bei Anregung mit den Lasern Licht unterschiedlicher Wellenlänge, das von verschiedenen Detektoren analysiert wird. Der Einsatz von einem Argon- und einem Helium-Neon-Laser erlaubt die gleichzeitige Messung von bis zu vier Fluoreszenzparameter auf Einzelzellebene. Für die Fluoreszenzanalysen wurden bis zu drei verschiedene Farbstoffe verwendet: Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Propidiumjodid (PJ). FITC, PE und PJ wurden bei 488nm durch den Argonlaser angeregt. Das emittierte Licht beider Farbstoffe wurde durch einen dichroischen Filter von 560nm in die grünen (FITC) und gelben (PE, PJ) Fluoreszenzanteile zerlegt. Die Analyse der

FITC-Signale erfolgte bei ca. 530nm, die der PE- und PJ-Fluoreszenzen bei ca. 570nm.

Für jede einzelne Zelle wurden alle analysierten Parameter gespeichert. Dies erlaubte eine nachträgliche, computergestützte Analyse der Zellpopulationen unter verschiedenen Aspekten:

Streulichtanalysen: Jede Zellpopulation hat aufgrund ihrer charakteristischen Größe und Struktur eine definierte Lage im Vorwärts- vs. Seitwärts-Streulichtdiagramm. Mit Hilfe der Streulichtparameter lassen sich tote Zellen und Debris (kleines Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht) von lebenden Zellen unterscheiden. Außerdem können durch Wahl entsprechender Fenster bestimmte Zellpopulationen ohne vorherige Separierung einzeln analysiert werden.

Fluoreszenzmarkierung: Bei der Durchflusszytometrischen-Analyse wurde mit intakten, unpermeabilisierten Zellen gearbeitet. Da die Zellmembran für Antikörper nicht durchlässig ist, konnten nur Zellen Antikörper binden, die PrP auf der Oberfläche exprimieren. Das Fluoreszenz-Signal war umso intensiver, je mehr PrP auf der Zelloberfläche exprimiert wurde. Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, die durch tote und damit permeabel gewordene Zellen entstehen könnten, wurde an DNA-bindendes Propidiumjodid (PJ) der Probe zugegeben. Propidiumjodid positive Zellen wurden dann bei der Auswertung der Daten ausgeschlossen. Als Erstantikörper wurde der mAk3F4 eingesetzt. Als Zweitantikörper wurde sowohl mit FITC als auch PE gearbeitet. PE ist 20mal sensitiver als FITC. Da PJ im selben Wellenlängen-Bereich wie PE absorbiert wird und so eine Unterscheidung ausgeschlossen wäre, erfolgte die Markierung mit PJ nur an FITC markierten Proben. Die Zellpopulationen wurden mit indirekter Fluoreszenzmarkierung untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Sucrose-EGTA-EDTA abgelöst. Die gesamte Präparation erfolgte dann auf Eis und mit eiskalten Lösungen. $5 \cdot 10^5$ Zellen wurden in 100 μ l FACS-Puffer mit mAk3F4-Berlin 1:100 für 20 Minuten bei 4°C inkubiert, mit 1ml FACS-Puffer gewaschen (1000UPM, 2 Minuten, 4°C, Tischkühlzentrifuge) und anschließend mit 100 μ l Zweitantikörper (IgG G α M-PE 1:50, IgG G α M2a-FITC 1:200) in FACS-Puffer markiert (Inkubationsdauer 20 Minuten). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 200 μ l FACS-Puffer aufgenommen, zum Vereinzeln durch ein feinmaschiges Metallgitter in FACS-Röhrchen gedrückt, in die jeweilige Probe 30 μ l PJ-Lösung gegeben und im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrolle

dienten zum einen nicht-transfizierte Zellen, zum anderen nur mit fluoreszenzmarkiertem Konjugat inkubierte Zellen. 10000 Zellen einer Probe wurden im Durchflusszytometer jeweils gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms „Cellquest“.

3.6.3 Immunpräzipitation

Standardimmunpräzipitation Ein Gesamtvolumen von 250 μ l, das aus 10-30 μ l Zell-Lysat aufgefüllt mit Sucrose-DOC-NP40-Puffer bestand, wurde zunächst mit 20 μ l Protein A-Sepharose (10% w/v) vorgeklärt. Dazu wurden die Proben eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Sepharose inkubiert und bei 9000UPM für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und über Nacht bei 4°C mit 4 μ l mAk3F4 wippend über Nacht inkubiert. Zur Immunpräzipitation mit Ra5/7-Antiserum wurden 10 μ l, während zur Präzipitation mit β -Aktin 7,5 μ l eingesetzt wurden. Dann wurden 30 μ l Protein A-Sepharose (10% w/v) zugegeben und für eine Stunde unter gleichen Bedingungen weiter inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 13000UPM für zwei Minuten in der Heraeus-Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand in ein weiteres Eppendorfgefäß umgefüllt und bei -20°C weggefroren. Die Sepharose wurde dann mit 500 μ l DLPC-Puffer gewaschen, zentrifugiert wie oben und der Überstand wieder abgenommen. Abschließend wurde dreimal mit Sarkosinpuffer (50mM Tris pH 7,0, 0,5% NaCl, 1% Sarkosin) gewaschen und das Pellet in 30 μ l 1 \times Probenpuffer aufgenommen, ultrageschallt und vor dem Gelauftrag fünf Minuten bei 95°C gekocht.

Immunpräzipitation mit an Sepharose kovalent gebundenem Antikörper Da die Standardimmunpräzipitation den Nachteil hat, dass auch die leichten und schweren Ketten des ersten Antikörpers mit aufgetrennt und dadurch auf der Blotmembran durch den Zweitantikörper erkannt werden, wurde in einzelnen Fällen auch eine Immunpräzipitation mit an Sepharose kovalent gebundenem Erstantikörper durchgeführt.

Zunächst musste der Antikörper an die Sepharose gekoppelt werden. Dazu wurden 375mg CNBr-activated Sepharose in 75ml 1mM HCl für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 10ml Kopplungspuffer zugegeben, zentrifugiert (1000UPM, 3 Minuten in Heraeus Kühlzentrifuge) und der Überstand verworfen. Die Sepharose wurde dann mit 5ml Kopplungspuffer und 27 μ l mAk3F4 für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Während dieser Zeit wurde die Suspension etwa 20mal leicht aufgeschüttelt. Anschließend wurde die Sepharose zentrifugiert (1000UPM, 3 Minuten in Heraeus Kühlzentrifuge) und wieder zweimal mit Kopplungspuffer gewaschen. Dann wurde die Sepharose mit 10ml Ethanolamin (1M Ethanolamin pH 8,0) für eine Stunde inkubiert, Ethanolamin ausgetauscht und erneut eine Stunde inkubiert. Jetzt wurde zweimal mit Natriumazetat, pH 5,4 und zweimal mit Tris-HCl-Puffer, pH 8,0 gewaschen. Die Sepharose wurde dann in 25ml PBS mit 0,01% Natriumazid bei 4°C gelagert.

Zur Immunpräzipitation wurde der Überstand abgenommen und die Sepharose in 1ml PBS resuspendiert. Pro Ansatz wurden dann 60 μ l dieser Lösung in ein Eppendorfgefäß gefüllt und zweimal mit PBS gewaschen (5000UPM, 2 Minuten in Tischzentrifuge). Dann wurden der Sepharose 270 μ l I-Puffer zugegeben und 30 μ l Homogenat. Die Proben inkubierten dann bei 4°C für zwei Stunden unter Wippen. Anschließend wurden sie bei 5000UPM für fünf Minuten in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand wurde in ein weiteres Eppendorfgefäß umgefüllt und diesem 10 μ l 10 \times Probenpuffer zugegeben.

Die sepharosehaltige Phase wurde viermal mit I-Puffer gewaschen und abschließend in 30 μ l 2 \times Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden vor der Auftrennung im SDS-PAGE fünf Minuten bei 95°C gekocht und pro Spur wurden 30 μ l geladen.

3.6.4 Immunfluoreszenz

Zellen wurden auf einem 24er-well ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 3,5% Paraformaldehyd 0,1% TritonX-100 für 30 Minuten fixiert und permeabilisiert. Dann wurde einmal mit PBS-5% FCS gewaschen, mit 50mM Glycin fünf Minuten geblockt und wieder mit PBS-5% FCS gewaschen. Jetzt erfolgte eine einstündige Inkubation mit mAk3F4 1:300 in PBS-5% FCS, dreimal Waschen mit PBS-5% FCS, 45 Minuten Inkubation mit 1:100 biotinyliertem α -Maus-Antikörper, dreimal Waschen mit PBS-5% FCS und anschließende Inkubation mit 1:200 streptavidin gekoppeltem DTAF (Dichlorotriazinyl Amino Fluorescein; Eigenschaften ähnlich FITC, aber stabiler) für 30 Minuten. Abschließend wurde dreimal mit PBS-5% FCS gewaschen und die Zellen mit DABCO überschichtet und im Fluoreszenzlicht mikroskopisch untersucht. Die Inkubationsschritte erfolgten bei 4°C.

ScN2a-Zellen wurden zusätzlich einer Guanidiniumdenaturierung mit 6M Guanidini-

umhydrochlorid unterzogen, um das Epitop freizulegen und so die Spezifität für mAk3F4 zu erhöhen.

3.7 Herstellung und Zucht transgener Mäuse

3.7.1 Generierung transgener Mäuse

Die Herstellung transgener Mäuse erfolgte durch Dr. Reifenberg an der Universität Ulm und fiel unter das durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigte Tierversuchsvorhaben Nr. 156 (Herstellung und Charakterisierung transgener Mauslinien mit gewebe-spezifischer Expression des Prionproteins oder der Expression artifizierender Prionproteine). Die Konstrukte wurden an der BFAV-Tübingen kloniert und mittels Restriktionsverdau (*SalI* und *NotI*) vom „bluescript-backbone“ gereinigt (Gene-clean). Die DNA wurde in 10mM Tris, pH 7,4 mit 0,15mM EDTA aufgenommen in einer Konzentration von etwa 3ng/ μ l DNA in Pronuklei von PrP⁰-Mäusen injiziert.

Vorbereitung der Mäuse für die Mikroinjektion Die Mikroinjektion erfolgte in den Pronukleus von 0,5 Tage alten murinen Zygoten (1-Zell-Stadium). Durch eine hormonelle Ovulationsauslösung „Superovulation“ kann bei Mausweibchen zuverlässig eine Ovulation termingerecht herbeigeführt werden. Dabei muss die Hormonbehandlung mit dem Beleuchtungsprogramm im Mäusestall abgestimmt werden. Für ein 12h:12h Licht-/Dunkel-Schema mit den Mittelpunkt der Licht- bzw. Dunkel-Phase um 12 bzw. 24 Uhr ergab sich eine PMSG-(Pregnant mare serum gonadotropin; besitzt FSH-Eigenschaft)-Applikation um 13-14 Uhr und zwei Tage später eine HCG (Human chorionic gonadotropin, besitzt LH-Eigenschaften) um 12-13 Uhr. Unmittelbar nach der HCG-Applikation erfolgte dann die Verpaarung mit fertilen Männchen. In der darauffolgenden Dunkelperiode ist dann mit einer Ovulation und gegebenenfalls mit einer Kopulation zu rechnen. Die Kontrolle der Weibchen auf Vaginal-Plug (VP) erfolgte am nächsten Morgen (=Tag 0,5 der Gravidität). VP-positive Tiere wurden dann zur Embryonengewinnung getötet. Pro Mausweibchen wurden 5-10 I.U. des entsprechenden Hormons in 100-200 μ l physiologischer NaCl intraperitoneal appliziert. Die Bezeichnung Superovulation, die ja eine unphysiologisch hohe Oocytenzahl impliziert, ist nur bei High-Responder Mausvarianten

angebracht. PrP[%]-Mäuse sind keine High-Responder Tiere (Auskunft Dr. Reifenberg).

Embryonengewinnung Die Eileiter wurden präpariert und in einen Tropfen M2-Medium überführt. Anschließend wurde die Eileiterampulle unter mikroskopischer Kontrolle mit einer 27-gauge Kanüle rupturiert und die hervorquellenden Cumuluszellen in einen Tropfen 300 μ g/ml HyaluronidaseLösung in M2-Medium überführt. Das Abfallen der Cumuluszellen wurde durch Auf- und Abziehen der Embryonen in einer Glaskapillare beschleunigt. Nach enzymatischer Abtrennung der Cumuluszellen wurden die Embryonen durch 2-3 Tropfen M2-Medium passagiert und dann in M16-Medium kultiviert.

Mikroinjektion Die Embryonen wurden zunächst unter dem Mikroskop auf lebende und tote untersucht und aussortiert. Lebende Embryonen wurden dann mit der Haltekapillare fixiert. Mit der Mikroinjektionskapillare wurde dort die Zona pellucida, die Zytoplasmamembran und die Pronukleusmembran durchstoßen und etwa 1-2pl der DNA Lösung injiziert. Die Injektionskapillare wurde vorsichtig zurückgezogen und die Zygote bis zum Ovidukttransfer in M16-Medium kultiviert.

Ovidukttransfer Die Embryonen wurden in pseudogravide Ammen des für diesen Zweck geeigneten Genotyps NMRI (C57BL6 \times DBA/2) FI transferiert. Zur Induktion einer Pseudogravidität wurden diese sich im Östrus befindenden Ammen zuvor mit vasktomierten Männchen verpaart. Durch den Paarungsreiz kommt es dann zur hormonellen Gravidität, „Pseudogravidität“ genannt.

Diese Ammentiere wurden dann mit Ketamin/Xylazin in Narkose gelegt. Es erfolgte ein transversaler Hautschnitt im Lendenbereich und die Eröffnung der Bauchhöhle. Das Ovar wurde mitsamt Fettkörper vorgelagert und auf einer sterilen Unterlage (Kimwipe) mittels einer Bulldogklemme am ovariellen Fettkörper fixiert. Die Bursa ovarica wurde dann zerschnitten und das Infundibulum mit Pinzette (Dumont Uhrmacher Pinzette #5) und sterilem Wattestäbchen unter Lupen-Kontrolle dargestellt. Die Embryonen wurden in die Retransferkapillare in der Reihenfolge Medium, Luftblase, Medium, Luftblase, Embryonen, Luftblase, Medium aufgezogen und dann ins Infundibulum appliziert. Die Eileiterampulle wurde daraufhin auf die drei Luftblasen und die stark geschwollene Ampulle untersucht. Anschließend erfolgte die Reposition des Ovars und der Verschluss der Bauch-

höhle mit Einzelheften (atraumatische Nadel, resorbierbares Nahtmaterial). Die Haut wurde geklammert. Dieser Eingriff wurde auch auf der anderen Körperseite wiederholt. Ein Teil der übertragenen Embryonen entwickelte sich in der Empfängermaus weiter.

3.8 Infektionsversuche

3.8.1 Infektion von Zellkulturen

ScN2a-Zellen, die auf PrP^{res}-negative Zellen hin zweimal kloniert wurden, wurden mit je 1ml Virusüberstand transduziert (siehe Seite 76). Die Zellen eines Sixwells wurden in 1ml VT abgelöst und je 500 μ l auf eine T75er-Flasche in 15ml OptiMEM, 10% FCS, Penicillin/Streptomycin ausgesät. Bei einer Konfluenz von 70-80% erfolgte dann die „Inokulation“ der Zellen mit frisch hergestelltem Hirnhomogenat. Dazu wurden sie dreimal mit PBS gewaschen und dann 200 μ l (Me7) bzw. 400 μ l (Chandler, 79A, uninfiertes Hirn einer C57BL-Maus) 10%iges Hirnhomogenat in 4,8 bzw. 4,6ml OptiMEM, 10% FCS, Penicillin/Streptomycin gelöst und auf die Zellen gegeben. Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank wurden 10ml Medium zugegeben und die Zellen bis zur Konfluenz im Brutschrank gehalten. Ernte und Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie für PrP^{res} (Seite 76).

Die 10%igen Hirnhomogenate wurden mittels Downser in OptiMEM unter sterilen Bedingungen hergestellt und anschließend bei 70°C für zehn Minuten erhitzt, um eventuell vorhandene Kontaminationsgefahr zu minimieren. In Vorversuchen wurde ermittelt, dass die Menge an vorhandenem PrP^{res} in 200 μ l 10%igem Me7-Homogenat der in 400 μ l Chandler- und 79A-Homogenat entsprach.

3.8.2 Infektion von Versuchstieren

Dieser Versuch fiel unter das vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigte Tierversuchsvorhaben Nr. 156 (Herstellung und Charakterisierung transgener Mauslinien mit gewebespezifischer Expression des Prionproteins oder der Expression artifizieller Prionproteine).

10%ige Hirnhomogenate final an Scrapie oder BSE erkrankter Tiere wurden mittels Downser unter sterilen Bedingungen in steriler Kochsalzlösung hergestellt und bei -20°C

gelagert. Die Tiere wurden mit Äther narkotisiert, mit Transponder versehen und je $30\mu\text{l}$ 10%iges Homogenat intrazerebral im Schnittpunkt der gedachten Verbindungslinie zwischen medialem Augenwinkel und lateralem Ohrgrund appliziert. Als Negativkontrolle dienten Mäuse, die mit 10%igem Hirnhomogenat einer nichtinfizierten C57BL-Maus inokuliert wurden, da die Stämme Me7- und BSE in C57BL Mäusen passagiert wurden. Als Positivkontrolle wurden C57BL Mäuse inokuliert. Pro Konstrukt wurden zwei Linien inokuliert. Pro Inokulum wurden je 15 Tiere einer Linie infiziert.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse aus Zellkulturarbeiten

Ziel war es, Glykosylierungsmutanten von PrP^{sen} zu finden, die sich möglichst wie Wildtyp-PrP verhalten. Sie sollten auf der Zelloberfläche nachweisbar, in ihre Proteinase K-resistente Isoform umfaltbar sein und so eine Infizierbarkeit transgener Tiere gewährleisten. Deshalb wurden zunächst verschiedene Erkennungssequenz-mutierte Maus-Prionproteine in Zellkultur exprimiert und charakterisiert. Um den möglichen Einfluss der Zelle auf die Glykosylierung und Expression zu untersuchen, wurden die Konstrukte in unterschiedlichen Zelllinien exprimiert.

4.1.1 Herstellung und Charakterisierung verschiedener monoglykosylierter PrP-Mutanten

Experimente von Lehmann et. al (Lehmann & Harris 1997) ließen darauf schließen, dass die erste Glykosylierungsstelle das Verhalten von PrP^{sen} bestimmt (Tab. 2, Seite 28). Deshalb wurde in der ersten Erkennungsstelle für Glykosylierung die Aminosäure Threonin an Position 182 gegen alle anderen möglichen Aminosäuren ausgetauscht. Das mutierte PrP-Gen wurde dann in Zellen stabil exprimiert, und die Zellen wurden anschließend auf die Zelloberflächenexpression von mutiertem PrP^{sen} untersucht.

Herstellung der Plasmide An Position 182 wurde die Aminosäure Threonin gegen alle anderen 19 möglichen Aminosäuren ausgetauscht. Dazu wurden PCR-Reaktionen mit je vier „Wobble“-Primern durchgeführt (Seite 63). Diese „Wobble“-Primer bestehen jeweils aus einem Primergemisch, so dass mit Hilfe dieser vier „Wobble“-Primer theoretisch alle für die entsprechenden Aminosäuren kodierenden Triplets synthetisiert werden können (Abb. 3). Mittels dieser „Wobble“-PCR-Reaktionen wurden jedoch nicht alle gewünschten Mutationen erhalten. Deshalb wurden folgende Kodon 182-Mutationen mit gezielt mutierten Primern in einer „site-directed“ PCR hergestellt: Valin, Glutamin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Lysin, Methionin, Arginin und Tryptophan. Die PCR-Produkte wurden anschließend über die Restriktionsenzyme *Bsu36I* und *BsteII* in den Vektor pcDNA3.1/Zeo(+)-mus3F4 kloniert. Das Plasmid pcDNA3.1/Zeo(+)-mus3F4 ent-

hält den ORF, 10bp upstream des ORF und 406bp des 3'-untranslatierten Bereichs des Prionprotein-Gens der Maus und stellt diese Genabschnitte unter die Kontrolle des CMV-Promotors. Zur gezielten Detektion des mutierten Genproduktes wurde das hamster-, mensch- und katzenspezifische Epitop des mAk3F4 eingeführt, indem Leucin an Kodon 108 und Valin an Kodon 111 zu Methionin mutiert wurden. Die Richtigkeit der mutierten Gene wurde im Restriktionsverdau und mittels Sequenzierung überprüft.

Expression der PrP-Mutanten in der Zellkultur - Untersuchungen im Westernblot und mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) Die Expressionsplasmide wurden mit Lipofectamine in Maus-Neuroblastomzellen (N2a-Zellen) transfiziert und auf stabil exprimierende Zellpopulationen mittels Zeocin selektioniert (Seite 74). Für jedes Konstrukt wurden mindestens zwei Transfektionen durchgeführt und die zeocinresistenten N2a-Zellpopulationen im Westernblot und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die mit einem EGFP-exprimierenden Plasmid in der FACS-Analyse ermittelte Transfektionseffizienz lag bei 70%.

Zur Ermittlung der Gesamtexpression und der Glykosylierungsmuster der Prionprotein-Mutanten wurden je 25µl 10%iges Zellysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und anschließend mit mAk3F4 und einem Visualisierungssystem entwickelt. Die Untersuchungen im Westernblot (Abb. 4) zeigten, dass jede Aminosäure außer Threonin und Serin an Position 182 zu einem Verlust der N-Glykosylierung führte. Da Threonin an Position 182 der Wildtyp-Aminosäuresequenz entspricht und Serin auch als Bestandteil der Erkennungssequenz für N-Glykosylierung bekannt ist, war eine Glykosylierung zu erwarten. Die diglykosylierte Bande des an Position 182 zu Serin mutierten Prionproteins stellte sich in den nicht auf Einzelklone selektionierten N2a-Zellen jedoch nur nach Überladen des SDS-PAGE als Schatten im Westernblot dar. Erst nach der Selektion stabil exprimierender Einzelzellklone (Abb. 4) und nach Entfernung der zweiten Glykosylierungsstelle wurde die Glykosylierung an Position 180 deutlich. Auch die Mutante T182C führte zu einem monoglykosylierten Prionprotein. Demnach wird die in der Literatur für den humanen EGF-Rezeptor beschriebene „Consensus-Site“ N-X-C (Sato, Kim, et al. 2000) im Fall von PrP nicht als Erkennungssequenz für N-Glykosylierung benutzt.

Template: pcDNA3.1/Zeo(+)*mus3F4*

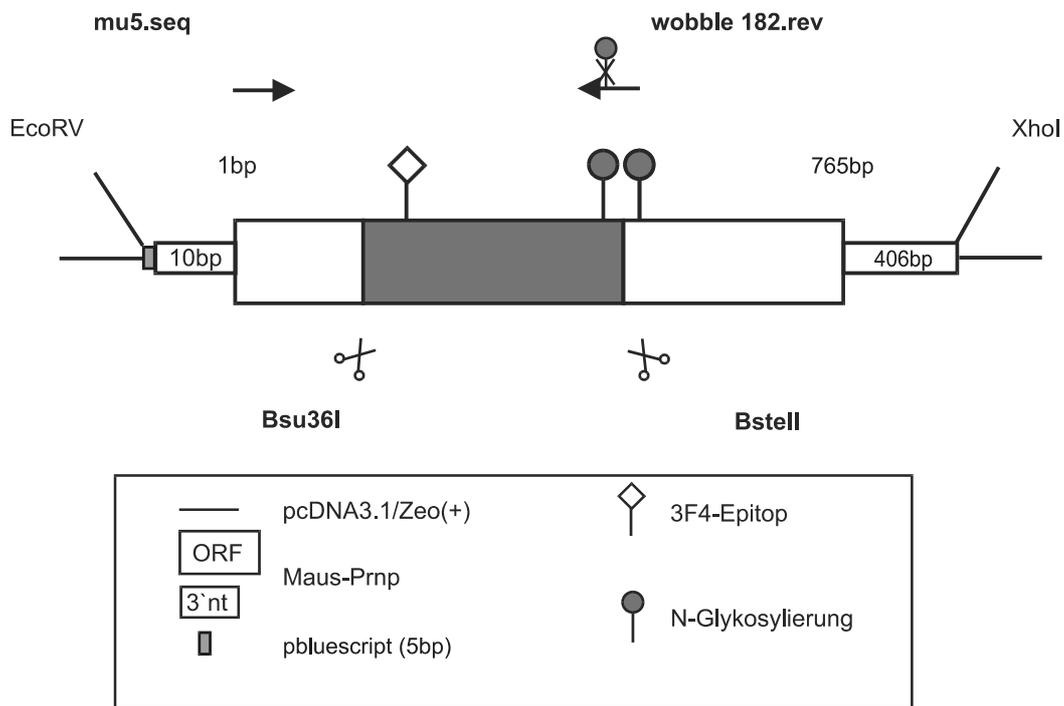


Abbildung 3: Klonierungsstrategie zur Herstellung verschiedener monoglykosylierter PrP-Mutanten:

Als Template für die PCR-Mutagenese diente der Vektor pcDNA3.1/Zeo(+)*mus3F4*, der sowohl den ORF als auch ihn flankierende Anteile des Maus-Prions enthält. Die Mutationen wurden mittels einer „site-directed“ PCR-Mutagenese mit den Primern mu5.seq und wobble 182.rev eingeführt. Die mutierten PCR-Produkte wurden dann über die Schnittstellen *Bsu36I* und *BstII* in den Vektor pcDNA3.1/Zeo(+)*mus3F4* kloniert.

Die Durchflusszytometrie erfolgte an intakten, nicht-permeabilisierten Zellen und wurde zur Untersuchung der Oberflächenexpression von PrP^{sen} eingesetzt. Da die Zellmembran für Antikörper nicht durchlässig ist, können nur Zellen Antikörper binden, die PrP^{sen} auf der Oberfläche exprimieren. Die Experimente wurden wie auf Seite 85 beschrieben mit mAk3F4 als Erstantikörper und sowohl FITC- als auch PE-markiertem Zweitantikörper durchgeführt. Als Kontrolle dienten mock-transfizierte Zellen, die mit dem Vektor pcDNA3.1/Zeo(+) transfiziert wurden, oder nicht-transfizierte Zellen. Zwischen beiden Kontrollzellpopulationen konnte kein Unterschied der FACS-Ergebnisse festgestellt werden. Als interne Kontrolle wurden Zellen analysiert, die nur mit dem Zweitantikörper inkubiert waren. Um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, die durch tote und dadurch permeabel gewordene Zellen entstehen könnten, wurde der Probe an DNA-bindendes Propidiumjodid zugegeben. Propidiumjodid-positive Zellen wurden bei der Auswertung der Daten ausgeschlossen. Mittels Durchflusszytometrie wurden drei PrP^{sen}-Mutanten gefunden, die auf der Zelloberfläche nachweisbar waren: Threonin, Serin und Asparagin (Tab. 3). Da die Aminosäuren Threonin und Serin an Kodon 182 nicht zu einem Verlust der ersten N-Glykosylierung führten, konnte nur ein mutiertes Prionprotein auf der Zelloberfläche gefunden werden, das monoglykosyliert ist: T182N (Abb. 5). Von 20 Genkonstrukten exprimierten also drei auf der Oberfläche präsent Prionprotein, von denen jedoch nur das Konstrukt mit der Mutation T182N zur Monoglykosylierung führte (Tab. 3).

4.1.2 Herstellung einer unglykosylierten Mutante

Ziel weiterer Versuche war es, eine unglykosylierte Variante des Prionproteins zu finden, die ebenfalls auf die Zelloberfläche transportiert wird. Deshalb kombinierten wir zwei Mutationen, die zum Verlust der entsprechenden Glykosylierungsstelle führten und von denen durch unsere Experimente und aus der Literatur (Lehmann & Harris 1997) bekannt war, dass sie den Transport von PrP^{sen} auf die Zelloberfläche ermöglichen. Es wurde das Konstrukt T182N/T198A kloniert (Abb. 6). Ein analoger Austausch von Threonin zu Asparagin war an Kodon 198 nicht möglich, da ansonsten eine neue Erkennungssequenz für eine N-Glykosylierung an Position 198 entstanden wäre (182NFNET200).

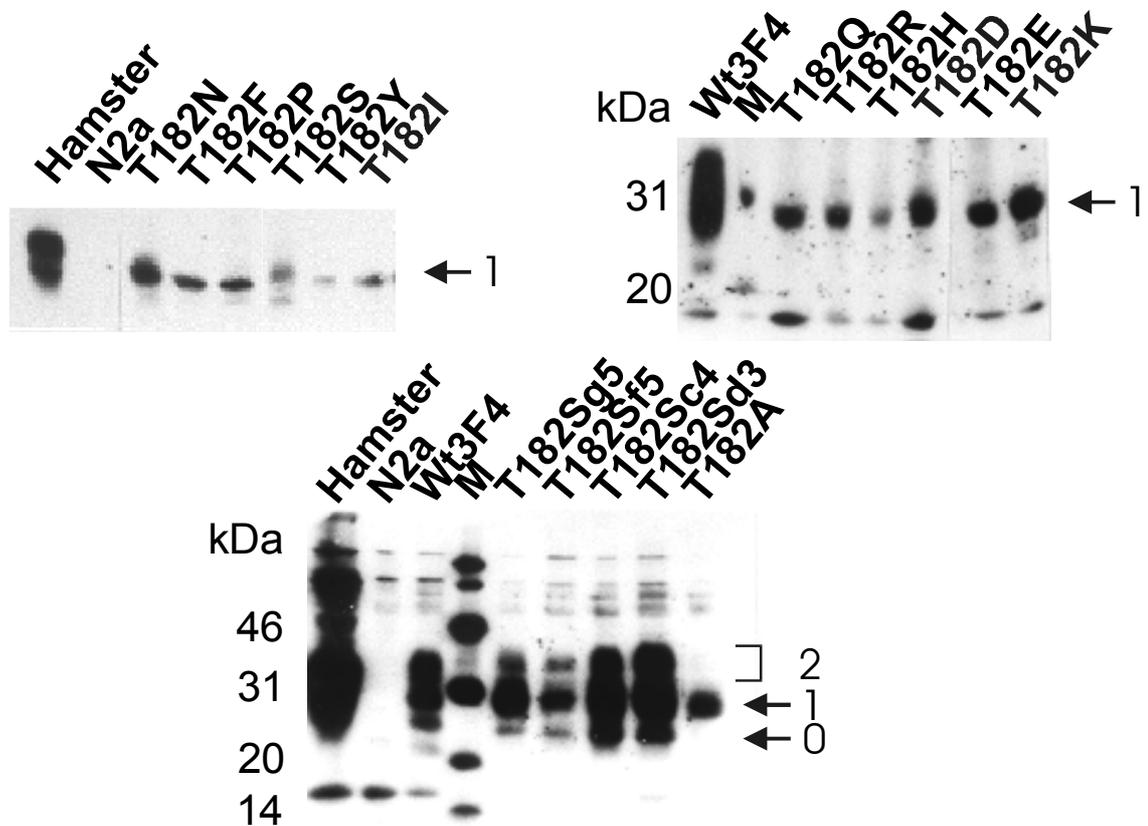


Abbildung 4: **Westernblot-Analyse von verschiedenen T182X-PrP-Mutanten exprimiert in N2a-Zellen**

Prionprotein wurde mit an Sepharose kovalent gebundenem mAk3F4 immunpräzipitiert. Anschließend wurde das Präzipitat im 13%igen SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Membran wurde mit mAk3F4-Azites und G α M inkubiert, und die Signale wurden mittels ECL-System und Röntgenfilm visualisiert. Als Positivkontrolle wurde Zelllysate der Wildtyp 3F4-Mutante oder 10%iges Hirnhomogenat eines Hamsters aufgetragen, als Negativkontrolle Zelllysate nicht-transfizierter N2a-Zellen.

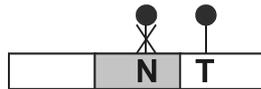
Oben: Alle T182X-Mutanten scheinen monoglykosyliert zu sein.

Unten: Westernblot-Analyse der T182S-Mutante exprimiert in subklonierten N2a-Zellen: Nach Subklonierung (durch g5, f5, c4, d3 dargestellt) wird ersichtlich, dass diese Mutation eine N-Glykosylierung an Kodon 180 nicht verhindert. Als monoglykosylierte Kontrolle wurde ein Subklon der Mutante T182A aufgetragen.

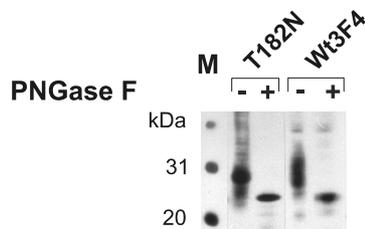
M: ECL-Marker

Aminosäure an Kodon 182	monoglykosyliert	Durchflusszytometrie
Ala	+	-
Cys	+	-
Asp	+	-
Glu	+	-
Phe	+	-
Gly	+	-
His	+	-
Ile	+	-
Lys	+	-
Leu	+	-
Met	+	-
Pro	+	-
Gln	+	-
Arg	+	-
Val	+	-
Trp	+	-
Tyr	+	-
Thr	nein	+
Ser	nein	+
Asn	+	+

Tabelle 3: T182X-Mutanten exprimiert in stabil transfizierten N2a-Zellen

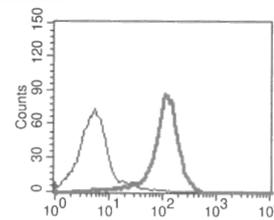


Westernblot



monoglykosyliert

Durchflusszytometrie



Oberflächenexpression

Abbildung 5: Maus-PrP^{sen} T182N exprimiert in subklonierten N2a-Zellen:

Westernblot: 10%iges Zellhomogenat mit (+) bzw. ohne (-) PNGase F-Behandlung wurde im 13%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Entwickelt wurde die Blotmembran mit dem mAk3F4. Als Kontrolle wurde Wildtyp-Maus-Prionprotein mit 3F4 Epitop (Wt3F4) mitgeführt.

Durchflusszytometrie: Zellen wurden mit mAk3F4 und PE inkubiert (dicke Linie). Als Kontrolle wurden Zellen nur mit PE inkubiert (dünne Linie).

Histogramm-Darstellung: Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen, auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Oberflächenexpression ist durch einen deutlichen Shift erkennbar.

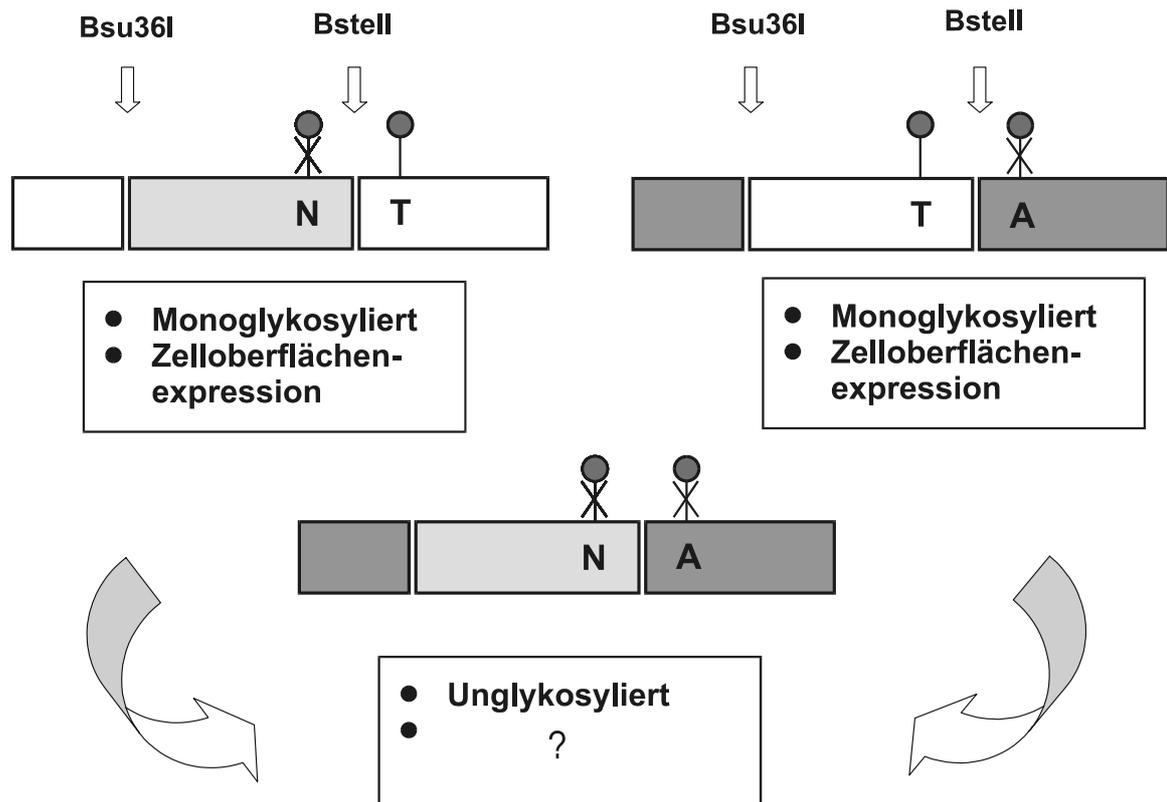


Abbildung 6: Strategie zur Herstellung der unglykosylierten Mutante T182N/T198A:

Durch die Kombination zweier monoglykosylierter und zelloberflächenexprimierter Mutanten wurde das Konstrukt T182N/T198A erhalten.

Herstellung des Plasmids Die Plasmide pcDNA3.1/Zeo(+)*mus3F4T182N* und pcDNA3.1/Zeo(+)*mus3F4T182A/T198A* wurden mit den Enzymen *Bsu36I* und *BsteII* geschnitten und das die Mutation T182N tragende Insert in den Vektor pcDNA3.1/Zeo(+)*mus3F4T182A/T198A* (Seite 101) ligiert. Das Konstrukt wurde über Restriktionsverdau und Sequenzierung auf seine Richtigkeit überprüft.

Expression auf Proteinebene in Zellkultur - Untersuchung im Westernblot und in der Durchflusszytometrie (FACS)-Analyse Das Expressionsplasmid wurde mit Lipofectamine in Maus-Neuroblastomzellen (N2a-Zellen) transfiziert und stabil exprimierende Zellpopulationen wurden mittels Zeocin selektioniert (Seite 74). Die zeocinresistenten N2a-Zellpopulationen wurden im Westernblot und in der Durchflusszytometrie untersucht. Im Westernblot konnte zwar unglykosyliertes PrP mit einer molaren Masse von etwa 24kDa detektiert werden, in der Durchflusszytometrie war jedoch Prionprotein auf der Zelloberfläche nicht eindeutig detektierbar. Erst die Untersuchung von klonierten Einzelzelllinien erbrachte in der Durchflusszytometrie einen deutlichen Hinweis auf oberflächenpräsentes PrP^{sen} (Abb. 7).

4.1.3 Vergleich der Maus-PrP^{sen}-Mutanten T182N, T182N/T198A mit den in der Literatur beschriebenen T182A-, T198A- und T182A/T198A-Mutanten: Verhalten in verschiedenen Zelllinien

Zum Vergleich der oben beschriebenen Maus-PrP-Mutanten wurden auch die in der Literatur erwähnten Konstrukte hergestellt. Zur Ermittlung des möglichen Einflusses der Zelllinie auf Glykosylierung und Trafficking wurde mit N2a-, CHO-Zellen und Maus-Fibroblastenzellen gearbeitet. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle ein Plasmid kloniert, das für N-Signalsequenz deletiertes, 3F4-Epitop-getaggtes Maus-Prionprotein kodiert.

Herstellung der Plasmide

Threonin-Alanin Austausch Maus-PrP^{sen}-Glykosylierungsmutanten wurden durch einen Threonin- zu Alanin-Austausch in jeweils einer und in beiden Erkennungssequenzen für die N-Glykosylierung hergestellt (Abb. 8). Die entsprechende Mutation wurde

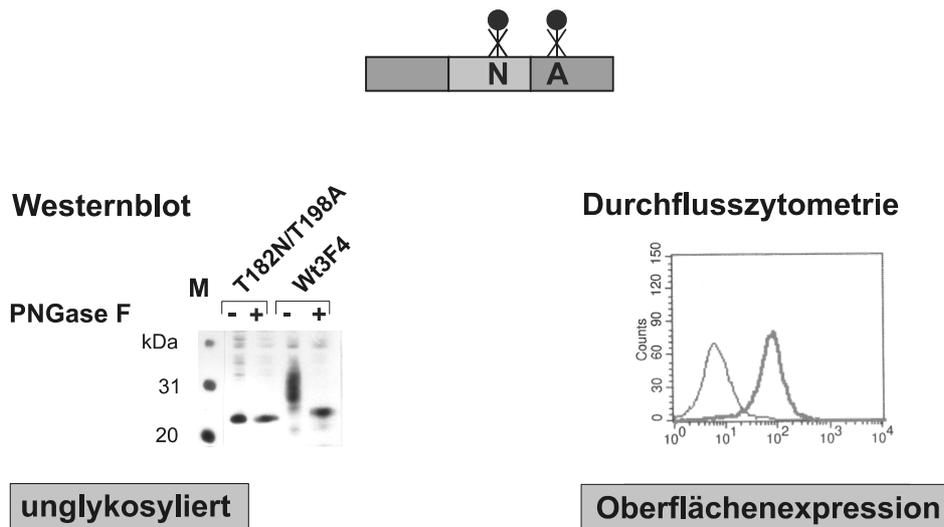


Abbildung 7: Maus-PrP^{sen} T182N/T198A exprimiert in subklonierten N2a-Zellen:

Westernblot: 10%iges Zellhomogenat mit (+) bzw. ohne (-) PNGase F-Behandlung wurde im 13%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Entwickelt wurde die Blotmembran mit dem mAk3F4. Als Kontrolle wurde Wildtyp-Maus-Prionprotein mit 3F4 Epitop (Wt3F4) mitgeführt.

Durchflusszytometrie: Zellen wurden mit mAk3F4 und PE inkubiert (dicke Linie). Als Kontrolle wurden Zellen nur mit PE inkubiert (dünne Linie).

Histogramm-Darstellung: Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen, auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Oberflächenexpression ist durch einen deutlichen Shift erkennbar.

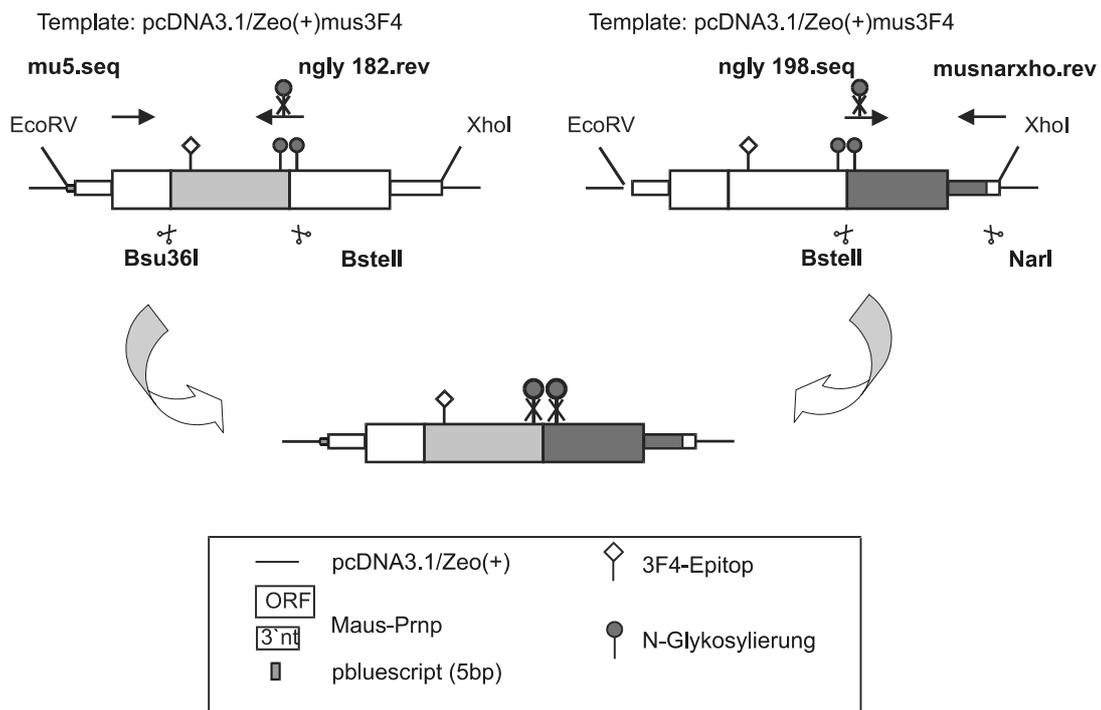


Abbildung 8: Herstellung von Maus-Glykosylierungsmutanten durch Threonin-Alanin-Austausch:

Die monoglykosylierten Mutanten T182A (oben links) und T198A (oben rechts) wurden über PCR-Mutagenese wie auf Seite 101 beschrieben hergestellt und kloniert. Die unglykosylierte „Doppelmutante“ T182A/T198A (unten) entstand durch die Kombination der beiden monoglykosylierten Konstrukte.

mittels „site-directed“ PCR-Reaktion (Seite 61) eingeführt. Als Template diente das Plasmid pcDNA3.1/Zeo(+)/mus3F4. Für die Herstellung des Konstruktes mit der Mutation T182A wurden die Primer mu5.seq und ngly182.rev, für die Mutation T198A die Primer ngly198.seq und musnarxho.rev verwendet. Die Klonierung erfolgte über die Schnittstellen *Bsu36I* und *BstII* im Falle der Mutation T182A, bzw. über *BstII* und *NarI* zur Einführung der Mutation T198A in den Vektor pcDNA3.1/Zeo(+)/mus3F4.

Die Vektoren pcDNA3.1/Zeo(+)/mus3F4T182A und pcDNA3.1/Zeo(+)/mus3F4T198A wurden mit den Enzymen *BstII* und *NarI* geschnitten, und das Insert mit der Mutation T198A wurde in den Vektor pcDNA3.1/Zeo(+)/mus3F4T182A ligiert. Zur Überprüfung der Konstrukte wurden die Plasmide sequenziert und zur Kontrolle mit den Enzymen *ApoI* und *SspI* verdaut. Diese Schnittstellen sind jeweils spezifisch für den Verlust einer

Erkennungssequenz für Glykosylierung und wurden über stille Mutation eingeführt (Abb. 9).

Deletion der N-Signalsequenz Die Deletion der N-Signalsequenz (aa1-22) wurde mittels SOE-PCR (Seite 64) eingeführt. Das Insert wurde, wie im Methodenteil beschrieben, mutiert und anschließend über die Enzyme *PstI* und *BstEII* in den Vektor pcDNA3.1/Zeo(+)-mus3F4 ligiert (Abb. 10). Die Richtigkeit des Konstruktes wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

Expression der PrP-Mutanten in der Zellkultur - Untersuchung der Glykosylierung im Westernblot N2a- und CHO-Zellen wurden mittels Lipofectamine (Seite 74) mit den Konstrukten transfiziert und stabil exprimierende Zellen mit Zeocin selektiert und auf Einzelzellebene kloniert. Maus-Fibroblastenzellen wurden mit Kalziumphosphat transfiziert (Seite 75) und exprimierende Zellkulturpopulationen analysiert.

Zunächst wurden die mutierten Prionproteine auf das Glykosylierungsmuster im Westernblot untersucht. Um nachzuweisen, dass die Zuckerketten N-glykosidisch gebunden sind, wurden Zelllysate mit dem Enzym PNGase F verdaut (Seite 78). Dieses Enzym deglykosyliert selektiv N-glykosylierte Proteine, indem es alle Typen Asparagin-gebundener N-Glykanketten spaltet. Gleiche Mengen an unverdaulichem und verdaulichem Protein wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und der Blot mit mAk3F4 entwickelt (Abb. 12). Da die verdauten Proteine einen Shift auf die Höhe der unglykosylierten PrP-Bande zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass durch die eingeführte Mutation tatsächlich die entsprechende Glykosylierungsstelle zerstört wurde.

Beim Vergleich der monoglykosylierten Mutanten fiel auf, dass PrP^{sen}-Mutanten T182A und T182N eine breitere monoglykosylierte Bande mit höherer molekularer Masse zeigten als die PrP^{sen}-Mutante T198A. Beim Vergleich der beiden PrP^{sen}-Mutanten, die zum Verlust der ersten Glykosylierungsstelle führten, fiel auf, dass die unglykosylierte Form bei der Mutante T182A immer schwächer als bei T182N zu detektieren war (Abb. 11, 12, 14, 16). Im weiteren besaß die monoglykosylierte Form von PrP^{sen}-T182N im Vergleich zu T182A eine höhere molekulare Masse (Abb. 11).

Beim Vergleich der Proteinexpression der verschiedenen Konstrukte in unterschiedlichen

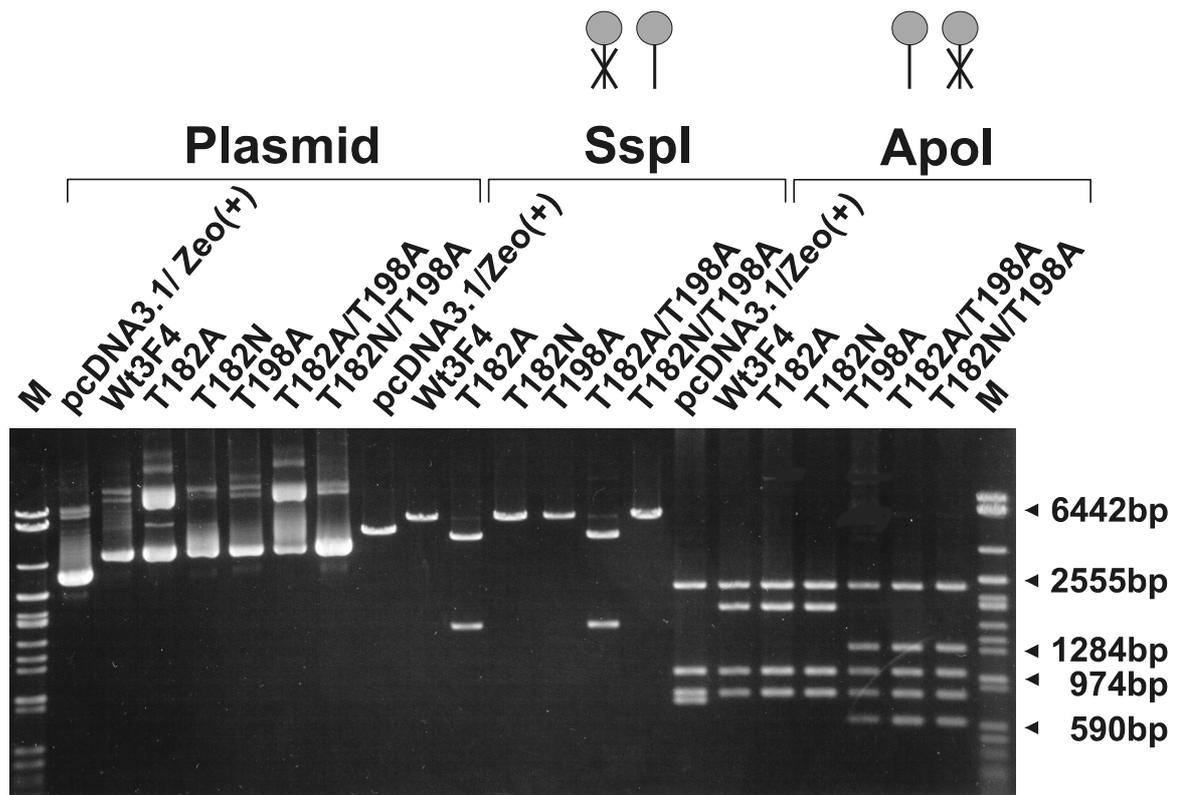


Abbildung 9: **Kontrollverdau der Plasmide, die für verschiedene PrP^{sen}-Mutanten kodieren:**

Als Kontrolle wurde der „leere“ Vektor pcDNA3.1/Zeo(+) aufgetragen. Auf den Spuren 2-8 stellt sich unverdaute Plasmid-DNA dar.

Spuren 9-15: Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *SspI* geschnitten und im 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Dieses Enzym schneidet einmal im Plasmid pcDNA3.1/Zeo(+). Es entstand ein 5010bp großes Fragment (Spur 9); bzw. nach Einführung des Inserts ein 6178bp großes Fragment (Spur 10 und Spuren 12, 13, 15). Durch die Verwendung des Primers 182ngly.rev, der an Kodon 182 einen Threonin-zu-Alanin-Austausch einführt, entstand mittels stiller Mutagenese im Insert eine Schnittstelle für das Enzym *SspI*. In den Spuren 11 und 14 sind deshalb 1632bp und 4546bp große Fragmente zu sehen.

Spuren 16-22: Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *ApoI* geschnitten. Dieses Enzym schneidet viermal im pcDNA3.1/Zeo(+) (Spur 16) und nicht innerhalb des ORF von murinem PrP (Spuren 17, 18, 19). In der Folge entstehen beim Verdau des „leeren“ Plasmids vier Fragmente mit den Größen 759bp, 825bp, 1027bp, und 2399bp (Spur 16). Nach Einführung des Inserts zeigen sich nach dem Verdau vier Fragmente mit den Größen 825bp, 967bp, 2004bp und 2382bp (Spuren 17, 18, 19). Durch die Verwendung des Primers 198ngly.seq, der an Kodon 198 einen Threonin-zu-Alanin-Austausch einführt, wurde mittels stillem Austausch im Insert eine Schnittstelle für das Enzym *ApoI* eingeführt. In den Spuren 20 bis 22 sind deshalb 596bp und 1408bp große Fragmente zu sehen. M: Standardlängenmarker λ -DNA/Eco47I (*AvaII*)

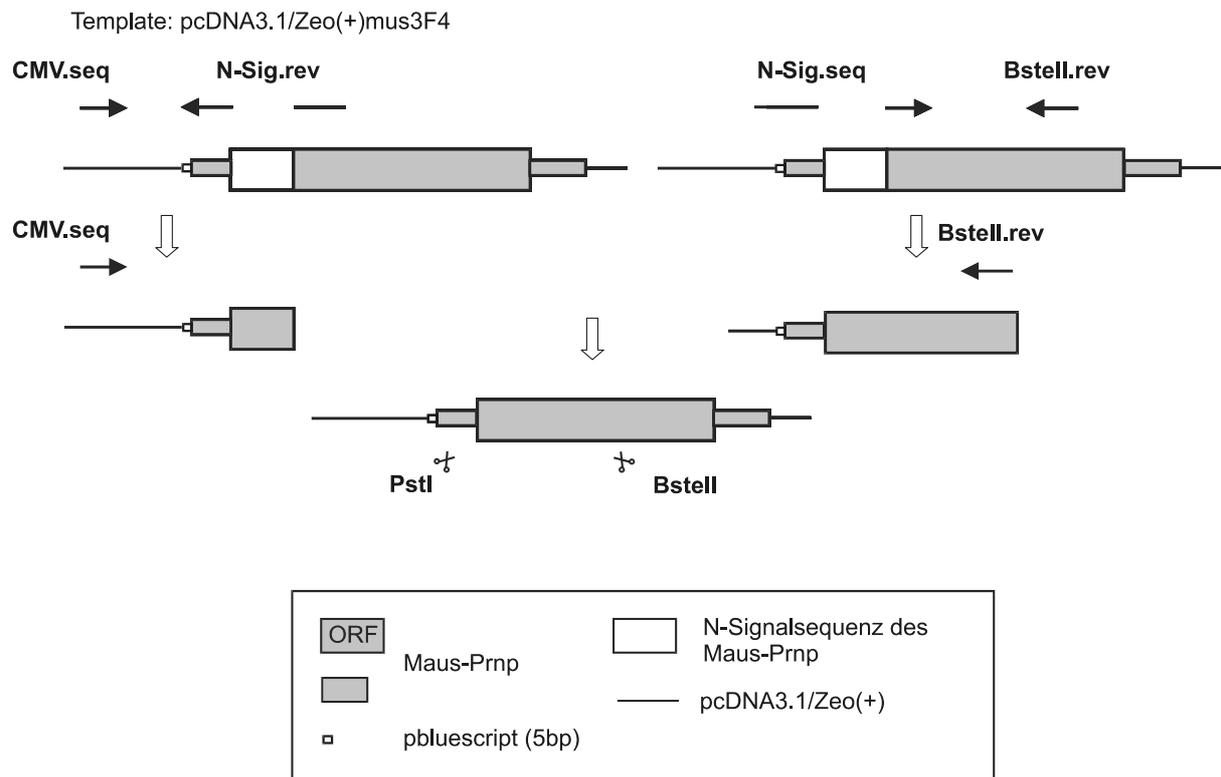


Abbildung 10: **Klonierungsstrategie zur Deletion der N-Signalsequenz:**

Die N-Signalsequenz des Maus-Prionproteins wurde über eine SOE-PCR (splicing by overlap extension) entfernt (Seite 64). Dazu wurden zwei sich überlappende Fragmente amplifiziert (**oben**) in zwei getrennten Reaktionen mit Primern, die zur Sequenz vor und nach der gewünschten Deletion komplementär sind. In einer weiteren Reaktion (**mitte**) wurden die Stücke zum gewünschten PCR-Produkt amplifiziert, welches dann über die Schnittstellen *PstI* und *BsteII* in den Vektor pcDNA3.1/Zeo(+)_{mus3F4} kloniert wurde (**unten**).

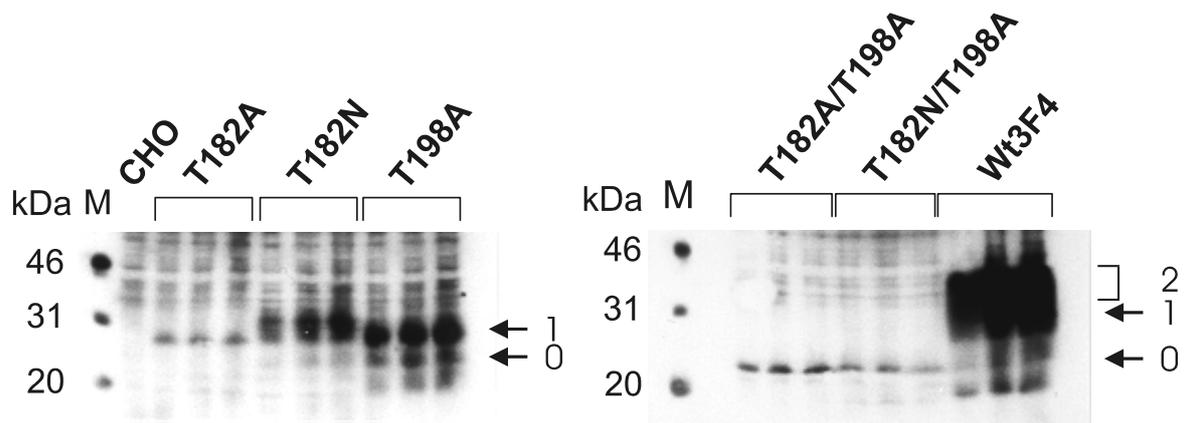


Abbildung 11: **Westernblotanalyse verschiedener Erkennungssequenz-Mutanten, die in subklonierten CHO (Chinese Hamster Ovary) - Zellen exprimiert waren:**

10%ige Zelllysate wurden im 13%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Als Negativkontrolle wurden 25µl Zelllysate untransfizierter CHO-Zellen geladen. In den weiteren Spuren wurden pro Konstrukt jeweils 15, 20 und 25µl Zelllysate aufgetragen. Entwickelt wurde die Blotmembran mit mAk3F4. Endogenes Hamster-PrP war in nicht-transfizierten CHO-Zellen unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht nachweisbar. Jedes Konstrukt wurde auf Proteinebene jeweils in der erwarteten Glykoform exprimiert.

links: monoglykosylierte Prionproteine

rechts: unglykosylierte (T182A/T198A und T182N/T198A) und diglykosylierte (Wt3F4) Prionproteine.

Die verschiedenen Glykoformen von PrP (di- (2), mono- (1) und unglykosyliert (0)) sind im rechten Bildrand gekennzeichnet.

M: ECL-Molekulargewichtsmarker

Zelllinien konnten keine starken Unterschiede festgestellt werden (Abb. 11, 12, 20). Lediglich die PrP^{sen}-Mutante T182N/T198A zeigte eine zusätzliche Bande bei ca. 26kDa, wenn das Konstrukt in Maus-Fibroblastenzellen exprimiert wurde (Abb. 12). In N2a- und CHO-Zellen konnte diese zusätzliche Form nicht detektiert werden (Abb. 11 und 12). Da diese Bande nicht durch das Enzym PNGase F beeinflusst wurde, konnte es sich nicht um eine N-Glykosylierung handeln (Abb. 12). Auch Fragmente proteolytischen Abbaus konnten für die beiden sichtbaren Formen der T182N/T198A-Mutante ausgeschlossen werden, da sowohl N-terminal-bindende (mAk3B5, mAk3F4) als auch mehr C-terminal-bindende (polykolonales Antiserum Ra5/7, mAk6H4 und mAk2D6) Antikörper beide Produkte erkannten. Da diese zusätzliche Bande verstärkt detektierbar war (Abb. 23 unten), wenn Zellysate in Proben-Puffer mit niedrigem SDS-Gehalt (>2%) oder in Nativ-Puffer gekocht wurden, ist anzunehmen, dass es sich um eine mögliche zweite Konformation dieses mutierten PrP-Proteins unter Nativbedingungen handelte.

Proteintrafficking - Durchflusszytometrie und biochemische Untersuchungen

Durchflusszytometrie Nachdem die Glykosylierung überprüft wurde, sollte bestimmt werden, ob diese PrP^{sen}-Mutanten auf die Zelloberfläche transportiert werden. Dazu wurden FACS-Analysen wie zuvor beschrieben (Seite 84 und 94) durchgeführt. Als zusätzliche Kontrolle wurde mit dem Konstrukt pcDNA3.1/Zeo(+)-mus3F4 Δ N-Sig gearbeitet, das für ein PrP^{sen} kodiert, dessen N-Signal-Sequenz deletiert ist (Seite 104). Dieses Protein wird daher weder im ER noch im Golgi-Apparat prozessiert und nicht auf der Zelloberfläche exprimiert. Untersucht wurden transfizierte Maus-Fibroblastenzellen und Subklone von transfizierten N2a- und CHO-Zellen. Die PrP^{sen}-Mutanten T182N, T198A und T182N/T198A wurden im Vergleich wie Wildtyp 3F4 getaggetes Prionprotein auf die Zelloberfläche transportiert, während T182A und T182A/T198A nur in geringen Mengen auf der Zelloberfläche detektierbar waren (Abb. 13). Diese geringen Mengen konnten nur mit PE-markiertem Zweitantikörper und nicht mit dem im Vergleich 20fach weniger sensitiven FITC nachgewiesen werden.

Oberflächenbiotinylierung Um die durchflusszytometrischen Ergebnisse abzusi-
chern, wurden N2a-Zellen oberflächenbiotinyliert (Seite 82). Bei dieser Methode wurden

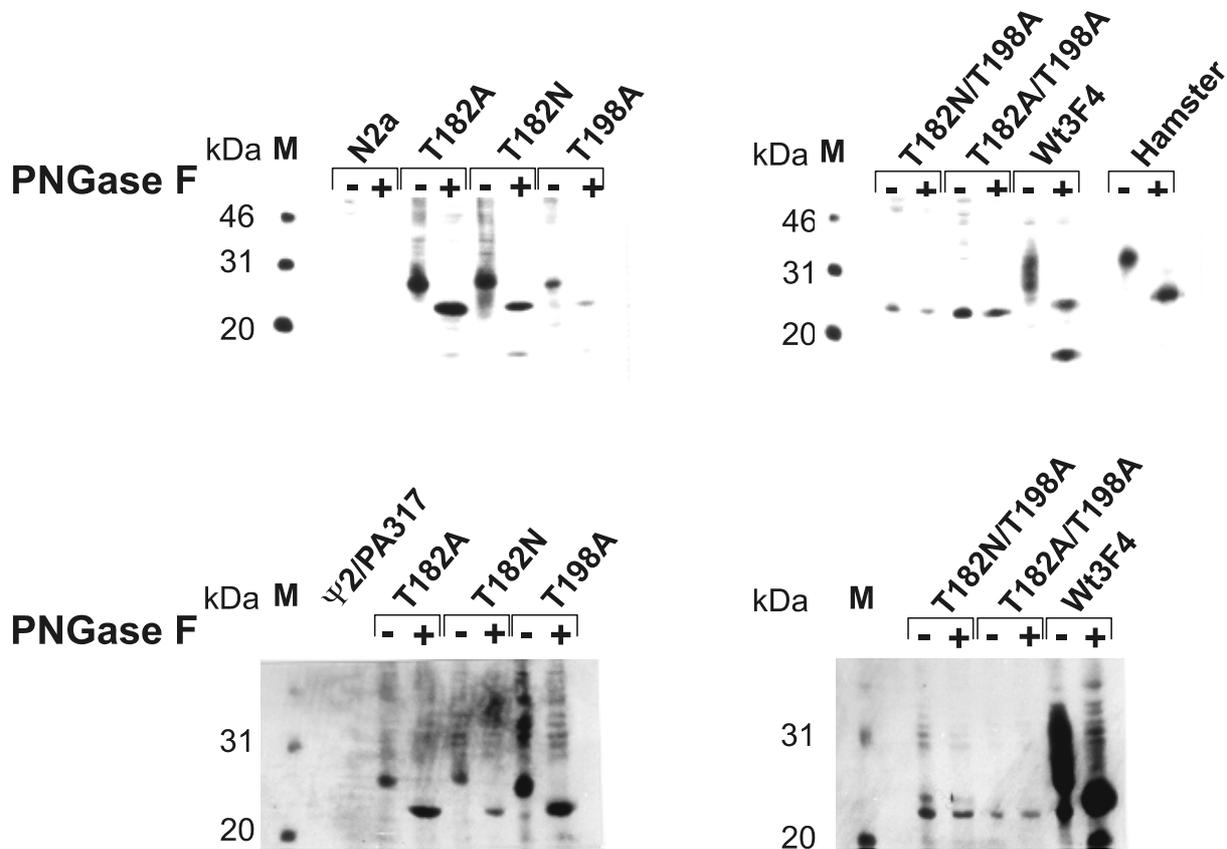


Abbildung 12: **Westernblot-Analyse verschiedener Erkennungssequenz-Mutanten vor (-) und nach (+) PNGase F-Verdau:**

10%ige Zelllysate wurden im 13%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem mAk3F4 entwickelt. Als Negativkontrolle wurde jeweils Zelllysate nicht-transfizierter Zellen aufgetragen.

oben: Die verschiedenen Konstrukte wurden in N2a-Zellen stabil transfiziert: Nach dem Verdau kommt es zu einem Shift in den niedermolekularen Bereich von unglykosyliertem PrP.

unten: Die verschiedenen Konstrukte exprimiert in Maus-Fibroblastenzellen (Ψ 2/PA317). PrP-Mutante T182N/T198A zeigt eine Zusatzbande bei etwa 26kDa, die durch die Enzymbehandlung unbeeinflusst bleibt. Deshalb handelt es sich nicht um eine N-glykosylierte Form von PrP.

M: ECL-Molekulargewichtsmarker

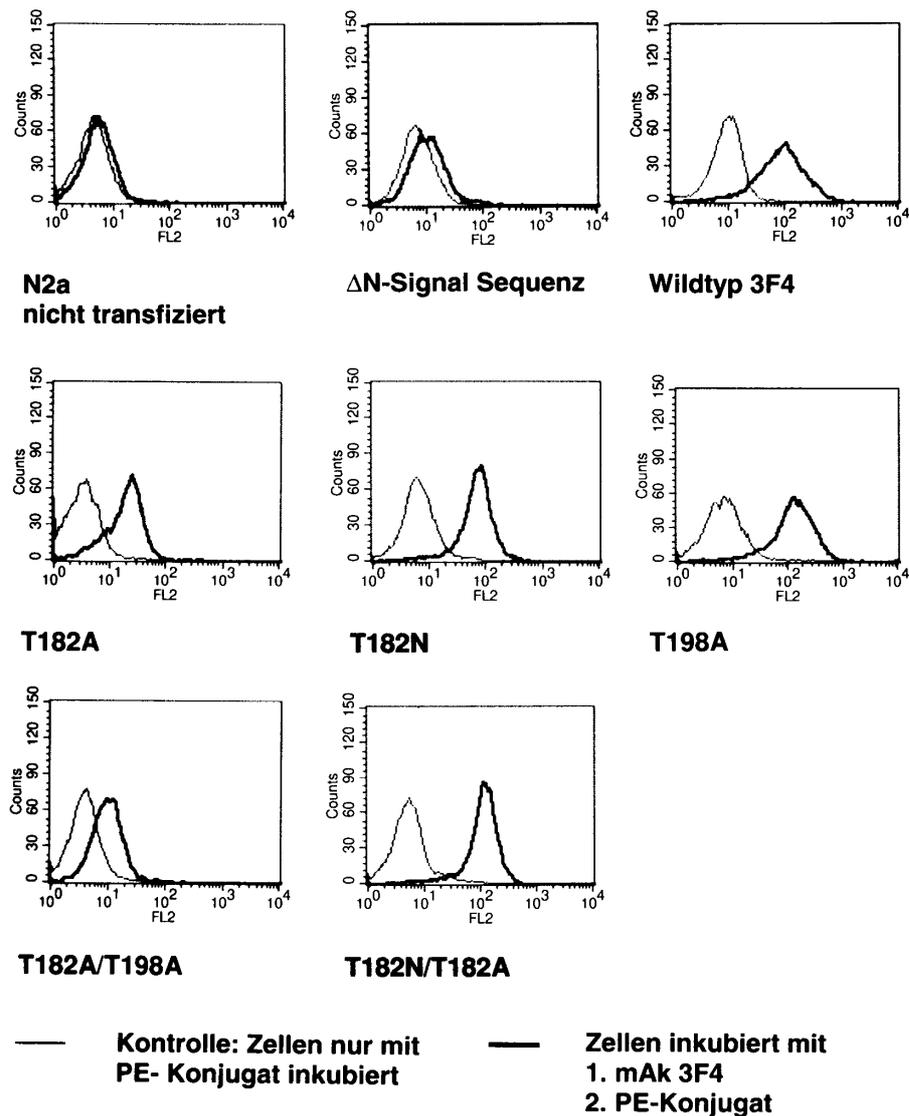


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Untersuchung der verschiedenen Erkennungssequenz-Mutanten exprimiert in subklonierten N2a-Zellen:

Durchflusszytometrie dargestellt als Histogramm: Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen, auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Zellen wurden mit mAb3F4 und PE inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen nur mit PE inkubiert. Die Oberflächenexpression ist durch einen deutlichen Shift erkennbar. Die im Rahmen dieser Arbeit neu konzipierten Mutanten sind in der zweiten Spalte dargestellt.

Erste Zeile: Kontrollen; nicht-transfizierte N2a-Zellen und Δ N-Sig.-PrP exprimierende N2a-Zellen als Negativkontrollen. Als Positivkontrolle Wildtyp 3F4 exprimierende Zellen.

Zweite Zeile: monoglykosylierte Mutanten.

Dritte Zeile: unglykosylierte Mutanten.

Alle Glykosylierungsmutanten werden auf der Zelloberfläche exprimiert, wenn auch T182A/T198A nur in geringen Mengen.

alle auf der Zelloberfläche anwesenden Proteine mit für die Zellmembran nicht durchlässigem Biotin markiert, die Biotinylierungsreaktion abgestoppt, PrP mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 immunpräzipitiert und anschließend auf dem Blot mit an Biotin bindender Streptavidin-Peroxidase entwickelt. Auf dem Blot war demnach nur noch oberflächenexprimiertes PrP zu sehen. Als Kontrolle für Expression und Immunpräzipitation wurden Zellen mitgeführt, die gleich behandelt wurden, denen jedoch kein Biotin zugegeben wurde. Der kritische Punkt dieser Methode ist, dass eine Markierung von in der Zelle vorhandenem Protein ausgeschlossen sein muss. Dies wurde überprüft, indem das strikt intrazellulär vorkommende β -Aktin nachgewiesen werden sollte. Dazu wurden N2a-Zellen biotinyliert, die Reaktion einmal abgestoppt und einmal nicht abgestoppt und anschließend mit einem monoklonalen Antikörper gegen β -Aktin immunpräzipitiert. Da in der abgestoppten Probe kein β -Aktin-spezifisches Signal detektierbar war, konnte eine Markierung intrazellulärer Proteine ausgeschlossen werden. Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen nach der Biotinylierungsreaktion mittels Trypanblau auf tote und daher permeabel gewordene Zellen hin untersucht. Der Anteil an toten Zellen lag jedoch unter 1%. Wie auf Abb. 14 dargestellt, konnten mit dieser Methode die FACS-Ergebnisse bestätigt werden.

Endo H-Verdau Um den Weg der PrP^{sen}-Mutanten in der Zelle genauer zu untersuchen, wurden Zellysate transfizierter N2a-, CHO- und Maus-Fibroblastenzellen mit dem Enzym Endo H (Endoglykosidase H) verdaut (Seite 79). Dieses Enzym spaltet den Chitobiose-Core von N-Glykanen des mannosereichen Typs und den einiger Komplex-Typen. Komplex-Typ N-Glykane können mit dem Enzym Endo H nicht mehr verdaut werden, nachdem das Enzym MannosidaseII im mid-Golgi-Apparat aktiv war. Demnach sollten PrP^{sen}-Moleküle, die mindestens das mid-Golgi-Kompartiment erreichen, durch Endo H nicht mehr deglykosyliert werden.

PrP wurde im SDS-PAGE getrennt und nach Westernblot mit mAk3F4 detektiert. Wie man auf Abb. 15 sieht, zeigten PrP^{sen}-T198A und Wt3F4 eine vollständige Resistenz gegenüber einer Endo H-Behandlung, während PrP^{sen}-T182A und -T182N einen partiellen Shift in den niedermolekularen Bereich zeigten. Dies ließ auf eine partielle Resistenz und daher partielle PrP-Prozessierungsstörung schließen. Da bei der Prionprotein-Mutante

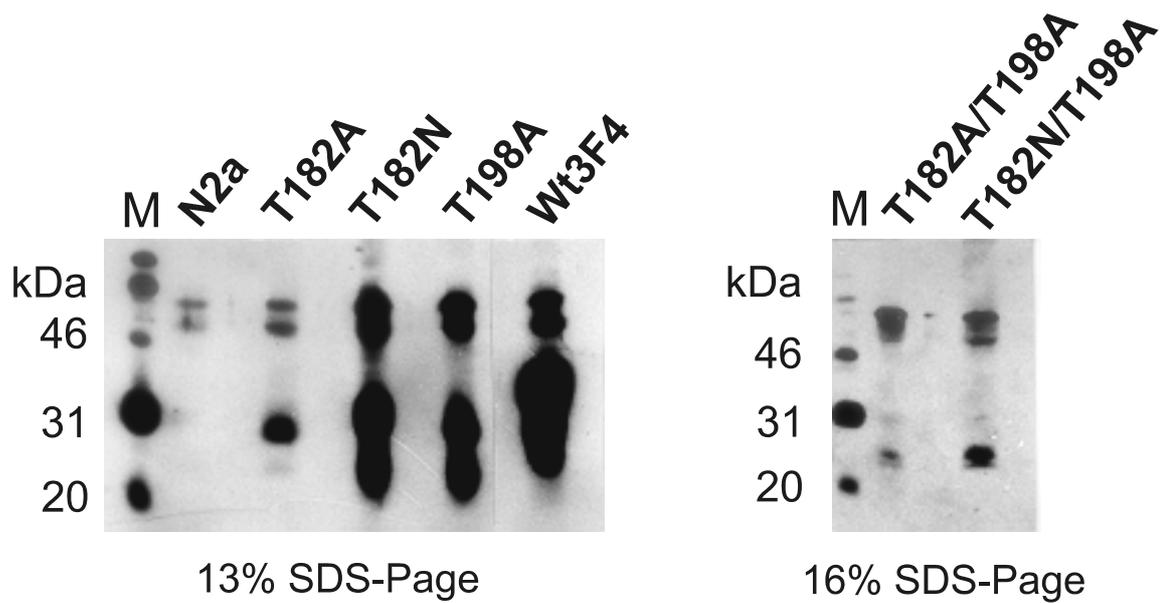


Abbildung 14: **Westernblot-Analyse verschiedener Erkennungssequenz-Mutanten exprimiert in subklonierten N2a-Zellen nach Oberflächenbiotinylierung:**

Als Kontrolle wurden nicht-transfizierte N2a-Zellen mitgeführt. Die Blotmembranen wurden mit S-PO inkubiert. Jede PrP-Mutante ist nach Oberflächenbiotinylierung im Blot detektierbar und demnach auf der Zelloberfläche präsent; PrP^{sen}-T182A und -T182A/T198A jedoch nur in geringen Mengen.

M: ECL-Molekulargewichtsmarker

T182A im Vergleich zur Mutante T182N weniger Moleküle resistent waren, konnte auf ein vergleichbar größeres Defizit bei der Prozessierung der Mutante T182A geschlossen werden. Demnach bestätigte auch dieses experimentelle Ergebnis die vorausgegangenen durchflusszytometrischen Untersuchungen.

Auch bei diesem Experiment mussten mögliche Fehlerquellen ausgeschlossen werden. Ein Problem lag darin, dass Endo H eine molekulare Masse von 29kDa besitzt und bei einer Enzymzugabe von $>2\mu\text{l}$ als schwache Bande im Blot auf Höhe der monoglykosylierten Bande zu detektieren war. Dies wurde durch steigende Zugaben von Endo H zu Zelllysaten nicht-transfizierter und transfizierter Zellen bestimmt. Die PrP-spezifische Bande war aber stets deutlich stärker zu sehen. Da in den hier vorgestellten Experimenten immer nicht-transfizierte Zellen als Kontrolle mitgeführt wurden, konnten durch Endo H vorgetäuschte falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden. Ein anderes Problem lag darin, dass größere Oligosaccharidstrukturen, deren Vorkommen für die zweite Glykosylierungsstelle von PrP bekannt ist, langsamer durch Endo H abgelöst werden (Katalog von Oxford Glycosystems). Deshalb wurde Zelllysate der Mutanten T182A und T182N über vier Tage verdaut, wobei am ersten und am zweiten Tag je $5\mu\text{l}$, am dritten Tag $10\mu\text{l}$ Endo H zugegeben wurden. Auch unter diesen Versuchsbedingungen bestätigten sich die vorausgegangenen Ergebnisse.

PIPLC-Verdau Anschließend sollte untersucht werden, wie die Proteine auf der Zelloberfläche verankert sind. Dazu wurden intakte Zellen mit dem Enzym PIPLC behandelt, das zwischen den Bestandteilen Diacylglycerol und Inositolphosphat des GPI-Ankers angreift und so GPI-membranverankerte Proteine von der Zelloberfläche ablöst. Der Zellkulturüberstand wurde dann gefällt, elektrophoretisch getrennt und Prionprotein im Westernblot mit mAk3F4 detektiert (Seite 79). Es wurde ersichtlich, dass alle Maus-PrP-Mutanten wie Wt3F4 mit PIPLC ablösbar waren, allein PrP^{sen}-T198A ließ sich nicht mittels PIPLC in den Überstand freisetzen (Abb. 16). Da die vorhergehenden Versuche zeigten, dass diese Mutante jedoch auf der Zelloberfläche präsent ist, muss eine andere Verankerungsform angenommen werden oder eine Konformation dieses Moleküls, die den Angriff des Enzyms sterisch verhindert. Da die „Doppelmutanten“ T182A/T198A und T182N/T198A mit PIPLC ablösbar waren, scheint letztere Vermutung wahrschein-

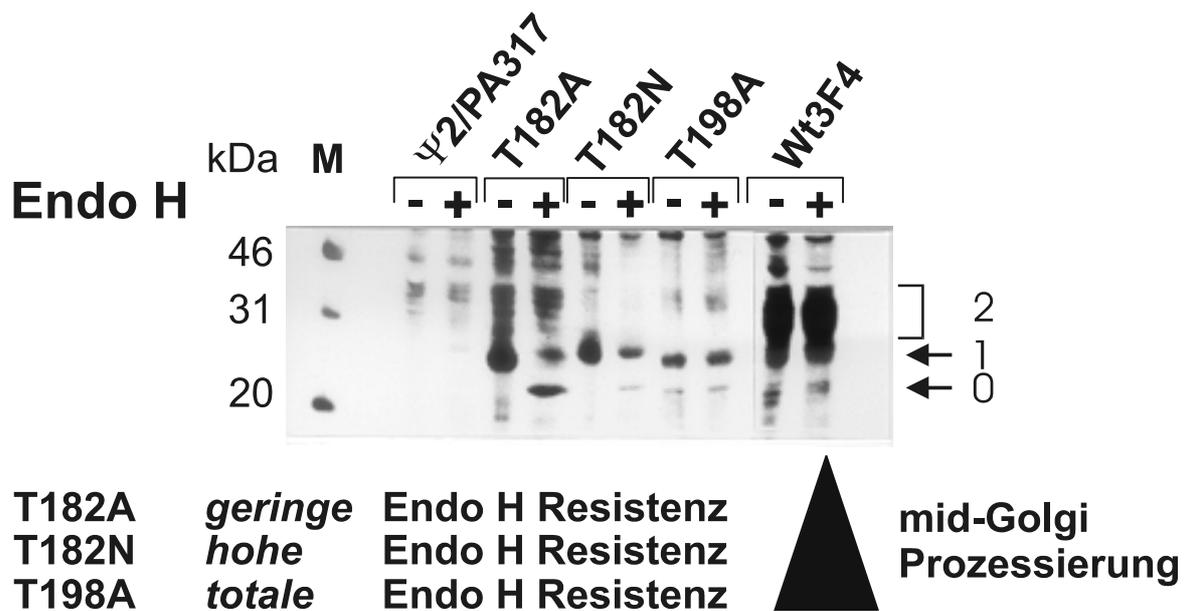


Abbildung 15: Westernblot-Analyse verschiedener Erkennungssequenz-Mutanten exprimiert in NIH3T3 abstammenden Maus-Fibroblastenzellen (Ψ 2/PA317) vor (-) und nach (+) Endo H-Verdau:

Als Kontrolle wurden nicht-transfizierte Maus-Fibroblastenzellen mitgeführt.

M: ECL-Molekulargewichtsmarker

Durch den mAk3F4 werden auch nicht PrP spezifische Signale erkannt.

Die verschiedenen Glykoformen von PrP (di- (2), mono- (1) und unglykosyliert (0)) sind im rechten Bildrand gekennzeichnet.

licher. Demnach waren alle PrP^{sen}-Mutanten so wie Wt3F4 GPI-verankert, während die Verankerung von PrP^{sen}-T198A mit dieser Methode nicht geklärt werden konnte. Unter natürlichen Bedingungen können 10% der PrP^{sen}-Moleküle im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (Stahl, Borchelt, et al. 1990; Borchelt, Rogers, et al. 1993). Daher spricht der Nachweis von PrP in der Negativkontrolle der Mutanten T182N, T198A und T182N/T198A für deren weitgehend physiologische Prozessierung.

Weitere biochemische Untersuchungen

Löslichkeit Zelluläres PrP^{sen} ist in detergentshaltigem Puffer löslich (Meyer, McKinley, et al. 1986). Einzelne Mutationen können die Aggregationsbereitschaft des Prionproteins beeinflussen (Lehmann & Harris 1997; Liemann & Glockshuber 1999), und eine spontane Aggregation wird als möglicher Schlüssel in der Ätiologie hereditärer TSE diskutiert. Da beim Menschen eine Form der hereditären TSE mit der Mutation T183A (entspricht T182A der Maus-Aminosäuresequenz von PrP) beschrieben wurde (Nitrini, Rosemberg, et al. 1997), sollte im folgenden Versuch die Löslichkeit (Seite 80) der in N2a-Zellen exprimierten PrP^{sen}-Mutanten untersucht werden.

Zellysate wurden ultrazentrifugiert (70000UPM, 1h, 4°C), das Pellet und der Überstand anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und nach Westernblot mit mAk3F4 auf mutiertes PrP^{sen} untersucht. Wie man auf Abb. 17 sieht, konnte jede Erkennungssequenz-Mutante von PrP^{sen} sowohl in der Pellet-, als auch in der Überstandfraktion nachgewiesen werden. Einzig die Wildtypkontrolle (Wt3F4) war nicht in der Pelletfraktion detektierbar. Die hier gezeigten Mengen an Prionprotein im Überstand dürfen nicht quantitativ bewertet werden. In Wiederholungen zeigte sich, dass jede der PrP^{sen}-Mutanten in vergleichbaren Mengen im Überstand nachweisbar war. Die Ergebnisse von Lehmann und Harris (Lehmann & Harris 1997), die diesen Versuch mit Wt3F4-, T182A-, T198A- und T182A/T198A-PrP^{sen} durchgeführt hatten, konnten bestätigt werden. Demnach führt allein der Verlust der N-Glykosylierung zur erhöhten Aggregationsbereitschaft von PrP.

Zuckerketten besitzen eine polare Oberfläche und verstärken so die Löslichkeit von Molekülen (Helenius 1994; Fiedler & Simons 1995). So kann erklärt werden, dass es durch den Verlust der Zuckerseitenketten zu einer erhöhten Aggregationsbereitschaft

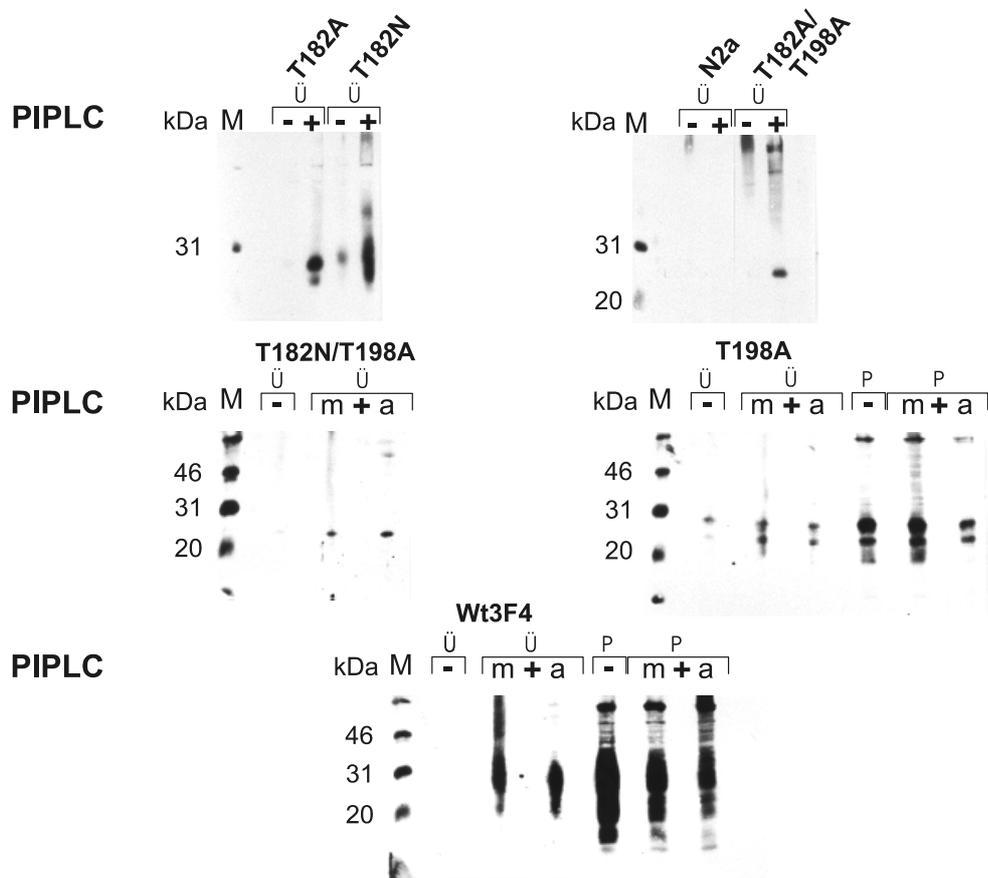


Abbildung 16: **Westernblot-Analyse verschiedener Erkennungssequenz-Mutanten exprimiert in subklonierten N2a-Zellen vor (-) und nach (+) PIPLC-Verdau**

Zellen wurden in Kultur mit dem Enzym PIPLC behandelt. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand (Ü) abgenommen, falls nichts anderes vermerkt mit Methanol (m) oder mit Azeton (a) gefällt und im 13%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Detektiert wurde mit mAk3F4.

Bei den Mutanten T182N, T188A, T182N/T188A und Wt3F4 kann auch ohne PIPLC-Behandlung Prionprotein im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Alle Mutanten außer T188A zeigen nach PIPLC-Verdau im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine deutliche Zunahme der Signalintensität von PrP.

Für Wt3F4 und T188A sind hier zusätzlich noch die dazugehörigen Zelllysate (P) ohne und nach PIPLC-Behandlung gezeigt. Da für Maus-PrP-T188A keine deutliche PrP-Abnahme in der Pelletfraktion zu erkennen war, ist diese PrP^{sen}-Mutante nicht mit PIPLC von der Zelloberfläche ablösbar.

M: ECL-Molekulargewichtsmarker

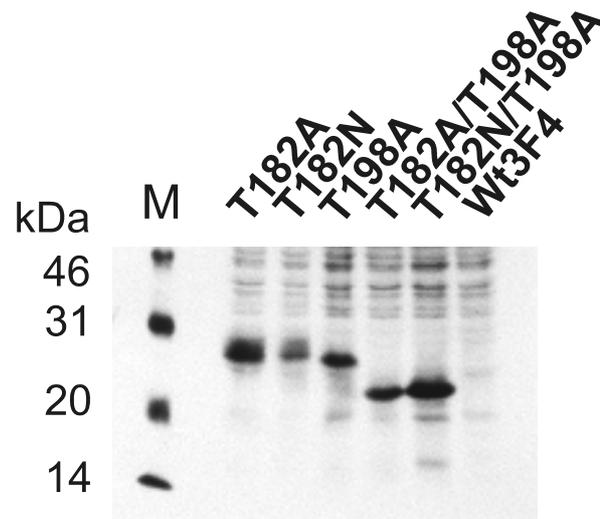
kam. In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, ob an der Aggregatbildung auch zelluläres Maus-Prionprotein beteiligt ist. Dazu wurde die Pelletfraktion mit mAkSaf70 entwickelt, der Maus-Prionprotein erkennt. Endogenes Maus-Prionprotein konnte unter diesen Versuchsbedingungen jedoch nicht nachgewiesen werden. Demnach aggregierten die Glykosylierungs-Mutanten mit sich selbst und interagierten nicht mit zellresidentem murinem PrP^{sen}.

4.1.4 Konversionsexperiment in permanent scrapie-infizierten ScN2a-Zellen

Nach der Charakterisierung von mutiertem PrP^{sen} sollte untersucht werden, ob diese Prionprotein-Mutanten in Zellkultur in die Proteinase K-resistente Isoform PrP^{res} konvertierbar sind. Bei diesen Versuchen wurde mutiertes Prnp in ScN2a-Zellen exprimiert. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um die Neuroblastomzelllinie N2a (Prnpa-Genotyp), die von zwei Arbeitsgruppen unabhängig mit dem Scrapiestamm Chandler infiziert wurde. Das ScN2a-Modellsystem für die Vermehrung von Scrapie-Erregern besitzt jedoch Nachteile. So führt die Infektion nicht zu einem zytopathischen Effekt, so dass der Infektionsstatus der Zellen über einen PrP^{res}-Nachweis oder über den Tierversuch geklärt werden muss. Im Weiteren sind nur 1-2% einer Zellpopulation PrP^{res}-positiv, so dass stets neu auf PrP^{res}-positive Einzelklone selektioniert werden musste. Zum anderen verlieren diese Zellen nach einigen Passagen auf noch ungeklärte Weise PrP^{res}. Da für eine erfolgreiche Konversion PrP^{res} aber in ausreichendem Maß vorhanden sein muss und diese subklonierten Zellen höchstens zu 80% PrP^{res}-positiv sind (eigene Beobachtungen aus zahlreichen Klonierungsversuchen), musste eine Methode gefunden werden, die eine Transfektionseffizienz von nahezu 100% erreicht. Im Labor wurde deshalb ein für ScN2a-Zellen etabliertes retrovirales Expressionssystem verwendet (Caughey, Raymond, et al. 1999; Vorberg 1999) (Abb. 18).

Dazu wurden die verschiedenen Konstrukte in das env-Gen des replikationsdefekten retroviralen Vektor pSFF kloniert. Dieses Plasmid basiert auf dem Provirus des Friend-spleen-focus-forming-virus, dessen Genom Mutationen und Deletionen im gag-, pol- und env-Bereich enthält (Bestwick, Kozak, et al. 1988; Robertson, Spangrude, et al. 1992). Eine Vermehrung dieses Provirus wäre demzufolge nur durch Helferviren möglich.

Pellet



Überstand

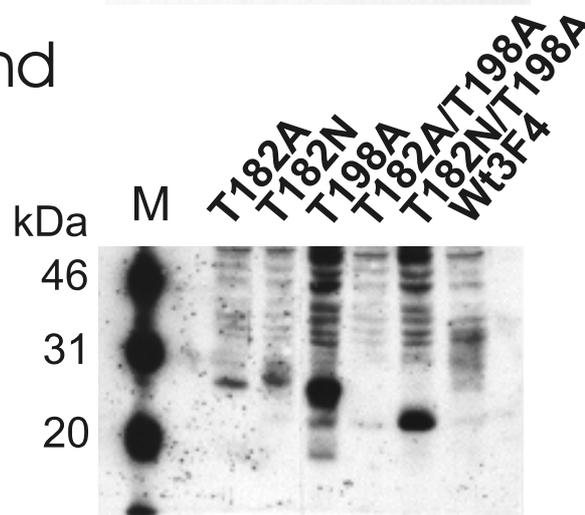


Abbildung 17: **Westernblotuntersuchung der Löslichkeit von Erkennungssequenz-mutiertem PrP^{sen} exprimiert in transduzierten N2a-Zellen**

Zellpellets wurden in detergenshaltigem Puffer aufgenommen und ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde in Probenpuffer aufgenommen. Die Überstandfraktionen wurden mit GuanidiniumHCl behandelt, anschließend mit Azeton gefällt und dann in Probenpuffer aufgenommen. Detektiert wurde mit mAk3F4.

Jede Erkennungssequenz-Mutante von PrP^{sen} konnte im Gegensatz zu Wt3F4 in der Pelletfraktion nachgewiesen werden und war demnach unter diesen Bedingungen unlöslich. Ein Teil der Moleküle war jedoch auch löslich, da diese auch in der Überstandfraktion detektiert werden konnten.

M: ECL-Molekulargewichtsmarker

Als „Helferviren“ fungierten in dem verwendeten System von Maus-Fibroblastenzellen (NIH3T3) abstammende Packzellen. Diese Zellen exprimieren stabil retrovirale M-MuLV-Gene (moloney murine leukemia virus) (Ψ 2) (Mann, Mulligan, et al. 1983) bzw. AM-MLV-Gene (PA317) (Miller & Buttimore 1986), denen jedoch das Verpackungssignal (Ψ) fehlt, das das Verpacken von RNA in virale Proteine ermöglicht. Vektor- und Zellgenom, zusammen in einer Zelle exprimiert, sind jetzt aber in der Lage für infektiöse Virionen zu kodieren. Diese Viren sind jedoch replikationsdefekt, da sie das Genom des Vektors pSFF enthalten und so auf die Bereitstellung von Strukturproteinen für ihre Vermehrung angewiesen sind. Es wurde mit zwei verschiedenen Packzelllinien gearbeitet: amphotrope (Vertebratenwirtsspektrum) Viren freisetzende PA317-Zellen wurden mit ekotropen (Wirtsspektrum: Ratte und Maus) Viren produzierenden Ψ 2-Zellen kokultiviert. Dies ermöglichte den Schutz der Zellen vor Superinfektion mit einem Retrovirus derselben Art zu umgehen und eine Art „Ping-Pong-Infektion“ (Kozak & Kabat 1990; Lynch & Miller 1991) zu erzeugen. Retroviren verlassen die Zelle durch „Budding“, infizieren dann die andere Zelllinie und werden so in hohem Maß in den Zellkulturüberstand abgegeben. Die Überstände wurden gesammelt und dann zur Transduktion von ScN2a-Zellen verwendet (Abb. 19). Zu einem theoretisch denkbaren Zelltod durch Überintegration des pSFF-Genoms kommt es nicht, da durch eine homologe Rekombination mit env-Genen der Packzellen sogenannte „shut-off-Viren“ gebildet werden, die die Ping-Pong-Infektion zum Erliegen bringen (Lynch & Miller 1991).

Herstellung der Plasmide, Produktion replikationsdefizienter Retroviren und Transduktion von ScN2a-Zellen

Herstellung der Plasmide Die Plasmide pcDNA3.1/Zeo(+)*mus3F4*, pcDNA3.1/Zeo(+)*mus3F4T182A*, pcDNA3.1/Zeo(+)*mus3F4T182N*, pcDNA3.1/Zeo(+)*mus3F4T198A*, pcDNA3.1/Zeo(+)*mus3F4T182A/T198A* und pcDNA3.1/Zeo(+)*mus3F4T182N/T198A* wurden mit den Enzymen *Bam*HI und *Xho*I geschnitten und über diese Schnittstellen in den Vektor pSFF ligiert (Abb. 18). Die Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

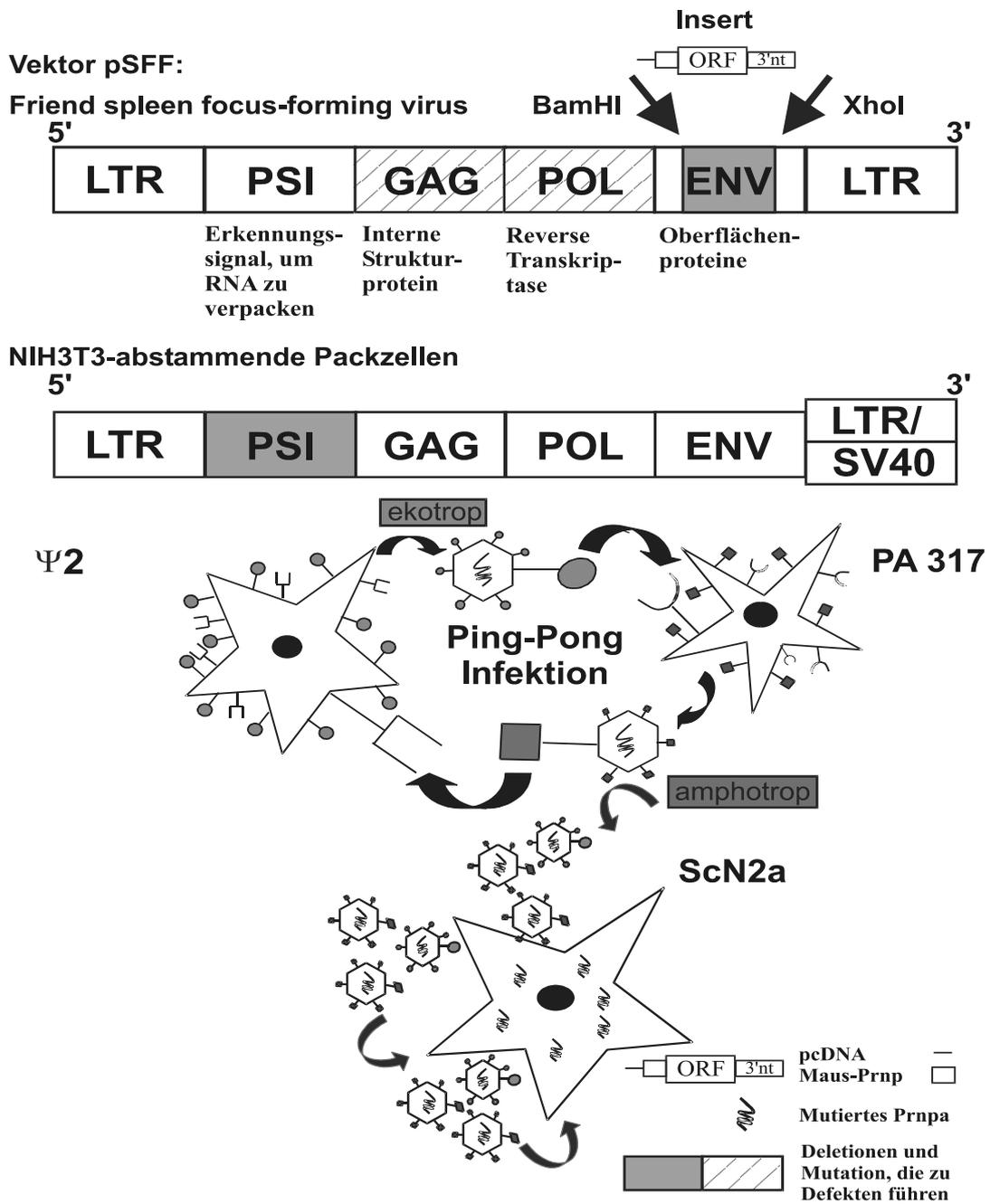


Abbildung 18: Herstellung von Retroviruspartikeln, die das PrP-Gen enthalten

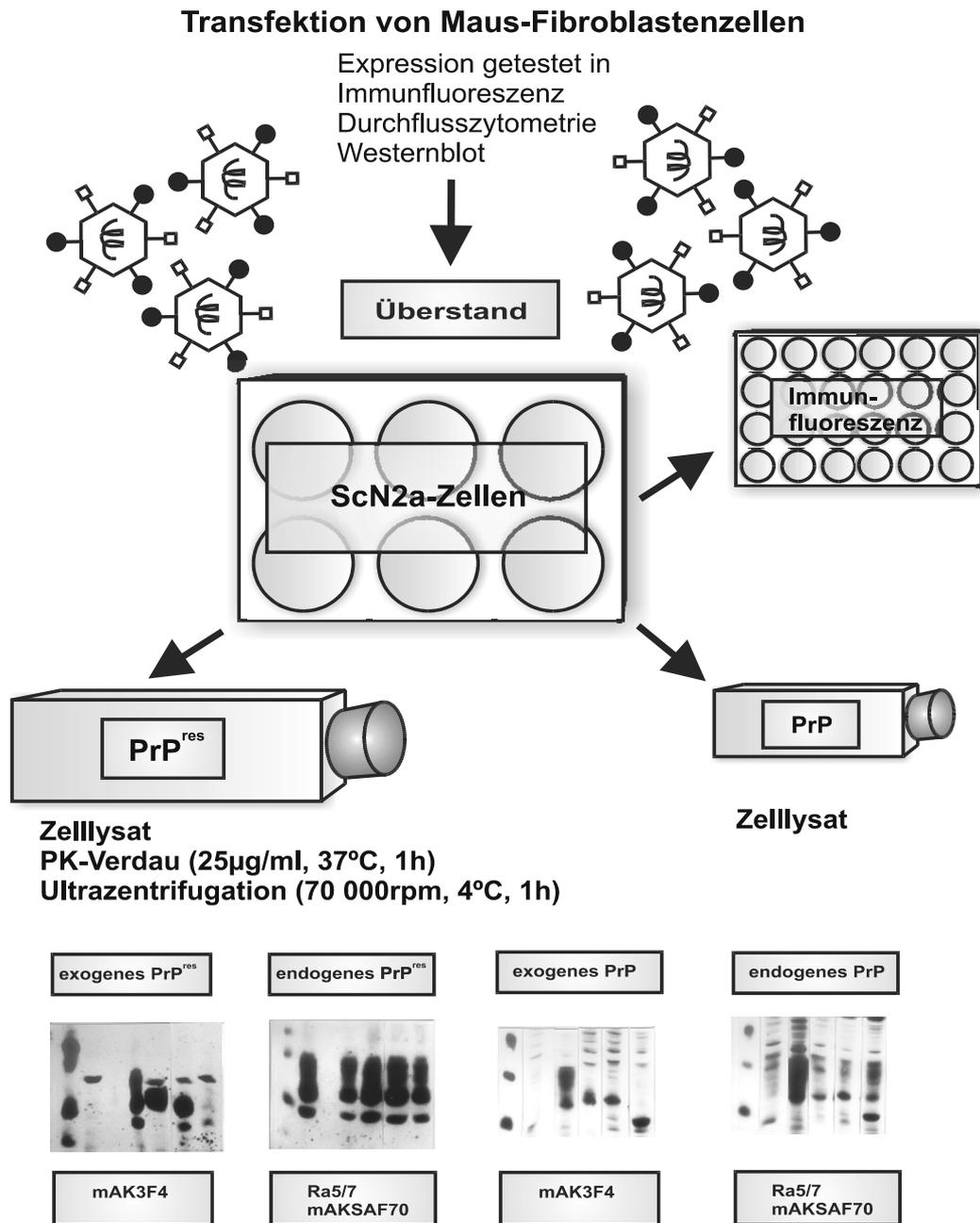


Abbildung 19: Durchführung der Konversionsexperimente in ScN2a-Zellen als schematische Darstellung

Produktion replikationsdefizienter Retroviren Die Packzelllinien PA317 und $\Psi 2$ wurden im Verhältnis 1:1 kokultiviert und mittels Kalziumphosphat (Seite 75) mit den entsprechenden pSFF-Konstrukten transfiziert. Die Transfektionseffizienz betrug 20%. Konfluente Zellrasen wurden regelmäßig im Verhältnis 1:5 umgesetzt. Die Expression auf Proteinebene der mutierten Prionprotein-Gene wurde in Durchflusszytometrie, Western-blot und Immunfluoreszenz untersucht. Sobald, in der Regel nach zwei Wochen, etwa 70-80% der Zellen mutiertes Prionprotein bildeten, wurde der Zellkulturüberstand geerntet. Bei diesem Versuch wurde nicht mit Lipofectamine sondern mit Kalziumphosphat gearbeitet, um einen Einbau von Lipofectamine in die Zellmembran und damit in Retroviruspartikel zu umgehen. Es war nicht auszuschließen, dass Lipofectamine-Reste sich in ScN2a-Zellen störend auswirken könnten (Teufel 2000).

Transduktion von ScN2a-Zellen $3 \cdot 10^5$ ScN2a-Zellen wurden ausgesät und am folgenden Tag pro Konstrukt entweder mit je einer Verdünnung von 1:1 oder mit je einer Reihe aus unverdünntem, 1:1, 1:4, 1:8 und 1:16 verdünntem virushaltigem Überstand transduziert (Abb. 19). Die Zellen wurden über Nacht kultiviert und dann auf eine T75er-, T25er-Flasche und 24-well Platte ausgesät. Die Anzahl transduzierter Zellen wurde in der Immunfluoreszenz unter Verwendung des mAk3F4 bestimmt und lag bei jeder Verdünnungsstufe bei nahezu 100%. Allerdings nahm die Fluoreszenzintensität und demnach die Anzahl des integrierten Retrovirusgenoms pro Zelle mit aufsteigender Verdünnung ab. Die Zellen wurden etwa eine Woche bis zur Konfluenz kultiviert und Zellysate dann auf PrP^{sen} und PrP^{res} untersucht (Seite 76). Zur Detektion von Prionprotein wurde mit den Antikörpern mAk3F4, mAkSAF70 und polyklonalem Ra5/7-Antiserum gearbeitet (Abb. 19). Während mAk3F4 nur mutiertes, d.h. also exogen zugegebenes Prionprotein detektiert, erkennen mAkSAF70 und Ra5/7 Gesamt-PrP, d.h. sowohl endogen in ScN2a-Zellen vorhandenes Maus-PrP als auch exogen eingeführtes, mutiertes PrP.

Proteinexpression von PrP in ScN2a-Zellen 1/10tel des Zellysats einer T25er-Flasche wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit mAk3F4 bzw. mit Ra5/7 inkubiert und mit dem ECL-System entwickelt. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte ScN2a-Zellen

mitgeführt, da Vorversuche keinen Unterschied zwischen mock- und nicht-transduzierten ScN2a-Zellen zeigten. Wie man nach Verwendung von mAk3F4 sieht (Abb. 20 unten links), wurde jede Prionprotein-Mutante (T182A, T182N, T198A, T182A/T198A, T182N/T198A) wie Wt3F4 in ScN2a-Zellen stark exprimiert. Auch in ScN2a-Zellen war zu beobachten, dass exogenes Prionprotein, dem die erste Glykosylierungsstelle fehlt, eine breitere monoglykosylierte Bande zeigte als Prionprotein, dem die zweite Glykosylierungsstelle fehlt. Und auch hier war die unglykosylierte Bande bei Mutante T182A im Gegensatz zu den anderen beiden monoglykosylierten Mutanten nicht detektierbar. Demnach war in ScN2a-Zellen die zweite N-Glykosylierung heterogener als die erste, und die unglykosylierte Form wurde bei der Prionprotein-Mutante T182A nur in nicht detektierbaren Proteinmengen exprimiert. Wurden Verdünnungen von Überstand, welcher rekombinante Viren enthielt, zur Transduktion verwendet, so nahm die Menge an exogenem PrP entsprechend der Verdünnung ab. Durch Verwendung des polyklonalen Ra5/7-Antiserums (Abb. 20 unten rechts) wurde ersichtlich, dass die Expression von endogenem PrP durch die exogenen PrP-Mutanten nicht herunterreguliert wurde: In zahlreichen Experimenten zeigte sich, dass im Vergleich zu ScN2a-Kontrollzellen bei allen anderen Lysaten mehr oder zumindest gleich viel Gesamt-PrP zu detektieren war.

Konversion zur Proteinase K (PK)-resistenten Isoform PrP^{res} Zelllysate einer T75er-Flasche wurde mit 25 µg/ml Proteinase K für 1h bei 37°C verdaut und anschließend ultrazentrifugiert. 1/4tel des Zelllysats einer Flasche wurde pro Spur im 16% SDS-PAGE getrennt und anschließend geblottet. Wie man auf Abb. 20 oben links sieht, wurde jede PrP-Mutante in ihre Proteinase K-resistente Isoform konvertiert, Maus-PrP-Mutante T182N/T198A jedoch nur in kaum detektierbaren Mengen. Demnach scheint für eine Konversion keine starke Präsenz von exogenem Prionprotein auf der Zelloberfläche notwendig zu sein. Auch hier zeigte sich, dass die in der ersten Glykosylierungsstelle mutierten Prionproteine eine höhermolekulare und heterogenere Bande zeigten als die andere monoglykosylierte Mutante T198A. Ferner war bei PrP^{res}-T182A die unglykosylierte Form nicht detektierbar. Abb. 20 oben rechts zeigt, dass die Mutanten T182A, T182N, T198A, T182A/T198A und Wt3F4 keinen Einfluss auf Gesamt-PrP^{res} in der Zelle haben. Dagegen führte die Expression der Mutante T182N/T198A in ScN2a-Zellen

jedoch zu einer deutlichen Abnahme an Gesamt-PrP^{res}. Da das Signal im Vergleich zur untransduzierten Kontrolle deutlich schwächer war, konnte geschlossen werden, dass es zu einer Abnahme von endogenem PrP^{res} kam.

Um diesen Effekt der Mutante T182N/T198A genauer zu untersuchen, wurden ScN2a-Zellen mit Virusüberstand in unterschiedlichen Verdünnungsstufen transduziert. Wie man auf Abb. 21 sieht, wurde die Prionprotein-Mutante T182N/T198A nur nach Transduktion mit stark verdünntem Virusüberstand umgefaltet. Erst ab einer 1:4 Verdünnung des virushaltigen Überstandes wurde die PK-resistente Isoform PrP^{res} als Schatten auf dem original Röntgenfilm detektierbar. Darüberhinaus sah man, dass die Depression von endogenem PrP^{res} im direkten Zusammenhang mit der Konvertierbarkeit des Konstruktes stand: die Detektierbarkeit von endogenem PrP^{res} nahm in niedrigen Verdünnungen (ab 1:4) wieder zu. Dieser Effekt auf endogenes und exogenes PrP^{res} wurde in der Literatur (Holscher, Delius, et al. 1998; Zulianello, Kaneko, et al. 2000; Priola, Caughey, et al. 1994; Kaneko, Zulianello, et al. 1997; Priola & Chesebro 1995; Priola 1999) für verschiedene PrP-Mutanten, unter anderem auch für Wt3F4 beschrieben und als (trans)-dominant-negative Hemmung bezeichnet. Als Kontrolle wurden auch alle anderen Konstrukte mit verschiedenen Verdünnungen an virushaltigem Überstand behandelt. Jedoch konnte für diese kein derartig starker Hemmeffekt bei diesem Versuch in stark PrP^{res}-positiven ScN2a-Zellen beobachtet werden. Die in der Literatur für Wt3F4 beschriebene dominant-negative Hemmung wurde nur beobachtet, wenn die Versuche mit schwächer PrP^{res}-positiven ScN2a-Zellen durchgeführt wurden. Die monoglykosylierten Mutanten (T182A, T182N, T198A) verhielten sich dann wie Wt3F4, während unter diesen Bedingungen eine Konversion der unglykosylierten Prionprotein-Mutanten (T182A/T198A; T182N/T198A) nicht mehr detektiert werden konnte. Der verdünnungsabhängige Hemmeffekt auf endogenes PrP^{res} blieb jedoch immer noch ersichtlich. Die monoglykosylierten PrP-Mutanten verhielten sich unter diesen Bedingungen wie Wt3F4.

Als Ursache für die reduzierte Akkumulation von endogenem PrP^{res} konnte eine verminderte PrP-Expression ausgeschlossen werden, da exogenes PrP nicht zur verminderten Expression von endogenem PrP führte (Abb. 20 unten links).

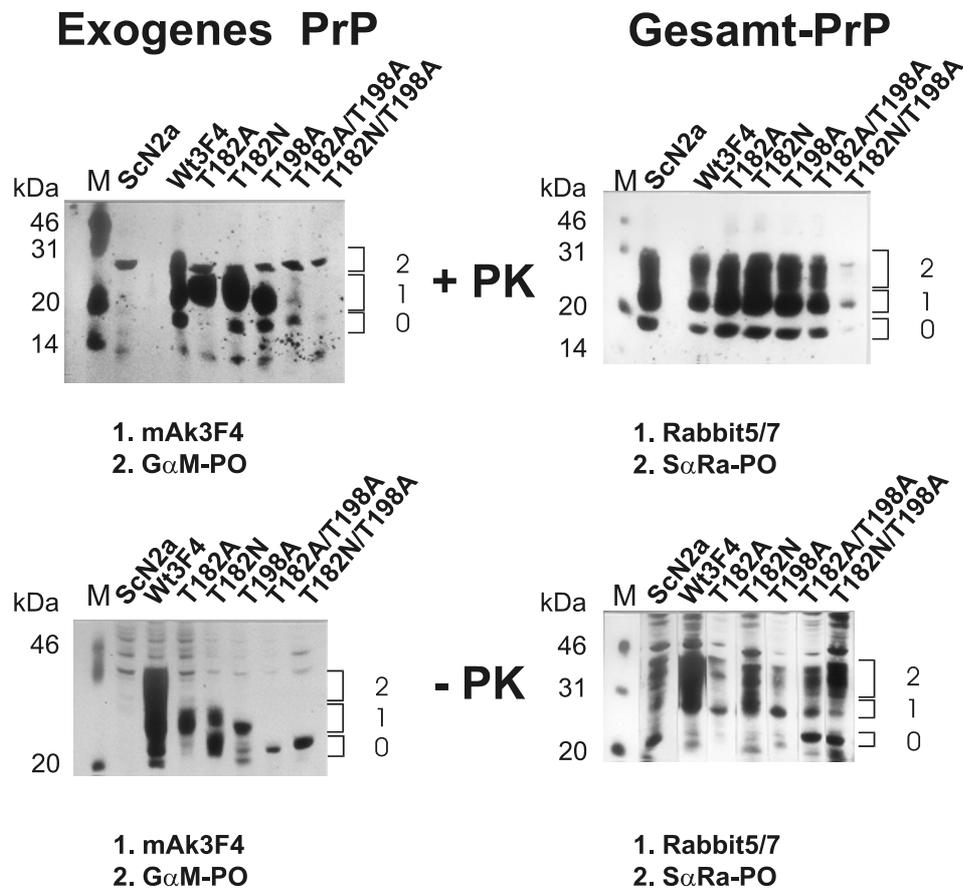


Abbildung 20: Konversionsexperiment in ScN2a-Zellen

Zelllysate transduzierter ScN2a-Zellen wurden entweder direkt im SDS-PAGE aufgetrennt (-PK) oder zum Nachweis von PrP^{res} mit Proteinase K (25 μ g/ml, 37°C, 1h) verdaut und ultrazentrifugiert (+PK). Für den Nachweis von exogenem PrP wurden die Blotmembranen mit mAk3F4 entwickelt. Gesamt-PrP wurde mittels polyklonalem Ra5/7-Antiserum nachgewiesen. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte ScN2a-Zellen mitgeführt.

Jede PrP^{sen}-Mutante wird exprimiert (**Bild unten links**), während die Synthese von endogenem PrP^{sen} nicht abnimmt (**Bild unten rechts**).

Jede PrP-Mutante wird konvertiert, wenn auch T182N/T198A in nur kaum detektierbaren Mengen (**Bild oben links**). Der Gesamtgehalt an PrP^{res} bleibt durch Wt3F4 und die Mutanten T182A, T182N, T198A und T182A/T198A weitgehend unbeeinflusst, während T182N/T198A zu einer deutlichen Abnahme von endogenem PrP^{res} führt (**Bild oben rechts**).

Die verschiedenen Glykoformen von PrP (di- (2), mono- (1) und unglykosyliert (0)) sind am rechten Bildrand gekennzeichnet. Alle Abbildungen entstammen demselben Experiment.

M: ECL-Molekulargewichtsmarker

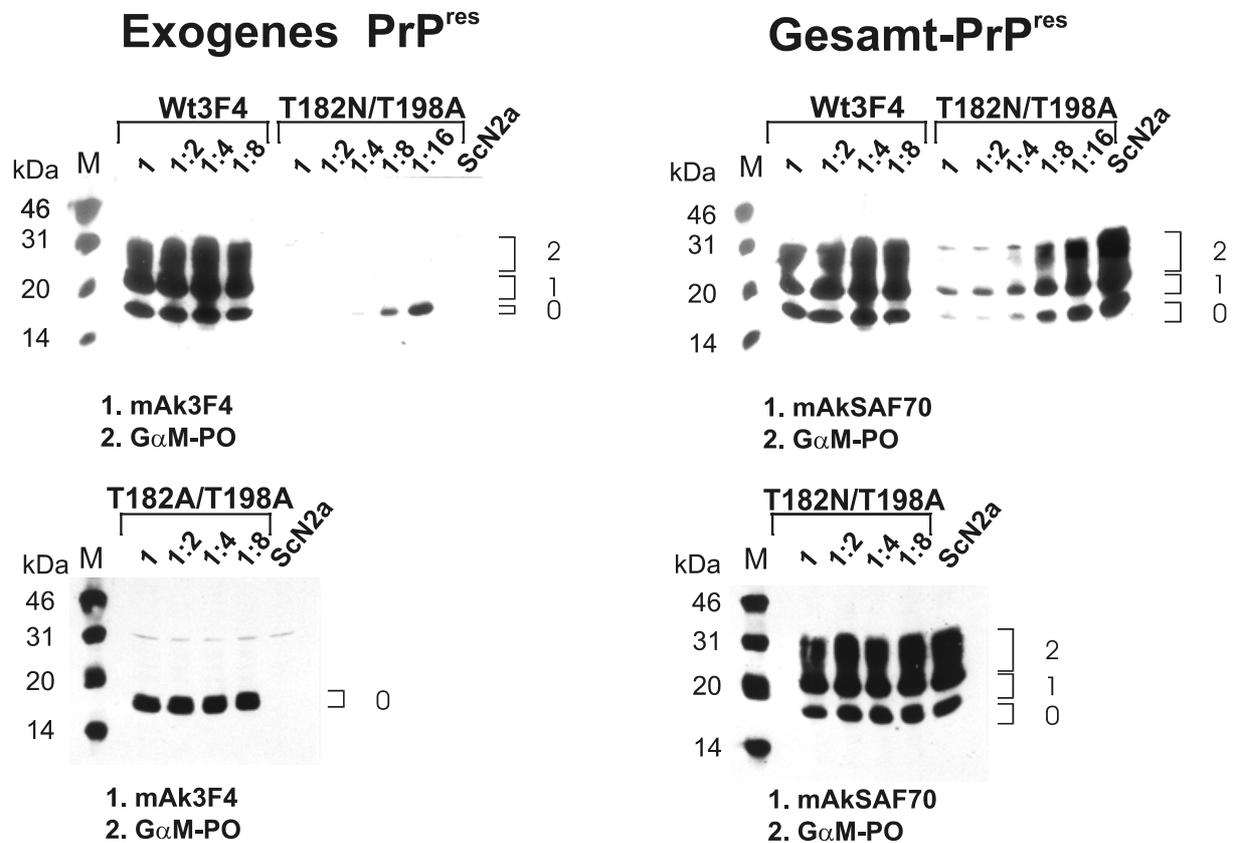


Abbildung 21: Untersuchung der dominant-negativen Hemmung der Mutante T182N/T198A

ScN2a-Zellen wurden mit virushaltigem Überstand in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (Unverdünnt (1) bis 1:16) transduziert. Für Wt3F4 und die Mutante T182A/T198A sind weder für exogenes noch für endogenes PrP^{res} Unterschiede zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen festzustellen. Bei Maus-PrP-T182N/T198A ist indes erst ab einer Verdünnungsstufe von 1:4 exogenes PrP^{res} schwach zu detektieren. Mit Zunahme der Konvertierbarkeit von exogenem PrP nimmt dann auch der inhibitorische Effekt auf endogenes PrP^{res} ab.

Alle Abbildungen entstammen demselben Experiment und wurden gleichzeitig entwickelt und belichtet. Die verschiedenen Glykoformen von PrP (di- (2), mono- (1) und unglykosyliert (0)) sind am rechten Bildrand gekennzeichnet.

M: ECL-Molekulargewichtsmarker

Untersuchung der Proteinase K-Resistenz von rekombinantem PrP^{sen} Um abzuschließen, dass es sich bei dem entstandenen PrP^{res} um ein Produkt der Konversion handelt und nicht um eine mutationsbedingte intrinsische Resistenz der rekombinanten Proteine, wurden Zellysate unter Standardbedingungen (25 µg/ml, 1h, 37°C) verdaut und im Westernblot mit mAk3F4 nachgewiesen. Nach dem Verdau war kein PrP mehr detektierbar (Abb. 22, Spur a). Demnach konnte eine intrinsische PK-Resistenz ausgeschlossen werden. Es handelte sich also um eine echte Konversion.

Da Lehmann und Harris (Lehmann & Harris 1997) eine im Gegensatz zu Wt3F4 stehende partielle PK-Resistenz (3,3 µg/ml, 10 Minuten, 37°C) für PrP^{sen}-T182A, -T198A und -T182A/T198A beschrieben hatten, wurden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten Prionprotein-Glykosylierungsmutanten, die aus N2a-, CHO-Zellen und Maus-Fibroblastenzellen stammten, unter ähnlich milden Bedingungen proteolytisch behandelt: Proteinase K 3,3 µg/ml, 10 Minuten 37°C, 1 µg/ml, 30 Minuten 37°C und 0,5 µg/ml, 30 Minuten, 37°C. Nach dieser Behandlung blieb PrP^{sen} zwar z.T. unverdaut; ein Shift in den molekularen Größenbereich von PrP^{res}, der bei der in der Literatur beschriebenen intrinsischen Resistenz zu erwarten gewesen wäre, konnte jedoch nicht festgestellt werden. Demnach konnte in keiner Zelllinie eine partielle PK-Resistenz der Prionprotein-Mutanten bestätigt werden; es wurde lediglich ein unvollständiger Verdau von PrP^{sen} beobachtet, der in Abhängigkeit zur eingesetzten PrP-Menge stand (Abb. 22).

4.1.5 Nachweis von Disulfidbrücken

Um den Hemmeffekt der Prionprotein-Mutante T182N/T198A auf die Konversion genauer zu untersuchen, wurden die Mutanten auf Anwesenheit der Disulfidbrücke untersucht. Aus der Literatur (Muramoto, Scott, et al. 1996; Herrmann & Caughey 1998; Yanai, Meiner, et al. 1999) war bekannt, dass die Abwesenheit der Disulfidbrücke von PrP^{sen} die Konversion behindert und dass die eingeführten Mutationen T182N und T198A in der Nähe der beiden an der S-S-Brücke beteiligten Cysteinreste (AS178, AS 213) liegen. Der Nachweis von Schwefelbrücken (S. 83) beruht auf der Tatsache, dass Proteine mit Disulfidbrücke ein anderes Laufverhalten im SDS-PAGE zeigen als Proteine mit Sulfhydrylgruppe. Unter oxidativen Bedingungen liegen Schwefelreste in Disulfidform vor, während unter reduktiven Bedingungen die Disulfidbrücken aufgebrochen werden, indem Schwefelreste

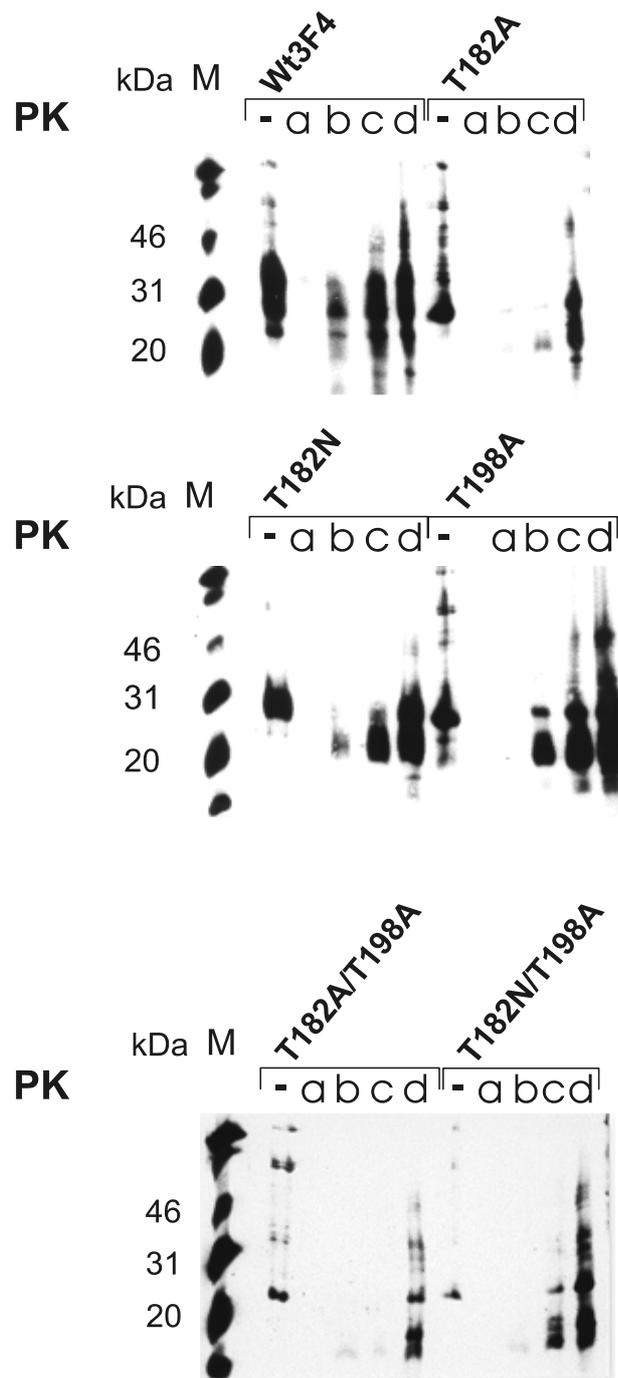


Abbildung 22: **Proteinase K-Verdau von rekombinantem PrP^{sen} exprimiert in transduzierten Maus-Fibroblasten**

Zelllysate wurden unter unterschiedlichen Bedingungen mit Proteinase K bei 37°C verdaut: unverdaute Probe (-), 25 μg/ml, 1h, (a); 3,3 μg/ml, 10Min. (b); 1 μg/ml, 30Min. (c); 0,5 μg/ml, 30Min. (d). Ein Shift in den molekularen Größenbereich von PrP^{res} konnte für keine PrP^{res} Mutante festgestellt werden. Die Blots wurden mit mAk3F4 entwickelt.

M: ECL-Molekulargewichtsmarker

zu Sulfhydrylgruppen reduziert werden. Als Reduktionsmittel wurde DTT eingesetzt. In N2a-Zellen und Maus-Fibroblastenzellen war für jede Prionprotein-Mutante ein unterschiedliches Laufverhalten zwischen reduzierter und nativer Probe festzustellen. Demnach ist die Disulfidbrücke in jedem der mutierten PrP^{sen}-Proteine wie bei Wt3F4 anwesend und eine fehlende Disulfidbrücke nicht die Ursache der schlechten Konvertierbarkeit der PrP^{sen}-Mutante T182N/T198A (Abb. 23).

Auffallend ist hier, dass die auf Seite 108 beschriebene, nur in Maus-Fibroblasten zu beobachtende Zusatzbande der PrP^{sen}-Mutante T182N/T198A vor allem in der Nativprobe zu detektieren war.

4.1.6 Infektion von transduzierten N2a-Zellen mit verschiedenen Scrapiestämmen

Nachdem die Konversionsexperimente in ScN2a-Zellen gezeigt hatten, dass sich jede der ausgewählten Prionprotein-Mutanten bei Anwesenheit von PrP^{res} in ihre Proteinase K-resistente Isoform umfalten lässt, sollte anschließend eine In-Vivo-Infektion simuliert werden. Bei einer Infektion mit Scrapie muss das infektiöse Agens zunächst in die Zelle eindringen und liegt nicht schon wie bei ScN2a-Zellen in der Zelle vor. Damit sollte die Frage beantwortet werden, ob eine starke Zelloberflächenexpression des zu konvertierenden PrP^{sen} notwendig ist, um bei einer Infektion von „außen“ zu PrP^{res} umgefaltet zu werden. Im weiteren sollte untersucht werden, ob verschiedene Scrapiestämme eventuell nur einzelne Glykosylierungsmutanten umfalten. Es sollte mit Zellen gearbeitet werden, die möglichst der ScN2a-Zelllinie entsprechen. Deshalb wurden ScN2A-Zellen auf PrP^{res}-negative Zellen hin mehrfach selektiert und anschließend mit für die PrP^{sen}-Mutanten Wt3F4, T182A, T182N, T198A, T182A/T198A und T182N/T198A kodierendem Virusgenom transduziert. Diese transduzierten, PrP^{res}-negativen Zellen wurden am folgenden Tag auf T75er-Flaschen ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 80% mit Hirnhomogenat final an Scrapie erkrankter Mäuse überschichtet (Seite 90). Nach vier Tagen Inkubation wurden die Zellen geerntet, lysiert, mit Proteinase K (25µg/ml, 1h, 37°C) verdaut und ultrazentrifugiert. Ein Viertel des Lysates wurde jeweils pro Spur im 16%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen entweder mit mAk3F4 zum Nachweis von konvertiertem mutiertem Prionprotein oder mit Ra5/7-Antiserum

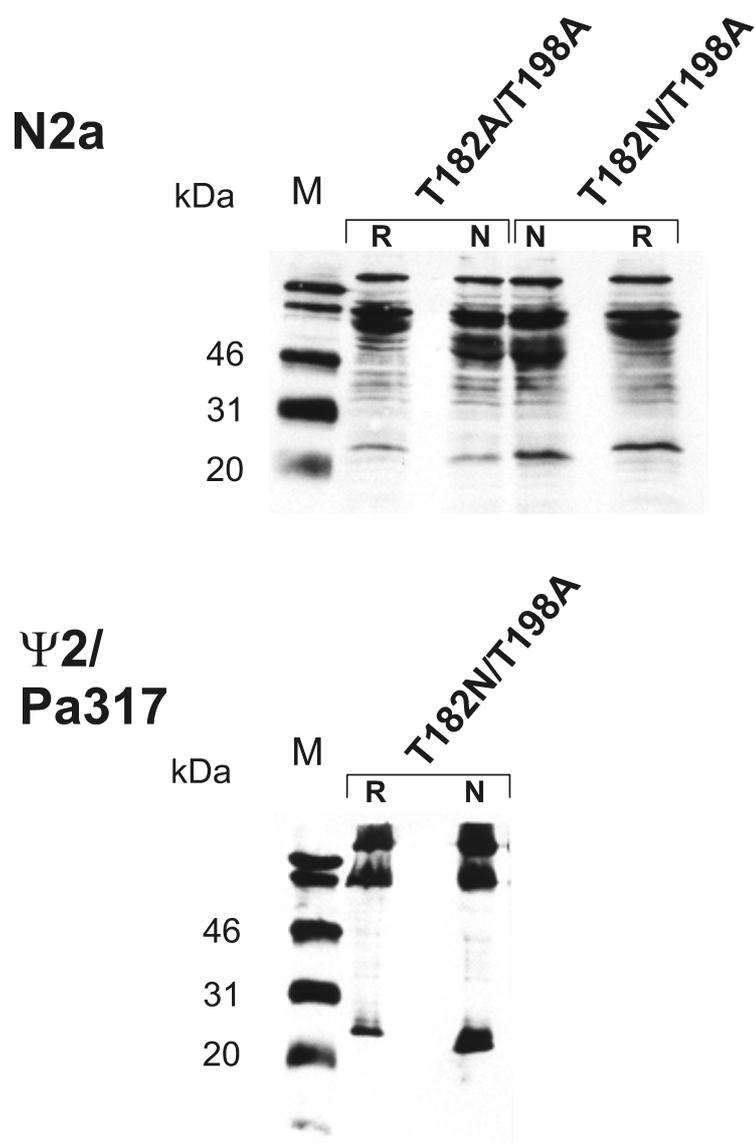


Abbildung 23: Disulfidbrückennachweis am Beispiel der unglykosylierten PrP-Mutanten

Zelllysate transduzierter N2a-Zellen (**oben**), bzw. transfizierter Maus-Fibroblastenzellen (**unten**) wurden zum einen im reduzierten (R), zum anderen im nativen (N) Zustand im 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Blots wurden mit mAk3F4 entwickelt. Die Nativproben zeigen im Vergleich zu den reduzierten Proben einen Shift von etwa 2kDa in den niedermolekularen Bereich. Daraus kann auf das Vorhandensein der Schwefelbrücken geschlossen werden. Die ca. 26kDa-Zusatzbande der PrP-Mutante T182N/T198A, die nur bei Expression in Maus-Fibroblastenzellen beobachtet werden kann, zeigt sich vor allem im nativen Zustand der Probe (**unten**).

Der Ursprung der hochmolekularen Zusatzbanden (**oben**) wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeklärt.

M: ECL-Molekulargewichtsmarker

zum Nachweis von Gesamt-Prionprotein entwickelt. Als Kontrolle für die Proteinexpression der Mutanten auf Proteinebene wurden transduzierte Zellen mitgeführt, die nicht infiziert wurden. Es zeigte sich, dass jedes rekombinante Protein in etwa denselben Mengen exprimiert wurde. Infiziert wurden die Zellen jeweils im Doppelansatz. Es wurde mit Hirnhomogenat der Scrapiestämme Chandler, Me7 und 79A gearbeitet. Als Kontrolle wurden Zellen mitgeführt, die mit Hirnhomogenat einer nicht-infizierten C57BL-Maus überschichtet wurden. Nur die Prionprotein-Mutanten T182N, T198A, T182N/T198A und Wt3F4 exprimierenden Zellen ließen sich mit dem Scrapiestamm Me7 infizieren (Abb. 24). Die Stämme Chandler und 79A führten nach Überschichtung der Zellen weder zu einer Konversion der Prionprotein-Glykosylierungsmutanten noch zur Konversion von Wt3F4, obwohl sie in etwa dieselben Mengen an PrP^{res} enthielten (Abb. 24: obere Zeile).

Dieser Versuch zeigte, dass für eine Zellinfektion eine ausreichende Menge an zu konvertierendem Prionprotein auf der Zelloberfläche anwesend sein muss, da die nur schwach auf der Zelloberfläche anwesenden Prionprotein-Mutanten T182A und T182A/T198A auf diese Art nicht in detektierbaren Mengen konvertierbar waren.

Im weiteren zeigte sich, dass die Scrapiestämme Chandler und 79A nicht zu einer Konversion von Wildtyp3F4-Prionprotein führten.

Um auszuschließen, dass die nachgewiesene PK-resistente Isoform in der Zelle und nicht im Zellüberstand entstanden war, wurde in einem weiteren Experiment versucht exogenes PrP^{res} im Zellüberstand und Zellpellet getrennt nachzuweisen. Exogenes PrP^{res} konnte nur im Zellpellet nachgewiesen werden und lag demnach in der Zelle vor.

4.1.7 Vorhersage der Proteinstruktur

Nach der Charakterisierung der verschiedenen Erkennungssequenz-Mutanten in Zellkultur stellte sich die Frage, ob sich deren unterschiedliches Verhalten durch eine veränderte Proteinstruktur erklären lässt. Dazu wurden jeweils die verschiedenen Mutationen in die Maus-Prionproteinsequenz (aa121-221) eingeführt, und die Struktur wurde rechnerisch vorhergesagt (Abb. 25). Keine der Mutationen führt zu einer Veränderung der Sekundärstruktur. Die Anordnung der α -Helizes und β -Faltblattstrukturen blieb gleich. Bei einer detaillierteren Betrachtung fiel jedoch auf, dass unterschiedlich Wasserstoff-

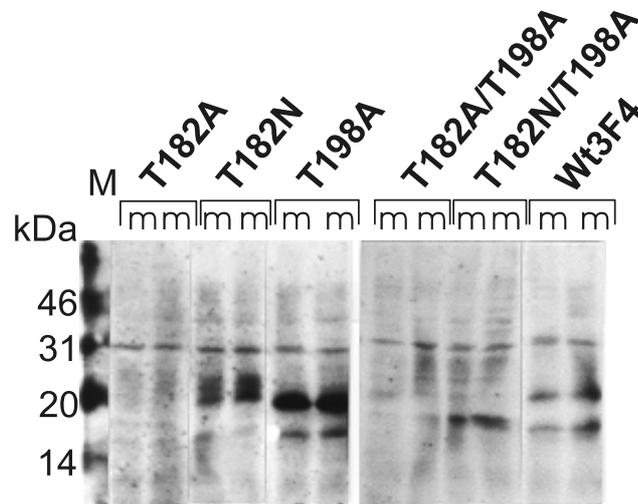
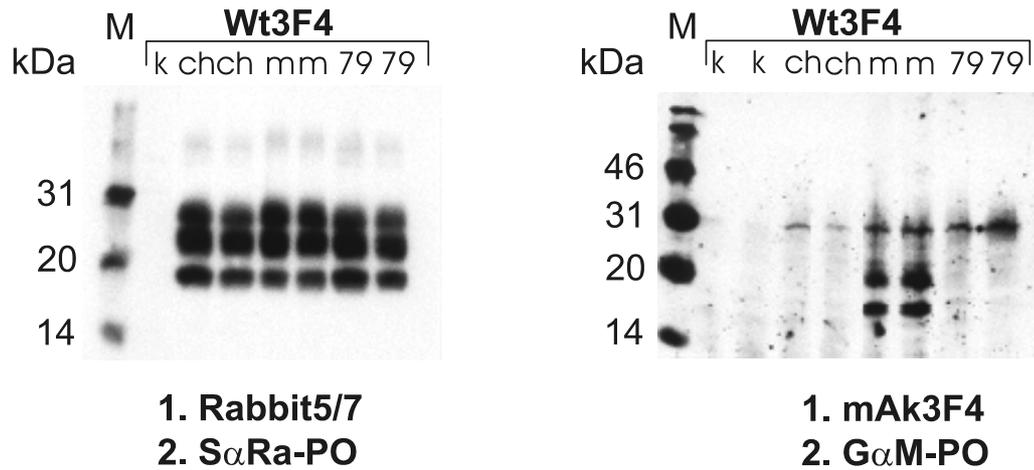


Abbildung 24: **Infektion transduzierter N2a-Zellen mit verschiedenen Scrapiestämmen**

N2a-Zellen wurden transduziert und anschließend mit 10%igem Gehirnhomogenat einer gesunden C57BL-Maus (k) und terminal an Scrapiestamm Chandler (ch), Me7 (m) und 79A (79) erkrankter Mäuse überschichtet. Die Zellysate wurden anschließend mit Proteinase K (25 μ g, 37°C, 1h) verdaut und ultrazentrifugiert. Ein Viertel einer T75er-Flasche wurde anschließend im 16%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Infektion der Zellen mit dem Scrapiestamm Me7 wurden die PrP-Mutanten T182N, T198A, T182N/T198A und Wt3F4 in ihre Proteinase K resistente Isoform umgefaltet (**unten**). Die Stämme Chandler und 79A führen nicht zur Konversion der verschiedenen Konstrukte, wie hier am Beispiel der Wt3F4-Mutante gezeigt ist (**oben rechts**). Die Zellen wurden mit denselben Mengen an PrP^{res} überschichtet (**oben links**).

M: ECL-Molekulargewichtsmarker

brücken ausgebildet wurden (Tab. 4).

Threonin an Aminosäureposition 182, Bestandteil der ersten Erkennungssequenz für N-Glykosylierung bildet zwei Wasserstoffbrücken aus: einmal zu Tyrosin aa161 und zu Cystein aa178. Der Austausch der Aminosäure Threonin gegen Alanin an Kodon 182 hatte zur Folge, dass keine Wasserstoffbrücke mehr zu Tyrosin 161 gebildet werden konnte. Wurde jedoch Asparagin an Kodon 182 eingeführt, blieben die Bindungen zu Tyrosin aa161 und Cystein aa178 bestehen. Demnach scheint der Verlust der Bindung zwischen Tyrosin aa161 und Kodon 182 zu einer verminderten Stabilität von Maus-PrP^{sen} zu führen. Nach den Swissprot-Vorhersagen bilden neben Threonin, Serin und Asparagin auch die Aminosäuren Cystein, Arginin, Asparaginsäure, Histidin und Methionin Wasserstoffbrücken zu Tyrosin aa161 aus. Dass diese Mutationen nicht zu stabilem PrP führten, kann damit erklärt werden, dass zum einen die Aminosäuren ein unterschiedlich chemisches Verhalten aufweisen (Methionin, Histidin, Arginin, Asparaginsäure), bzw. die Wasserstoffbrückenbindung über ein Schwefelatom (Cystein) vermittelt wird, das ein stärkeres Dipolmoment ausbildet als ein Kohlenstoffatom. Im übrigen enthält Cystein nur ein Kohlenstoffatom in seiner Seitenkette, während Threonin und Asparagin zwei Kohlenstoffatome besitzen.

Die zweite Glykosylierungsstelle wurde offenbar durch den Verlust von zwei Wasserstoffbrücken nicht destabilisiert. Während Threonin an Kodon 198 fünf Wasserstoffbrücken ausbildete (vier zu Asparagin aa201 und eine zu Valin aa203), war Alanin an Kodon 198 nur über zwei Wasserstoffbrücken mit Asparagin und über eine mit Valin verbunden.

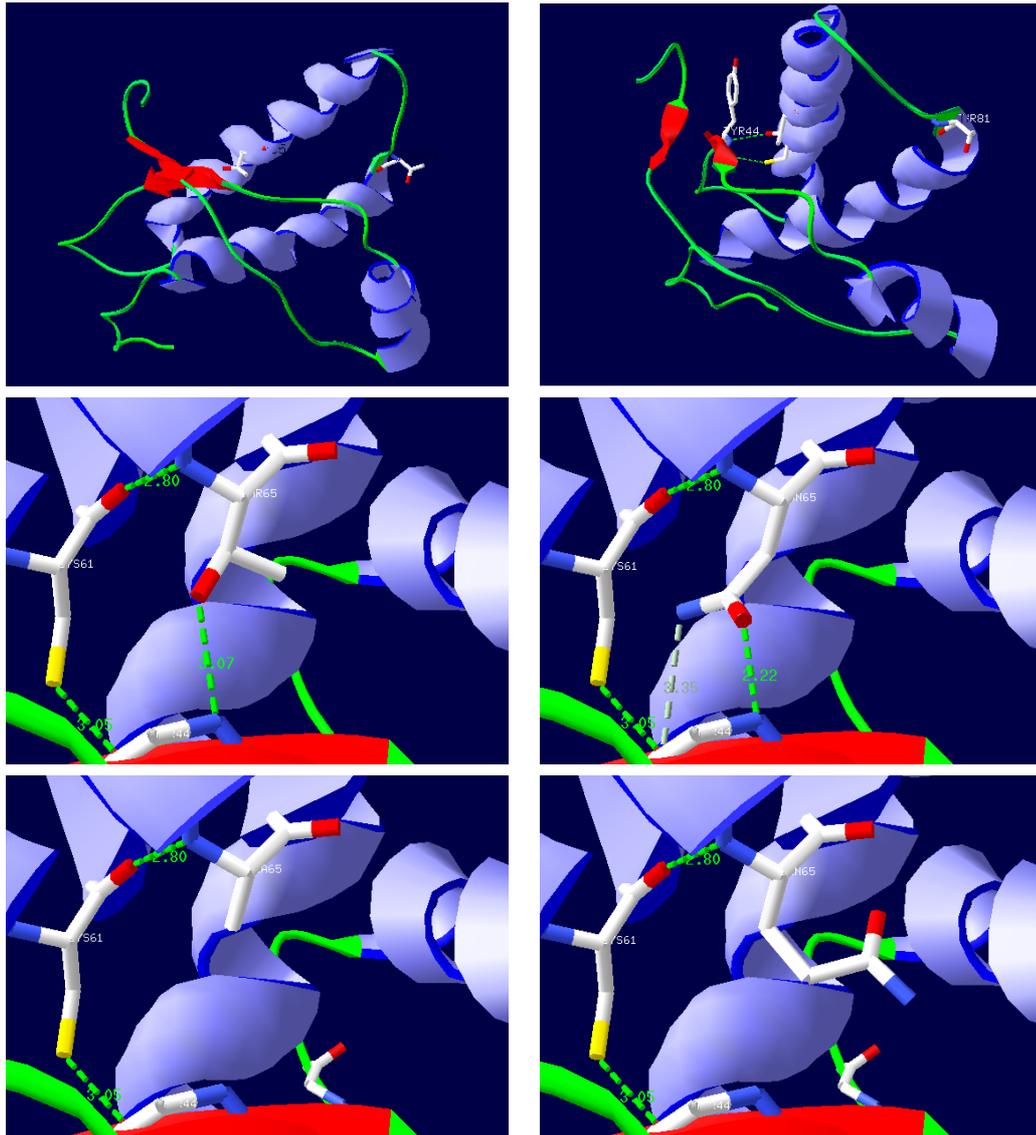


Abbildung 25: **Swiss-Prot-Vorhersagen für Erkennungssequenz-mutiertes Maus-PrP.**

aa 121-221. Loop-Strukturen sind grün dargestellt, β -Faltblattstrukturen (β 1: aa127-130; β 2: aa160-163) in rot und α -Helices (α 1: aa143-153; α 2: aa174-192; α 3: aa199-218) in blau.

Erste Zeile links: Wildtyp-PrP; zu sehen sind die Aminosäuren Threonin aa182 bzw. aa198. **Erste Zeile rechts:** Wildtyp-PrP; zu sehen sind die Aminosäuren Threonin aa182 bzw. aa198 und zusätzlich die Bindungspartner Tyrosin aa161 und Cystein aa178.

Zweite Zeile links: Ausschnittvergrößerung der zwei Wasserstoffbrücken von Threonin an Kodon 182 zu Tyrosin aa161 und Cystein aa178 (die Seitenkette von Tyrosin ist zur besseren Übersicht nicht dargestellt). **Zweite Zeile rechts:** Mutante Maus-PrP-T182N: insgesamt werden drei Wasserstoffbrücken ausgebildet.

Dritte Zeile links: Mutante Maus-PrP-T182A: es wird keine Wasserstoffbrücke zu Tyrosin aa161 ausgebildet.

Dritte Zeile rechts: Mutante Maus-PrP-T182Q: es wird keine Wasserstoffbrücke zu Tyrosin aa161 ausgebildet.

AA an Kodon 182	Bindung zu			Sonstiges
	Tyrosin aa161 in β -Faltblatt2	Cystein aa178 in Helix2	Tyrosin aa161- Cystein aa178- Bindung	
Thr	1× 3.07Å	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Polar, neutral
Ser	1× 3.07Å	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Polar, neutral
Asn	2× 2.22Å und 3.35Å	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Polar, neutral
Ala	0×	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Apolar, neutral
Gln	0×	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Polar, neutral
Cys	1× 2.76Å über Schwefelatom	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Polar, neutral
Arg	2× 2.7Å und 3.08Å	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Sterische Behinderung des Schwefelatoms von Cystein aa178 Polar, basisch, hy- drophil
Asp	1× 3.02Å	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Polar, sauer, hy- drophil
His	1× 3.28Å	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Sterische Hinderung
Met	2× 2.71Å und 2.61Å über Schwefelatom	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Apolar, hydrophob
Glu	0×	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Polar, sauer, hy- drophil
Gly	0×	0×	1× 3.05Å	Apolar, neutral
Ile	0×	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Apolar, hydrophob
Leu	0×	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Apolar, hydrophob
Lys	0×	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Polar, basisch, hy- drophil
Phe	0×	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Apolar, hydrophob
Pro	0×	Sterische Hin- derung	1× 3.05Å	Apolar, hydrophob
Trp	0×	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Apolar, neutral
Tyr	0×	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Polar, neutral
Val	0×	1× 2.8Å	1× 3.05Å	Apolar, hydrophob

Tabelle 4: Einfluss der Aminosäure an Kodon 182 auf intramolekulare Wasserstoffbrücken nach Swissprot

4.1.8 Tabellarische Zusammenfassung

		Wt3F4	T182A	T182N	T198A	T182A/ T198A	T182N/ T198A
N2a-Zellen (subkloniert)	Durchfluss- zytometrie	++	+	++	++	-	+
	Oberflächen- biotinylierung	++	+	++	++	+	+(+)
	Endo H- Resistenz	totale	geringe	hohe	totale	n.d.	n.d.
	Ablösbarkeit mit PIPLC	+	+	+	-	+	+
CHO-Zellen (subkloniert)	Durchfluss- zytometrie	++	+	++	++	-	+
	Oberflächen- biotinylierung	+	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.
	Endo H- Resistenz	totale	geringe	hohe	totale	n.d.	n.d.
Ψ2/PA317	Durchfluss- zytometrie	++	+	++	++	(+)	+
	Oberflächen- biotinylierung	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+
	Endo H- Resistenz	totale	geringe	hohe	totale	n.d.	n.d.
N2a Konversion in perma- nent Chandler infizierten ScN2a-Zellen		+	+	+	+	+	+
Konversion nach Infektion der Zellen mit Scrapies- tamm Me7		+	-	+	+	-	+

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Zellkulturarbeiten

4.2 Ergebnisse aus dem transgenen Tiermodell

Nach der Charakterisierung der Erkennungssequenz-mutierten Maus-Prionproteine in Zellkultur wurden mit den PrP^{sen}-Mutanten T182N, T198A und T182N/T198A transgene Mäuse hergestellt. Diese Prionprotein-Mutanten waren auf der Zelloberfläche nachweisbar, nach einer Infektion der Zellkultur umfaltbar und versprachen deshalb eine Infizierbarkeit im Gegensatz zu den bis dato von DeArmond et al. generierten Erkennungssequenz-Mutanten T182A und T182A/T198A. Darüber hinaus sollten im Gegensatz zu DeArmond et al. (DeArmond, Sanchez, et al. 1997) diese Mäuse auf der Basis einer Transgen-Kassette bestehend aus Maus- und nicht Hamster-PrP-Genom hergestellt werden, da es mehr maus- als hamsteradaptierte Scrapiestämme gibt und so eine breitere Erforschung von Stammeigenschaften ermöglicht werden sollte.

Wildtyp-Maus-PrP 3F4 getaggte Kontrollmäuse wurden aus Tierschutzgründen nicht hergestellt, da bereits andere Arbeitsgruppen über solche Mäuse verfügen. Sofern nichts anderes erwähnt, wurde die Charakterisierung der Mäuse an für das Transgen heterozygoten Tieren durchgeführt.

4.2.1 Herstellung der Plasmide

Zur Herstellung der transgenen Tiere wurden die Konstrukte in den Vektor phgPrP (half-genomic PrP; halbgenomisches PrP; Eigenname der Arbeitsgruppe C. Weissmann) kloniert, der von der Arbeitsgruppe C. Weissmann zur Verfügung gestellt wurde. Dieses 15kb Konstrukt basiert auf dem murinen Priongen und enthält nahezu alle Elemente des Maus-Prnpa Gens mit Ausnahme des Intron 2, welches je nach Mausstamm 6-12kb umfasst (Abb. 26).

PhgPrP enthält außer dem Intron 2 alle Anteile des Maus-PrP-Gens. Untersuchungen der Arbeitsgruppe Weissmann (Fischer, Rulicke, et al. 1996) zeigten, dass das Intron 2 im Gegensatz zum Intron 1 nicht für die Expression von PrP in transgenen Mäusen notwendig ist. Unter der Verwendung dieses Vektors wurden in der Arbeitsgruppe Weissmann transgene Mäuse generiert, die das murine PrP etwa zehnfach überexprimieren (tg20-Mäuse). Diese Mäuse zeigten keine neurologischen Symptome und erkrankten nach experimenteller Infektion mit mausadaptierten Scrapie-Erregern (Stamm Chandler) nach einer Inkuba-

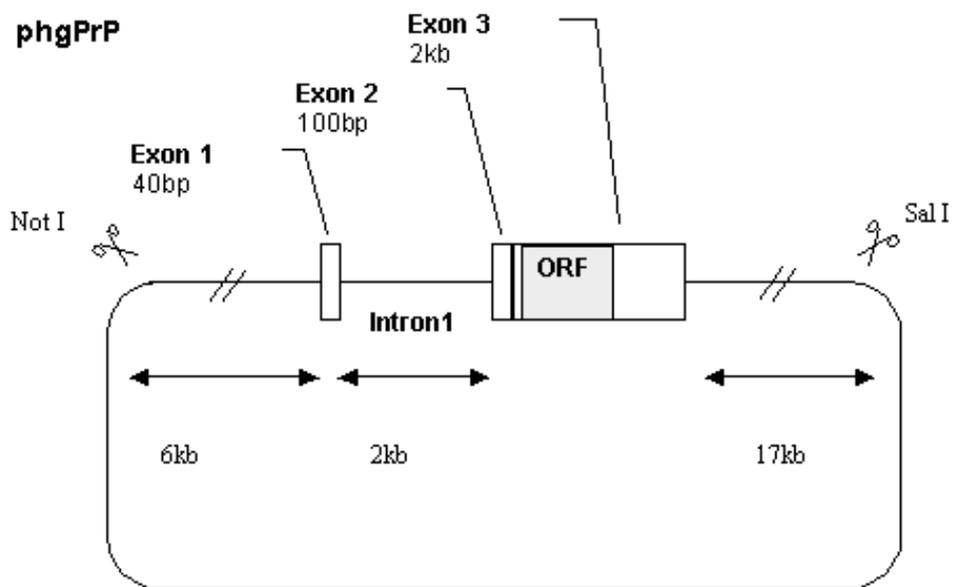
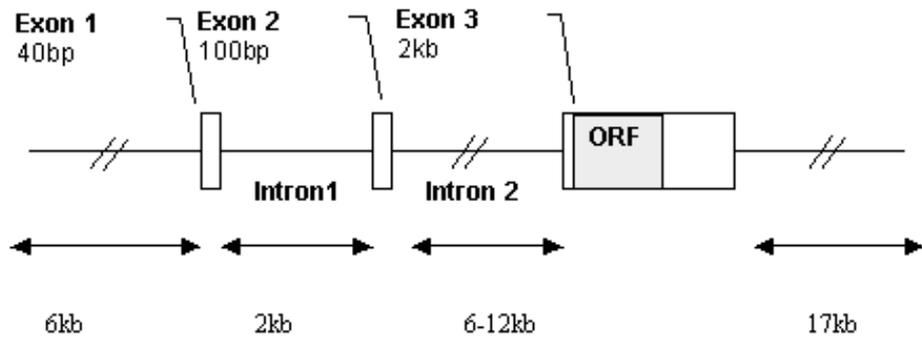


Abbildung 26: Schematische Darstellung des Wildtyp PrP-Gens und des Vektors phgPrP im Vergleich:

PhgPrP enthält außer dem Intron 2 alle Anteile des Maus-Prnp.

tionszeit von etwa 68 Tagen. Sie exprimieren jedoch im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen keine Prnp-mRNA in den Purkinjezellen. Daraus schlossen Fischer et al., dass mindestens ein Kontrollelement für die Expression in Purkinjezellen im Intron 2 liegen muss.

Für die Klonierung wurden die Konstrukte pcDNA3.1/Zeo(+)*mus3F4T182N*, pcDNA3.1/Zeo(+)*mus3F4T198A*, pcDNA3.1/Zeo(+)*mus3F4T182N/T198A* und der Vektor phgPrP mit den Enzymen *XmaI* und *NarI* geschnitten und die Maus-Prnp-Mutanten anschließend in den Vektor phgPrP ligiert (Abb. 27). Die entstandenen Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung auf Ihre Richtigkeit hin überprüft.

4.2.2 Überprüfung der Plasmide in Zellkultur

Um die Expressionsfähigkeit dieser Plasmide zu überprüfen, die den Maus-ORF jetzt unter die Kontrolle des Prionprotein-Promotors stellen, wurden N2a-Zellen mit Lipofectamine transfiziert (Seite 74). Da dem Vektor phgPrP ein Resistenzgen zur Selektion in eukaryontischen Zellen fehlt, wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 mit dem „leeren“ Plasmid pcDNA3.1/Zeo(+) kotransfiziert. Die Transfektion wurde mit 10 μ g phgPrP-Mutante und 1 μ g pcDNA3.1/Zeo(+) und in einem anderen Ansatz mit 6 μ g phgPrP-Mutante und 0,6 μ g pcDNA3.1/Zeo(+) mit je 15 μ l Lipofectamine durchgeführt. Anschließend wurden stabile Zellpopulationen mittels Zeocin selektiert und im Westernblot auf Prnp-Expression getestet. Exemplarisch wurden Zellen, die das Konstrukt phgPrPT182N exprimierten, auf Einzelzelllinien kloniert und zusätzlich in der Durchflusszytometrie untersucht.

Beide Transfektionsansätze führten zur detektierbaren Prnp-Expression auf Proteinebene: jede der drei halbgenomischen PrP^{sen}-Mutanten wurde in N2a-Zellen exprimiert. Demnach ist der Prionprotein-Promotor geeignet, um PrP^{sen} in N2a-Zellen zu exprimieren.

Die Untersuchung des Konstrukts phgPrPT182N in der Durchflusszytometrie zeigte, dass diese Prionprotein-Mutante stark auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Abb. 28). Da diese Untersuchung die bisherigen Ergebnisse aus der Zellkultur bestätigte, wurden keine weitergehenden Untersuchungen zu den Konstrukten mehr durchgeführt.

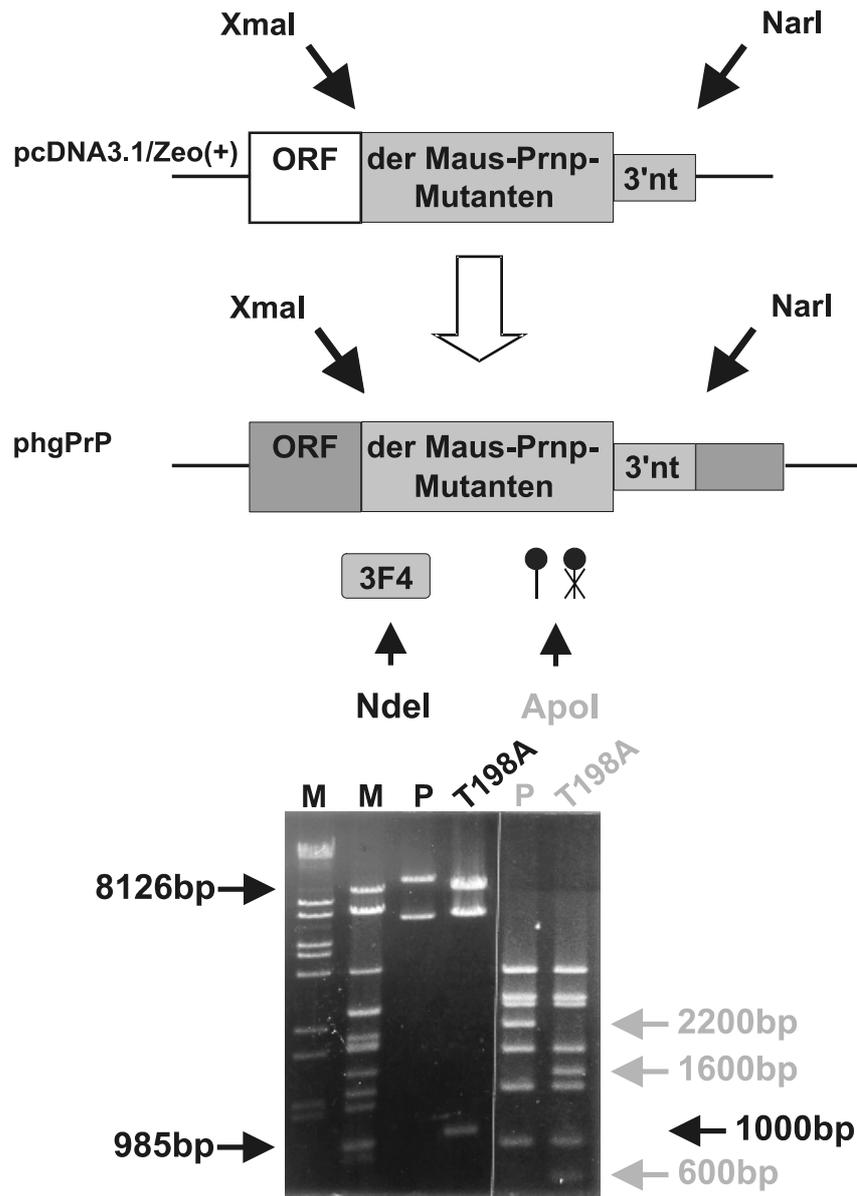


Abbildung 27: **Klonierung der Maus-PrP-Glykosylierungsmutanten in den Vektor phgPrP**

Die verschiedenen Maus-Prnp-Mutanten wurden über die *XmaI* und *NarI* Schnittstellen in den Vektor phgPrP kloniert. Jedes Konstrukt wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung auf seine Richtigkeit überprüft. Als Kontrolle wurde das Plasmid phgPrP mitgeführt (P).

Durch die Mutation zur Einführung des 3F4-Epitops entstand eine zusätzliche Schnittstelle für das Enzym *NdeI*, was hier am Beispiel für phgPrPT198A gezeigt ist (Vergleich der Spuren 3 und 4). Der Verlust der zweiten Erkennungssequenz für Glykosylierung ist mit einer zusätzlichen *ApoI*-Schnittstelle assoziiert (Vergleich der Spuren 5 und 6).

Spur 1: M: Längenmarker λ -DNA/Eco47III/ECO91I

Spur 2: M: Standardlängenmarker λ -DNA/Eco47I (*AvaII*)

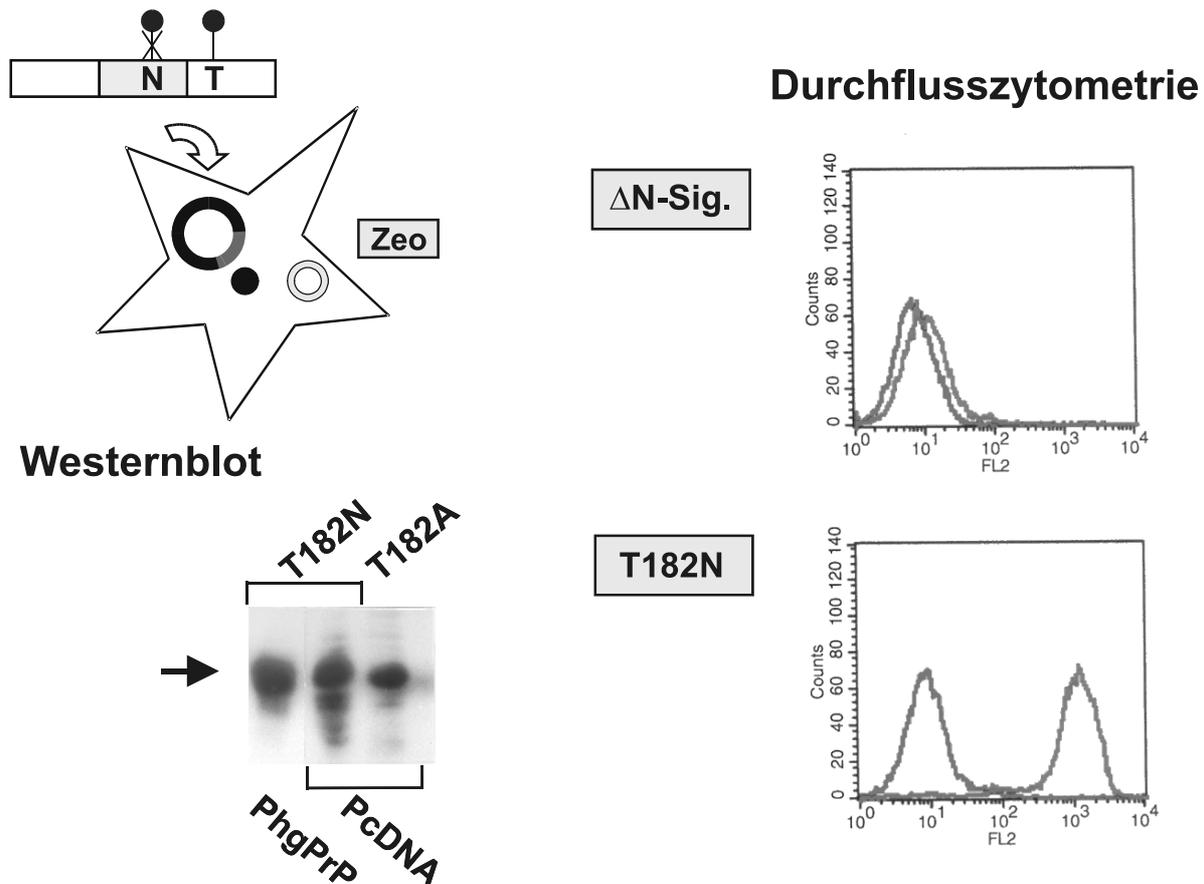


Abbildung 28: **phgPrP mit der Mutante T182N exprimiert in subklonierten N2a-Zellen**

N2a-Zellen wurden mit dem Vektor phgPrPT182N und dem Plasmid pcDNA3.1/Zeo(+) kotransfiziert. Die Zellen wurden mittels Westernblot und Durchflusszytometrie-Analyse untersucht.

Westernblot-Analyse: als Kontrolle wurden Subklone von N2a-Zellen aufgetragen, die den mutierten Maus-ORF unter der Kontrolle eines CMV-Promotors exprimieren (pcDNA).

Durchflusszytometrie-Analyse: Zellen wurden mit Erstantikörper mAk3F4 und dem Zweitantikörper PE inkubiert (dicke Linie). Als Kontrolle wurden Zellen nur mit dem Zweitantikörper PE inkubiert (dünne Linie).

Histogramm-Darstellung: Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen, auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Oberflächenexpression ist durch einen deutlichen Shift erkennbar. Als Kontrolle wurden hier N2a-Zellen mitgeführt, die N-Signalsequenz-deletiertes (Δ N-Sig.) Prionprotein exprimieren. Die Mutante phgPrPT182N wurde im Gegensatz zu Δ N-Signal-PrP auf der Zelloberfläche exprimiert und ist monoglykosyliert (Pfeil). Demnach ist der Prionprotein-Promotor geeignet, um PrP^{scn} in Zellkultur zu exprimieren.

	T182N	T198A	T182N/T198A	Gesamt
Gesamtzahl an mikroinjizierten Embryonen, die in Ammentiere transferiert wurden	487 Embryonen 17 Ammen	315 Embryonen 15 Ammen	465 Embryonen 19 Ammen	1267 Embryonen 51 Ammen
Nachkommen	102	70	74	246
Nachkommen pro transferierte Embryonen in Prozent	20,9%	22,2%	15,9%	19,4%

Tabelle 6: Nachkommen aus der Mikroinjektion

4.2.3 Generierung, Nachweis, Vitalität und Zucht transgener Mäuse (Mikroinjektion, Vitalität und Vermehrung der Foundertiere)

Mikroinjektion Anschließend wurden die Plasmide mit den Enzymen *NotI* und *Sall* verdaut, um den Bluescript-backbone zu entfernen, und die DNA gereinigt. Die Mikroinjektion wurde von Dr. Reifenberg an der Universität Ulm durchgeführt (Seite 88). An insgesamt elf Mikroinjektionsterminen wurde die DNA unter SPF (spezifisch pathogenfrei)-Bedingungen in Embryonen von PrP[%]-Mäusen injiziert. Bei der Präparation der Embryonen erwies sich die Methode der Eileiterspülung für PrP[%]-Mäuse als ungeeignet. Deshalb wurden die Embryos durch Rupturieren des Eileiters gewonnen. Nach der Mikroinjektion wurden die Embryonen dann unmittelbar in NMRI-Ammenmäuse transferiert. Die Ammentiere aus SPF-Haltung wurden dann in der zweiten Trächtigswoche zur weiteren Betreuung nach Tübingen gebracht, wo sie unter Quarantänebedingungen gehalten wurden. Die Tiere wurden zweimal täglich kontrolliert, die Nachkommen nach vier Wochen abgesetzt und in die Kleintierzucht überführt.

Insgesamt wurden 1267 mikroinjizierte Embryonen in Ammentiere transplantiert. Von diesen überlebten 246 die Manipulation. Damit lag die Gesamterfolgsrate bei 19,4% und demnach innerhalb des zwischen 5-24% angesiedelten Normbereichs (Waller & Murphy 1995). Für die im Vergleich zu den monoglykosylierten Konstrukten deutlich geringere Erfolgsrate bei der unglykosylierten Mutante wurde kein direkter kausaler Zusammenhang beobachtet.

PCR zum Nachweis des murinen Prnp Im Alter von fünf Wochen wurden die Tiere mittels PCR auf das Vorhandensein der Transgen-DNA untersucht. Da die Mikroinjektion in Embryonen von PrP⁰-Mäusen erfolgte, genügte für alle Konstrukte der Nachweis des murinen PrP-Gens zum Auffinden transgener Tiere (Abb. 29). Dazu wurden zunächst Schwanzspitzen-Biopsien genommen und die Tiere durch Kürzen des Fells nach einheitlichem Kennzeichnungsschema markiert. Die Biopate wurden über Nacht lysiert (Seite 58) und 1,5 μ l dieser Lösung direkt in die PCR-Reaktion eingesetzt. Bei dieser Standard-PCR (Seite 65) nach Bueler (Bueler, Aguzzi, et al. 1993) wurden drei Primer eingesetzt: ein 3'-Primer (3'nc), welcher sowohl im Prnp⁰- als auch im murinen Gen bindet, und zwei 5'-Primer, die jeweils spezifisch für den murinen ORF (P10) oder das Neomycin-Resistenzgen der PrP⁰-Mäuse (P3) sind (Abb. 29). Nach der Auftrennung der PCR-Produkte konnten zwei Hauptbanden detektiert werden: ein 350bp großes PrP⁰- und ein 550bp großes Maus-Prnp-spezifisches Fragment. Zusätzlich war bei einer Schleifenzahl über 25 ein drittes etwa 800bp großes Fragment nachzuweisen. Eine Ansequenzierung ergab, dass dieses PCR-Produkt das Maus-PrP-spezifische Fragment enthält. Demnach ist es wahrscheinlich, dass es sich bei diesem 800bp großen PCR-Produkt um heterologe DNA handelt, die durch die Zusammenlagerung von Prnp⁰-Fragment und Maus-Fragment und anschließender Amplifikation entstanden war.

Der Vorteil dieser PCR mit drei Primern lag in der internen Kontrolle jeder PCR-Reaktion. Da jede der zu untersuchenden Mäuse auf Prnp⁰-Hintergrund basierte, sprach der Nachweis des 350bp großen Produktes für die gelungene Durchführung der einzelnen PCR-Reaktion. Ferner ist diese PCR aufgrund des konkurrierenden 3'-Primers semikompetitiv und konnte deshalb später auch zur Unterscheidung heterozygoter und homozygoter Trägartiere verwendet werden. Mittels dieser PCR wurden folgende Founderzahlen ermittelt:

Die Gesamterfolgsrate der Mikroinjektion mit anschließendem Embryotransfer lag bei 31,3%. Da bei Mikroinjektionen mit Erfolgsraten zwischen 20-40% zu rechnen ist, liegt dieser Wert innerhalb der Norm. Die relativ geringe Erfolgsrate für die Mikroinjektion mit dem Konstrukt T182N lag daran, dass die DNA nach der Aufreinigung aus unbekanntem Gründen eine zäh-klebrige Eigenschaft aufwies und dies zu einem verminderten Mikroin-

	T182N	T198A	T182N/T198A	Gesamt
Nachkommen	102	70	74	246
Anzahl der PCR-positiven Foundertiere	28	24	25	77
Founder pro Nachkommen in Prozent als Erfolgsrate der Mikroinjektion	27.5%	34.3%	33.8%	31.3%

Tabelle 7: Founderzahlen pro Nachkommen zur Ermittlung der Mikroinjektionserfolgsrate. Der Injektionserfolg an diesem Termin führte. Die DNA wurde anschließend erneut aufgereinigt. Diese Probleme traten dann nicht mehr auf. Die Richtigkeit der DNA-Konstrukte der transgenen Mäuse wurde durch Sequenzierung der PCR-Stücke überprüft.

Zucht der Mäuse

Zucht auf einzelne Mauslinien Die 77 Foundertiere wurden dann mit PrP⁰-Mäusen verpaart. Bezüglich der Zuchtfähigkeit ergaben sich folgende Ergebnisse:

	T182N	T198A	T182N/T198A	Gesamt
Anzahl der Zuchtpaare	28	24	25	77
davon Zuchtpaare ohne Nachkommen	2	2	3	7
davon Zuchtpaare ohne positive Nachkommen	4	1	5	10

Tabelle 8: Übersicht über Zuchtpaare und deren Zuchtverhalten

Von 77 Zuchtpaaren vermehrten sich sieben nicht weiter. Entweder starben die Foundertiere kurz nach dem Ansetzen stressbedingt, oder es gingen keine Nachkommen aus der Verpaarung hervor. Insgesamt zehn Zuchtpaare hatten in jeweils drei aufeinanderfolgenden untersuchten Würfen keine positiven Nachkommen. Deshalb könnte es sich bei diesen Mäusen um Mosaiktierchen gehandelt haben. Bei diesen erfolgte der Einbau der DNA nicht

Mauslinie	V	VIII	XXI	XXVIII
Vererbungsrate	25%	50%	25%	75%

Tabelle 9: Vererbungsraten von ausgesuchten Linien des Konstrukts T182N

im Einzellstadium, sondern zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt, so dass die Maus die DNA nicht in allen Körperzellen trägt. So konnte die Transgen-DNA zwar im Schwanzspitzen-Bioptat nachgewiesen werden, obwohl sie nicht in die Zellen der Keimbahn eingebaut war. Bei der Untersuchung der Vererbungsraten für die einzelnen Paare wurden Werte zwischen 25-75% ermittelt. Als Beispiel sind hier Vererbungsraten von vier Mauslinien des Konstrukts T182N aufgeführt (Tab. 9). Ob der relativ schlechte Züchterfolg und die geringen Vererbungsraten der unglykosylierten PrP-Variante ihre direkte Ursache im mutierten und so vielleicht zytotoxischen Prionprotein haben, konnte bislang nicht abgeklärt werden.

Zucht auf homozygote Tiere Die 77 Foundertiere wurden im Alter von acht Wochen jeweils mit PrP⁰-Mäusen verpaart und die PCR-positiven Tiere dieser F1-Generation jeder so entstandenen Linie auf Proteinexpression im Gehirn untersucht. F1-Tiere mit einer starken Prionproteinexpression im Gehirn wurden anschließend wieder mit F1-Tieren verpaart und die Nachkommen in einer quantitativen PCR zum Auffinden homozygoter Trägertiere (Seite 67) untersucht. Dazu wurde die DNA-Konzentration der Schwanzlysate ermittelt, 0,4µg DNA eingesetzt und eine PCR-Reaktion mit den Primern P10 und 3'nc mit 20 Schleifen durchgeführt. Durch einen Vergleich der Bandenintensität konnte so auf homozygote Tiere geschlossen werden. Zusätzlich wurden auch in die Standard-PCR (Seite 65) 0,4µg DNA eingesetzt und diese Ergebnisse mit hinzu gezogen. Aufgrund der semikompetitiven Eigenschaft dieses Systems zeigten homozygote Tiere eine Verschiebung des Verhältnisses der Bandenintensität des Prnp⁰-Fragments zum Maus-Prnp-Fragment (Abb. 30).

Homozygote F2-Tiere einer Zuchtlinie wurden dann miteinander verpaart, und der Nachwuchs wurde in der Standard-PCR-Reaktion getestet. Teilweise wurden PCR-homozygote F2-Tiere auch mit PrP⁰-Mäusen verpaart, um das PCR-Ergebnis zu überprüfen. Nicht in jedem Fall handelte es sich bei den in der PCR ermittelten homozygoten Tiere

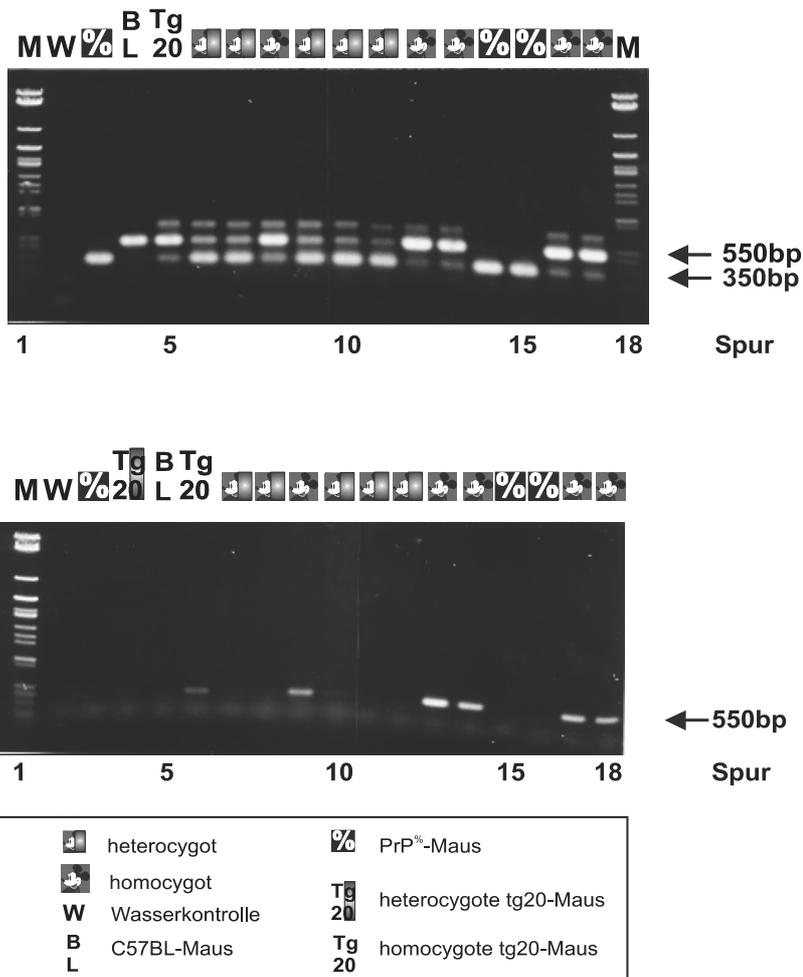


Abbildung 30: PCR zum Auffinden Prnp-homozygoter Trägertiere

In jede PCR-Reaktion wurden 0,4µg DNA eingesetzt.

Oben: Standard-PCR (mit den Primern P10, P3 und 3'nc; 35 Schleifen): Als Kontrollen wurden stets eine Wasserprobe und Schwanzlysat einer PrP⁰-, tg20- und C57BL-Maus mitgeführt (Spuren 2-5).

M: Standardlängenmarker λ-DNA/Eco47I (*AvaII*) (Spuren 1 und 18)

Homozygote Tiere zeigen eine stärkere Maus-Prnp-spezifische Bande im Vergleich zur Prnp⁰-Bande.

Unten: PCR-Reaktion mit den Primern P10 und P3; 20 Schleifen.

Da eine Unterscheidung mithilfe der Standard-PCR bei Tieren mit hoher Kopienzahl des Transgens nicht möglich war, wurde zusätzlich diese PCR-Reaktion durchgeführt. Durch den Vergleich der Bandenintensität können so homozygote von heterozygoten Trägertieren unterschieden werden. In dem hier gezeigten Beispiel war bei heterozygoten Tieren die Maus-Prnp-spezifische Bande kaum zu detektieren (Vergleich Abb. oben und unten). Als zusätzliche Kontrolle wurde Schwanzlysat einer tg20-Maus 1:1 mit dem einer PrP⁰-Maus vermischt („heterozygote“ tg20-Maus).

M: Standardlängenmarker λ-DNA/Eco47I (*AvaII*) (Spur 1)

auch tatsächlich um homozygote Mäuse.

Zucht auf Transgen/C57BL F1-Tiere Nachdem sich bei Vorversuchen in Zellkultur zeigte, dass die Prionprotein-Mutante T182N/T198A bei Konversionsexperimenten in ScN2a-Zellen einen dominant-negativen Effekt zeigte und sich damit hemmend auf die Akkumulation von endogenem PrP^{res} auswirkte, sollte dieser Effekt auch in vivo überprüft werden. Dazu wurden transgene Tiere mit C57BL-Tieren verpaart und in einer PCR-Reaktion auf transgen-positive Tiere getestet. Zu diesem Zweck wurde eine PCR-Reaktion (Seite 66) etabliert, die transgenes phgPrP-Genom vom PrP-Genom einer Wildtyp-Maus (C57BL) unterscheidet.

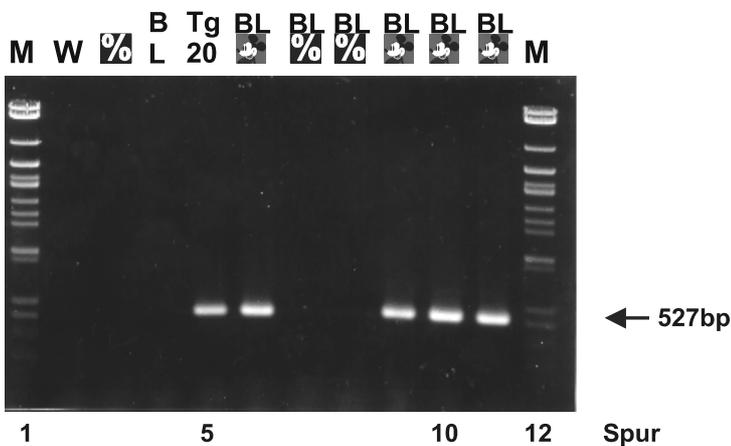
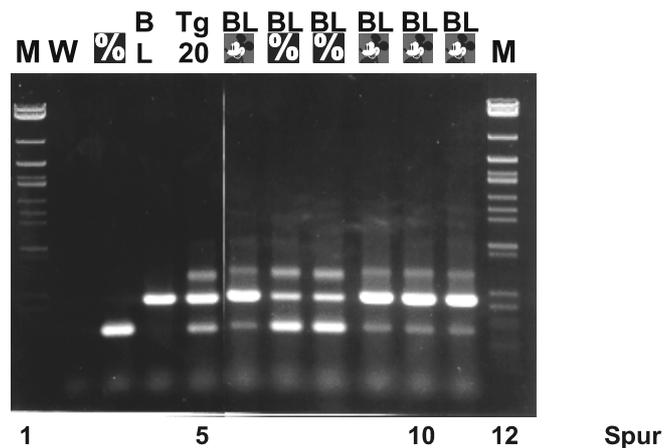
Durchgeführt wurde die Reaktion mit dem 5'-Primer ExonII.seq, der im Exon 2 von Maus-Prnp bindet, und dem 3'-Primer P10.rev, der im Maus-ORF bindet. Da bei Wildtyp-Mäusen das Exon 2 6-12kb upstream des ORF liegt (Abb. 26), entstand unter den gewählten Bedingungen kein PCR-Produkt, während bei den transgenen Mäusen, wo das Exon 2 direkt upstream des ORF liegt, ein 527bp großes Fragment entstand (Abb. 31).

Da jedoch zum einen allein schon die Einführung eines Transgens die Inkubationszeit bei Inokulationsversuchen beeinflusst (Telling, Scott, et al. 1995) und zum anderen heterozygote Mäuse eine verlängerte Inkubationszeit zeigen, wurden zur Kontrolle auch Linien der Konstrukte T182N, T198A und PrP⁰-Mäuse mit C57BL-Mäusen verpaart.

Vitalität der Mäuse Die Tiere zeigten keine neurologischen Befunde.

4.2.4 Westernblotuntersuchung zur Bestimmung der PrP-Expressionslevel im Gehirn

Zur Etablierung dieses Systems wurde zunächst eine Vergleichsstudie mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Dazu wurden je Spur 5 bzw. 10µl 10%iges Hirnhomogenat einer Wildtyp-Maus (C57BL) und einer PrP acht- bis zehnfach überexprimierenden tg20-Maus im 13% SDS-PAGE aufgetrennt, gebロットet und anschließend mit folgenden gegen Maus-PrP gerichteten Antikörpern in verschiedenen Verdünnungen inkubiert: mAk6H4 (1:10000; 1:5000, 1:2500, 1:1250), mAk3B5 (1:400, 1:200, 1:100) und Antiserum Ra5/7



W	Wasserkontrolle	%	PrP ⁰ -Maus
B	C57BL-Maus	Tg	homocygote tg20-Maus
BL	transgen-C57BL-Maus	BL %	PrP ⁰ -C57BL-Maus

Abbildung 31: PCR zur Unterscheidung von Wildtyp- und Transgen-Prnp

Oben: Standard-PCR (mit den Primern P10, P3 und 3'nc; 35 Schleifen): Als Kontrolle wurde stets eine Wasserprobe und Schwanzlysat einer PrP⁰-, tg20- und C57BL-Maus mitgeführt (Spuren 2-5).

Transgene Tiere zeigen eine stärkere Maus-Prnp-spezifische Bande im Vergleich zur Prnp⁰- Bande.

Unten: PCR-Reaktion mit den Primern ExonII.seq und P10.rev.:

Da eine Unterscheidung mithilfe der Standard-PCR bei Tieren mit hoher Kopienzahl des Transgens nicht möglich war, wurde zusätzlich diese PCR-Reaktion durchgeführt.

Nur bei transgenen Tieren entsteht ein 527bp grosses PCR-Produkt.

M: Standardlängenmarker λ -DNA/Eco47I (*AvaII*) (Spuren 1 und 12)

(1:2000). Als Negativkontrolle wurde Hirnhomogenat einer PrP⁰-Maus mitgeführt. Dabei ergab sich, dass der Antikörper mAk3B5 die unglykosylierte Form von Maus-PrP nicht detektierte, während mAk6H4 und Antiserum Ra5/7 Maus-PrP^{sen} nur schlecht erkannten. Deshalb eigneten sich diese Antikörper nicht zur zuverlässigen Untersuchung der transgenen Mäuse.

Um eine zuverlässigere Detektion zu erreichen, wurden die 10%igen Hirnhomogenate der transgenen Mäuse schließlich mit dem 3F4-epitopspezifischen mAk3F4 untersucht. Dazu wurden 10 μ l 10%iges Hirnhomogenat pro Spur im 13%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membran übertragen und anschließend die PrP-spezifischen Proteinprofile durch Messung der Chemilumineszenz (ECL-Nachweissystem, Amersham) mittels eines Photoimagers quantifiziert. Da mAk3F4 Maus-PrP nicht erkennt, wurde als Kontrolle pro Gel Hirnhomogenat eines Hamsters geladen, und die PrP-Mengen der transgenen Mäuse wurden mit der PrP-Expression des Hamsters verglichen. Pro Mauslinie wurden Hirnhomogenate von mindestens zwei verschiedenen Tieren in mindestens zwei verschiedenen Gelläufen untersucht. Linien, die nicht exprimierten, wurden aussortiert. Zusätzlich wurden die Hirnhomogenate der PrP-exprimierenden Linien noch in Verdünnungsreihen aufgetragen und wieder mit Hamster-PrP verglichen.

Da die transgenen Mäuse jedoch 3F4-getaggtetes Maus-Prionprotein und nicht Hamster-Prionprotein exprimierten, wären eigentlich Wildtyp-Mäuse die bessere Vergleichsgröße für Prionexpression im Gehirn. mAk3F4 erkennt jedoch ungetaggtetes Maus-Prionprotein nicht. Der Vergleich der PrP^{sen}-Expression der transgenen Mäuse mit Wildtyp-Maus-PrP musste daher indirekt erfolgen. Dazu wurde das quantitative Verhältnis von Wildtyp-Maus-PrP zu Hamster-PrP ermittelt.

Voraussetzung für diesen quantitativen Vergleich ist ein Antikörper, der Hamster- und Maus-PrP gleich gut detektiert. Um einen solchen Antikörper zu finden, wurden Versuchsreihen mit verschiedenen Antikörpern (mAk6H4 (1:10000), mAk2D6(1:10000), mAkSAF70 (1:1000), Ra 18/4 (1:100), Ra 38/16 (1:100), Ra 37/15 (1:100)) durchgeführt.

Dazu wurden jeweils pro Gel je Spur 200, 150, 100, 80, 40, 20ng rekombinantes Maus- und rekombinantes Hamster-PrP geladen, auf PVDF-Membran übertragen und jeweils mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Dabei zeigte sich, dass nur mAk6H4 Hamster- und Maus-PrP^{sen} gleichermaßen erkannte, während mAk2D6 Hamster-PrP kaum

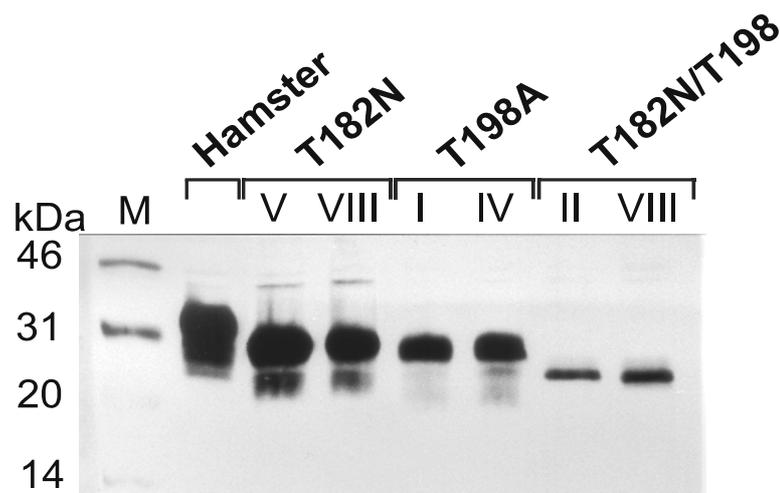


Abbildung 32: **Westernblot-Analyse von Gehirnhomogenaten der transgenen Mäuse**

Pro Spur wurden 5 μ l 10%iges Hirnhomogenat im 12%igen SDS-Page aufgetrennt. Als Kontrolle wurde Hamsterhirnhomogenat mitgeführt. Für jedes Konstrukt wurden hier zwei verschiedene Linien (römische Zahlen) aufgetragen. Die Blotmembran wurde mit mAk3F4 und PO entwickelt.

Tiere mit den Konstrukten T182N und T198A exprimierten monoglykosyliertes PrP^{sen}, während die Mutation T182N/T198A zur Expression von unglykosyliertem PrP^{sen} führte. M: ECL-Molekulargewichtsmarker.

und die restlichen Antikörper Hamster-PrP besser als Maus-PrP detektierten. In einem weiteren Versuch wurden dann Verdünnungsreihen (Unverdünnt, 1:1, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) von Wildtyp-Maus (C57BL)- und Hamsterhomogenat im SDS-PAGE getrennt, auf Membran übertragen und mit mAk6H4 (1:10000) inkubiert. Dabei stellte sich heraus, dass Hamsterhirnhomogenat 2-4x mehr detektierbares PrP^{sen} enthielt als Maus-PrP: Die diglykosylierte Form von Hamster-PrP^{sen} war noch bei einer Verdünnung von 1:128 nachweisbar. Deshalb entsprechen die für die jeweiligen Linien angegebenen Vergleichswerte, bezogen auf die Wildtyp-Maus (C57BL), den Vergleichswerten für den Hamster mal Faktor zwei (Tab. 10-12). Aufgrund der hohen Tierzahlen wurden pro Konstrukt mindestens acht sehr gut exprimierende Linien ausgesucht und weiter untersucht. Die Untersuchungen erfolgten an für das Transgen heterozygoten Tieren.

4.2.5 Westernblot-Untersuchung zur Bestimmung der PrP-Expression in verschiedenen Organen

Zur weiteren Charakterisierung der transgenen Mäuse wurden 10%ige Homogenate von Milz, Herz, Muskel (M.quadriceps), Leber und Niere hergestellt und auf PrP^{sen} untersucht. Auch hier wurden die Untersuchungen an für das Transgen heterozygoten Tieren (auf Prnp^{0/0}-Hintergrund) durchgeführt.

Dazu wurden pro Spur je 10 μ l Organhomogenat im 13%igen SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit mAk3F4 entwickelt. Als Kontrolle wurde das entsprechende Gehirnhomogenat mitgeführt. Zusätzlich wurden zum Vergleich Wildtyp-Mäuse (C57BL), tg20- und PrP^{0/0}-Mäuse untersucht. Dabei trat das Problem auf, dass sowohl mAk3F4 als auch mAk6H4 Unspezifisches im Molekulargewichtsbereich von PrP^{sen} erkannten: Milz, Herz, Leber und Niere einer PrP^{0/0}-Maus zeigten Signale im Größenbereich von Prionprotein. Deshalb wurde zusätzlich in einigen Fällen je 20 μ l Homogenat immunpräzipitiert mit mAk3F4 bzw. Antiserum Ra5/7 (Abb. 33). Die Untersuchung erbrachte die in den Tab. 10 bis 12 zusammengefassten Ergebnisse: Transgenes Prionprotein wurde in Herz, Skelettmuskel, Milz und in einem Fall auch in Niere und Leber nachgewiesen. Bei Wildtyp-Mäusen (C57BL) konnte mit dem mAk6H4 und Antiserum Ra5/7 kein Prionprotein in den untersuchten Organen nachgewiesen werden, während bei tg20-Mäusen in Herz, Skelettmuskel und Milz PrP^{sen} detektiert werden konnte.

Die nicht-nachweisbare Organexpression bei Wildtypmäusen war in der Nachweisgrenze des gewählten Systems begründet. Vorversuche zeigten, dass der hier zur Detektion eingesetzte mAk6H4 weniger sensitiv ist als der zum Screening der transgenen Mäuse eingesetzte mAk3F4.

4.2.6 Untersuchung der Kopienzahl

Um die Kopienanzahl des Transgens in den verschiedenen Mauslinien zu bestimmen, wurden jeweils verschiedene Verdünnungen (100ng, 10ng, 1ng, 0,1ng DNA) von Schwanzlysat einer Wildtyp-Maus (C57BL) und von transgenen Foundertieren in die PCR-Reaktionen (Seite 67) eingesetzt. 10 μ l jedes PCR-Amplifikats wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und die Bandenintensitäten optisch verglichen (Abb. 34). Dabei wurden

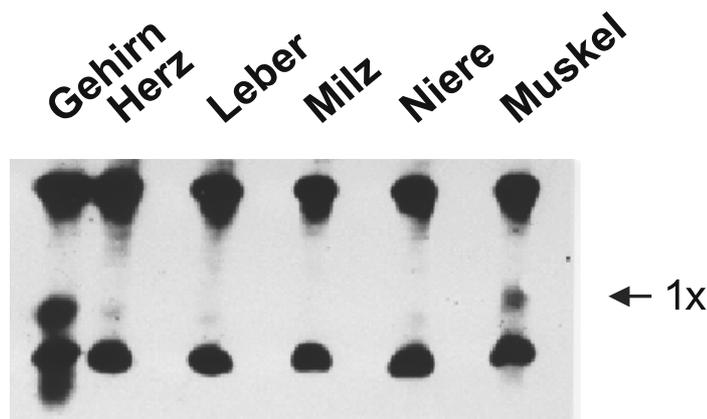


Abbildung 33: **Westernblot-Analyse verschiedener Organhomogenate am Beispiel der transgenen Mauslinie T198A I**

10%ige Homogenate wurden mit mAk3F4 immunpräzipitiert und anschließend im 13%igen SDS-Page aufgetrennt. Die Blotmembran wurde mit mAk3F4 entwickelt.

Im Vergleich zu Hirnhomogenat war eine schwache Expression von monoglykosyliertem (1x) PrP^{sen} in Herz, Leber, Niere und Muskel festzustellen.

M: ECL-Molekulargewichtsmarker.

Kopienzahlen zwischen 2 und 200 ermittelt (Tab. 10 bis 12). Zu beachten gilt, dass auch diese Untersuchung an für das Transgen heterozygoten Tieren durchgeführt wurde. Für homozygote, transgene Mäuse lägen die Kopienzahlen deshalb doppelt so hoch. Zur Absicherung unserer Ergebnisse wurden auch die in der Literatur (Fischer, Rulicke, et al. 1996) beschriebenen tg20-Mäuse untersucht. Der für diese Mäuse ermittelte Wert (20) stimmte im Größenbereich mit dem in der Literatur beschriebenen Wert (60) überein. Wie man sieht (Tab. 10 bis 12), korrelierte bei den untersuchten Tieren die Kopienanzahl des Transgens nicht mit der Expression von PrP^{sen} auf Proteinebene.

4.2.7 Inokulation der Mäuse mit Scrapiestämmen und BSE

Zur Inokulation mit verschiedenen Scrapiestämmen (Chandler, Me7) und BSE wurden pro Konstrukt zwei stark exprimierende Mauslinien ausgesucht (in Tabelle fett). Pro Linie wurden mindestens 15 für das Transgen heterozygote Tiere mit einem Inokulum intrazerebrally infiziert. Appliziert wurden je Tier 30µl 10%iges Hirnhomogenat final an Chandler, Me7 oder BSE erkrankter Mäuse (Seite 90). Als Positivkontrolle wurden Wildtyp-Mäuse

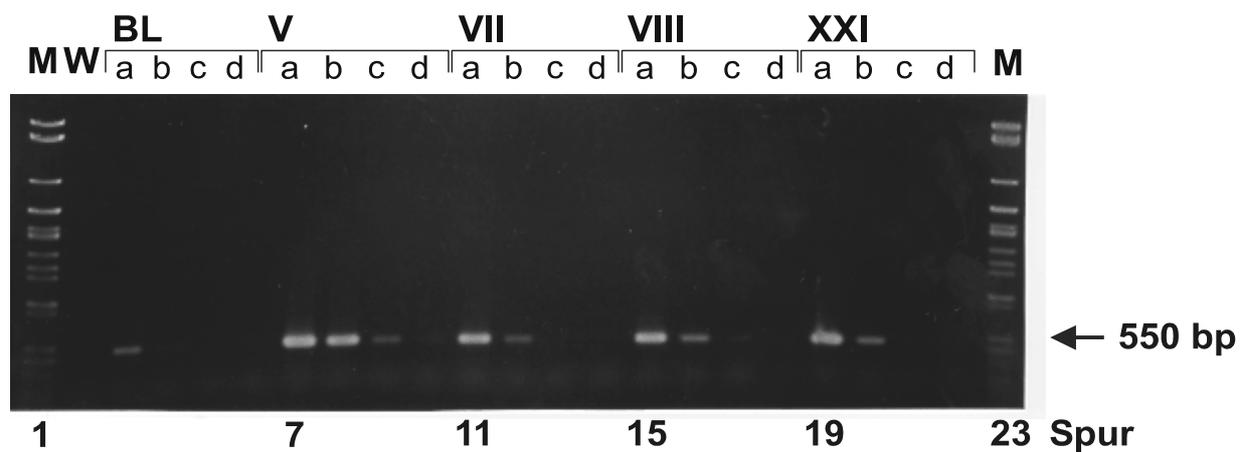


Abbildung 34: **PCR-Reaktion zur Untersuchung der Kopienanzahl des Transgens**

Pro Mauslinie wurden je 100ng (a), 10ng (b), 1ng (c) und 0.1ng (d) DNA in die PCR-Reaktion mit den Primern P10 und 3'nc (25 Schleifen) eingesetzt. Durch den Vergleich der Bandenintensität der transgenen Mauslinien mit einer C57BL-Maus (BL) wurden die Kopienzahlen ermittelt. Als Beispiel sind hier vier verschiedene Prnp-T182N exprimierende Mauslinien gezeigt:

C57BL: 2 Kopien; V: 200 Kopien; VII: 20 Kopien; VIII: 20 Kopien; XXI: 20 Kopien

M: Standardlängenmarker λ -DNA/Eco47I (*AvaII*) (Spuren 1 und 23)

W: Wasserkontrolle (Spur 2)

(C57BL) mitgeführt. Als Negativkontrolle wurden transgene Mauslinien mit Hirnhomogenat einer nichtinfizierten C57BL-Maus inokuliert. Diese Experimente wurden an für das Transgen heterozygoten Tieren durchgeführt. Um den dominant-negativen Effekt der Mutante

T182N/T198A zu untersuchen, wurden ausserdem je Konstrukt Tiere einer stark exprimierenden Linie mit C57Bl Tieren verpaart und pro Prionen-Stamm zehn dieser Nachkommen intrazerebral inokuliert. Als Kontrolle wurden je zehn Nachkommen einer C57Bl-PrP⁰-Maus Verpaarung inokuliert. Auswertbare Ergebnisse dieser über zwei Jahre dauernden Infektionsversuche lagen beim Verfassen dieser Dissertationsschrift noch nicht vor.

4.2.8 Tabellarische Auflistung der transgenen Mauslinien

Linie	DNA-Kopienanzahl	PrP-Expression im Gehirn im Vergleich zur Wildtypmaus (C57BL)	Herz	Muskel	Milz	Niere	Leber
Homozygote Tiere							
C57BL	2	1	-	-	-	-	-
Tg20	20 60 (Literatur)	10 10 (Literatur)	+	+	+	-	-
Heterozygote Tiere							
I	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	n.d.	(+)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	n.d.	1× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IV	n.d.	1,5× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
V	200	2-4× C57BL	+	+	+	-	-
VI	n.d.	2× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VII	20	3× C57BL	-	-	-	-	-
VIII	20	2-4× C57BL	+	+	+	-	-
IX	n.d.	2× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
X	10	3× C57BL	+	+	?	-	-?
XI	n.d.	1× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XII	Keine positiven Nachkommen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XIII	Keine Nachkommen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XIV	n.d.	(+)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XV	n.d.	(+)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 10: Mauslinien mit der Mutation T182N im Vergleich

Linie	DNA-Kopienanzahl	PrP-Expression im Gehirn im Vergleich zur Wildtypmaus (C57BL)	Herz	Muskel	Milz	Niere	Leber
XVI	Keine positiven Nachkommen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XVII	10	2-3× C57BL	(+)	-	-	-	-
XVIII	Keine Nachkommen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XIX	Keine positiven Nachkommen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XX	n.d.	2× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XXI	20× C57BL	2-4× C57BL	?	+	+	-	?
XXII	100× C57BL	3× C57BL	(+)	+	?	-	-
XXIII	n.d.	1× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XXIV	Keine positiven Nachkommen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XXV	n.d.	2-4× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XXVI	n.d.	2× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XXVII	100	2-4× C57BL	-	-	-	-	-
XXVIII	20	3× C57BL	+	+	+?	?	?

Tabelle 10 (Fortsetzung): **Mauslinien mit der Mutation T182N im Vergleich**

Linie	DNA-Kopienanzahl	PrP-Expression im Gehirn im Vergleich zur Wildtypmaus (C57BL)	Herz	Muskel	Milz	Niere	Leber
Homozygote Tiere							
C57BL	2	1	-	-	-	-	-
Tg20	20 60 (Literatur)	10 10 (Literatur)	+	+	+	-	-
Heterozygote Tiere							
I	10	2-4× C57BL	+	+	+	+	+
II	n.d.	2× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	n.d.	1× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IV	20	2-4× C57BL	+	+	-	-	-?
V	n.d.	0,5× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VI	n.d.	1× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VII	20	3× C57BL	-	-	-	-	-
VIII	Keine Nachkommen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IX	n.d.	1× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
X	n.d.	1× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XI	100	2-4× C57BL	+	-	-	-	?
XII	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XIII	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XIV	n.d.	1× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XV	10	2× C57BL	?	+	-	-	-
XVI	Keine positiven Nachkommen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 11: Mauslinien mit der Mutation T198A im Vergleich

Linie	DNA-Kopienanzahl	PrP-Expression im Gehirn im Vergleich zur Wildtypmaus (C57BL)	Herz	Muskel	Milz	Niere	Leber
XVII	Keine Nachkommen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XVIII	n.d.	0,5x C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XIX	10	2-4x C57BL	+	+	-	-	-
XX	n.d.	1x C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XXI	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XXII	n.d.	3x C57BL	(+)	+	?	-	-
XXIII	n.d.	1x C57BL	+	+	-	-	-
XXIV	10	2-4x C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XXV	n.d.	1-2x C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XXVI	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 11 (Fortsetzung): **Mauslinien mit der Mutation T198A im Vergleich**

Linie	DNA-Kopienanzahl	PrP-Expression im Gehirn im Vergleich zur Wildtypmaus (C57BL)	Herz	Muskel	Milz	Niere	Leber
Homozygote Tiere							
C57BL	2	1	-	-	-	-	-
Tg20	20 60 (Literatur)	10 (Literatur)	+	+	+	-	-
Heterozygote Tiere							
I	100	0,5-1× C57BL	+	+	?(+)	?	?
II	20	1× C57BL	(+)	+	(+)	-	-
III	Keine Nachkommen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IV	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
V	Keine Nachkommen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VI	Keine positiven Nachkommen	1× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VII	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VIII	20	1-2× C57BL	+	+	-	+?	-
IX	Keine positiven Nachkommen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
X	Keine positiven Nachkommen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XI	n.d.	0,5-1× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 12: Mauslinien mit der Mutation T182N/T198A im Vergleich

Linie	DNA-Kopienanzahl	PrP-Expression im Gehirn im Vergleich zur Wildtypmaus (C57BL)	Herz	Muskel	Milz	Niere	Leber
XII	Keine positiven Nachkommen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XIII	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XIV	n.d.	0,5× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XV	Keine Nachkommen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XVI	20	1-2× C57BL	-	+	-	-	-+?
XVII	n.d.	1-2× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XVIII	n.d.	1-2× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XIX	n.d.	-	+	+	-	-	-
XX	n.d.	1× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XXI	n.d.	0,5× C57BL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XXII	20	1-2× C57BL	+	(+)	+	-	-
XXIII	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XXIV	Keine positiven Nachkommen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XXV	20	1× C57BL	-	-	-	-	-
XXVI	100	1,5× C57BL	+	+	-	?	?
XXVII	2	0,5-1× C57BL	-	+	-?	?	?

Tabelle 12 (Fortsetzung): **Mauslinien mit der Mutation T182N/T198A im Vergleich**

Legende:

- + Prionprotein ist nachweisbar
- Prionprotein nicht nachweisbar
- (+) Prionprotein ist schwach nachweisbar; jedoch aufgrund der geringen Menge mit den Methoden des gewählten Systems nicht quantifizierbar.
- ? kein eindeutiges Signal

4.2.9 Tabellarische Zusammenfassung der transgenen Mauslinien

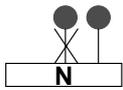
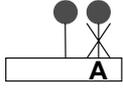
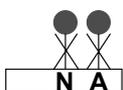
Konstrukt	Mikroinjizierte Embryonen, die in Ammentiere injiziert wurden	Nachkommen	Founder	Kopienanzahl des Transgens	Mäuse mit detektierbarer PrP ^{sen} -Expression im Gehirn	PrP ^{sen} -Expression im Gehirn im Vergleich zum Hamster und zu C57BL-Mäusen
T182N 	487 Embryos 17 Ammen	102	28	10-200 9 Linien untersucht	20	0,5-2× Hamster 1-4× Maus C57BL
T198A 	315 Embryos 15 Ammen	70	24	10-100 7 Linien untersucht	19	0,25-2× Hamster 0,5-4× Maus C57BL
T182N/ T198A 	465 Embryos 19 Ammen	74	25	2-100 8 Linien untersucht	15	0,25-1× Hamster 0,5-2× Maus C57BL
gesamt	1255 Embryos 51 Ammen	246	77	2-200 24 Linien untersucht	54	0,25-2× Hamster 0,5-4× Maus C57BL

Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem transgenen Tiermodell

5 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung der Glykosylierung des Prionproteins für die Pathogenese der Scrapie-Erkrankung zu untersuchen.

Bei der Scrapie-Erkrankung können verschiedene Stämme unterschieden werden (Seite 25). Diese unterscheiden sich in Mäusen mit definiertem Genotyp hinsichtlich der Inkubationszeit (Dickinson & Fraser 1977), dem histopathologischen Verteilungsmuster (Hecker, Taraboulos, et al. 1992; Telling, Parchi, et al. 1996; Scott, Groth, et al. 1997), dem Molekulargewicht und dem Glykosylierungsmuster (Collinge, Hill, et al. 1997; Somerville 1999; Kuczius, Haist, et al. 1998). Im Rahmen der Protein-Only-Theorie stellt sich die Frage, wie eine definierte Polypeptdikette zu verschiedenen Stammphänotypen führen kann. Grundsätzlich gibt es zwei Erklärungsansätze: die „Targeting“- und die „Konformations-Theorie“.

Die „Targeting-Theorie“ geht von einer rezeptorähnlichen Funktion der verschiedenen möglichen Zuckerseitenketten von PrP aus, die zu einem zielgerichteten „Trafficking“ von PrP^{res} führt. Die „Konformations-Hypothese“ indes sieht die Stammdiversität allein in der Tertiärstruktur des Proteins begründet. Den Beweis für das Zutreffen der „Targeting-Theorie“ kann über transgene Mäuse geführt werden, die lediglich die unglykosylierte Form des Prionproteins exprimieren. Bleiben die Stammeigenschaften nach Passagen in solchen Tieren nicht erhalten, dann wären Zuckerseitenketten für die Vielfalt der Stämme zumindest mitverantwortlich. Der umgekehrte Fall würde für die modifikationsunabhängige „Konformations-Hypothese“ sprechen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb verschiedene transgene Mäuse hergestellt werden, die un- bzw. monoglykosyliertes Maus-Prionprotein exprimieren. Frühere Arbeiten (Rogers, Taraboulos, et al. 1990; Lehmann & Harris 1997) zeigten, dass die Deletion der ersten Erkennungssequenz für N-Glykosylierung durch den Austausch von Threonin zu Alanin im Kodon 182 des Maus-Prionproteins zu einer gestörten PrP^{sen}-Synthese führt: derartig mutiertes PrP^{sen} war nicht auf der Zelloberfläche detektierbar. Ebenso waren transgene Mäuse mit dieser PrP-Mutation resistent gegenüber einer Scrapie-Infektion mit zwei verschiedenen Stämmen. Die Zerstörung der zweiten Glykosylierungsstelle beeinträchtigte indes weder die Prozessierung noch die grundsätzliche Scrapie-Infizierbarkeit.

Da es in der Literatur Hinweise gab, dass PrP^{sen} auf der Zelloberfläche exprimiert werden muss, damit PrP^{res} Zellen infizieren kann (Caughey & Raymond 1991; Borchelt, Taraboulos, et al. 1992; Taraboulos, Scott, et al. 1995; Kaneko, Vey, et al. 1997), stellte sich die Aufgabe transgene Tiere herzustellen, deren glykosylierungsmutiertes PrP möglichst authentisch prozessiert wird, um so eine wichtige Grundvoraussetzung für die Infizierbarkeit der Mäuse zu schaffen. Aus diesem Grund wurden zunächst verschiedene erkenntnissequenzmutierte PrP-Moleküle in Zellkultur charakterisiert. PrP-Mutanten mit wildtypähnlichem Verhalten wurden anschließend zur Herstellung transgener Mäuse verwendet.

5.1 Zellkulturarbeiten

5.1.1 Charakterisierung von Erkennungssequenz-mutiertem PrP

Prozessierung von PrP Ziel war es, Glykosylierungsmutanten von PrP^{sen} zu finden, die sich möglichst wie Wildtyp-PrP verhalten.

Zunächst musste die grundsätzliche Frage geklärt werden, ob die gestörte PrP-Synthese Ursache der fehlenden Glykosylierung oder Folge der eingeführten Mutation war. Da Experimente von Lehmann et. al (Lehmann & Harris 1997) zeigten, dass unter der Wirkung des Glykosylierungshemmers Tunicamycin synthetisiertes Wildtyp-PrP auf der Zelloberfläche detektiert werden kann, lag der Schluss nahe, dass es sich um eine mutationsbedingte Störung handeln könnte. Die beschriebenen Experimente ließen im weiteren darauf schließen, dass die Mutation der ersten Glykosylierungsstelle das Verhalten von PrP^{sen} bestimmt. Deshalb wurde in der ersten Erkennungssequenz für N-Glykosylierung die Aminosäure Threonin an Kodon 182 gegen alle anderen möglichen Aminosäuren ausgetauscht. Das mutierte PrP-Gen wurde in Maus-Neuroblastomzellen stabil exprimiert, und diese wurden anschließend auf die Zelloberflächenexpression von mutiertem PrP^{sen} untersucht. Von 20 verschiedenen Maus-PrP-Mutanten des Kodon 182 waren drei auf der Zelloberfläche nachweisbar: Wt3F4, T182S, und T182N. Die Aminosäuren Threonin und Serin führten nicht zu einem Verlust der ersten N-Glykosylierungsstelle, da sie Bestandteil der Erkennungssequenz für N-Glykosylierung sind. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte nur die Mutante T182N gefunden werden, die zu Monoglykosylierung bei erhaltener Oberflächenexpression führte. Im weiteren wurde eine unglyko-

sylierte PrP-Mutante gefunden, T182N/T198A, die auf der Zelloberfläche detektierbar war. Obwohl bei vielen Glykoproteinen (Garcia, Cundell, et al. 1995; Olivares, Aragon, et al. 1995; Roberts, Petropavlovskaja, et al. 1998; McFarlane, Breen, et al. 2000) die intakte N-Glykosylierung eines Glykoproteins als Voraussetzung für den Transport auf die Zellmembran gilt, trifft dies für PrP nicht zu. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist die Glykosylierung keine notwendige Voraussetzung für die Präsentation von PrP auf der Zelloberfläche. Neuere Arbeiten von Korth et al. (Korth, Kaneko, et al. 2000) bestätigen diese Aussage. Während in der vorliegenden Arbeit die Zerstörung der Glykosylierung durch Mutation der dritten Aminosäure der Erkennungssequenz durchgeführt wurde, stellten Korth et al. (Korth, Kaneko, et al. 2000) eine andere unglykosylierte Maus-PrP-Mutante (3F4 getaggt) mit erhaltener Oberflächenexpression direkt durch die Mutation der Zuckeranheftungsstellen (N180Q/N196Q) her. Ähnlich ungestörte Prozessierung bei deletierten N-Glykosylierungsstellen wurde auch für andere Proteine wie den Histamin2-Rezeptor des Hundes beschrieben (Fukushima, Oka, et al. 1995). Es scheint, dass die Peptidkette alleine eine wichtige Rolle beim Export von Glykoproteinen auf die Zelloberfläche und für die Steuerung innerhalb der Zelle spielt (Ali & Field 2000).

Anschließend wurden diese beiden Mutanten mit den früher in der Literatur beschriebenen PrP-Mutanten T182A, T198A und T182A/T198A verglichen. Zu diesem Zweck wurden stabil transfizierte Zellpopulationen subkloniert und untersucht. Dabei fiel auf, dass im Gegensatz zu früheren Veröffentlichungen (Rogers, Taraboulos, et al. 1990; Lehmann & Harris 1997; Korth, Kaneko, et al. 2000; persönliche Mitteilung Lorenz) unter den im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Versuchsbedingungen alle drei Konstrukte auf der Zelloberfläche detektierbar waren. Die PrP-Mutanten, die die Mutation T182A trugen, waren im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle jedoch nur in geringen Mengen auf der Oberfläche detektierbar, während die Oberflächenexpression der PrP-Mutanten T198A, T182N und T182N/T198A mit der der Wildtyp-Kontrolle vergleichbar war.

Die Ursache für die abweichenden Ergebnisse kann zum einen auf eine erhöhte Sensitivität des gewählten Detektionssystems zurückzuführen sein oder auf den Gebrauch unterschiedlicher Zellen. Während Rogers et al. (Rogers, Taraboulos, et al. 1990) mit transient transfizierten CV1-Zellen arbeitete, verwendeten Lehmann et al. (Lehmann & Harris 1997) stabil transfizierte, subklonierte CHO-Zellen und Korth et al. (Korth, Kaneko,

et al. 2000) transient exprimierende N2a-Zellen. In diesen Experimenten wurde als Detektionsmittel die FITC-vermittelte Immunfluoreszenz eingesetzt. Lorenz et al. (persönl. Mitteilung Lorenz) untersuchten mittels konfokaler Immunfluoreszenz N2a-Zellen, die transient PrP-GFP (green fluorescent protein)-Fusionsproteine exprimieren. Weder Rogers (Rogers, Taraboulos, et al. 1990) noch Lorenz (persönliche Mitteilung Lorenz) konnten mit der Methode der transienten Expression innerhalb ihres Systems glykosylierungsmutiertes Prionprotein auf der Zelloberfläche detektieren. Bei den Untersuchungen, die Lehmann et. al. (Lehmann & Harris 1997) an subklonierten CHO-Zellen durchführten, war die PrP-Mutante, die zu einem Verlust der zweiten Glykosylierungsstelle führte (T198A) auf der Zelloberfläche mittels Immunfluoreszenz nachweisbar, die anderen Mutanten jedoch nicht. Daraus kann geschlossen werden, dass eine transiente Expression nicht ausreicht, um zuverlässig Aussagen über die Oberflächenexpression des Prionprotein treffen zu können. Versuche, die im Rahmen dieser Arbeit mit stabil PrP-Mutanten exprimierenden N2a- und CHO-Zellen durchgeführt wurden, zeigten, dass die Mutante T182A nur nach Klonierung der Zellen auf der Zelloberfläche nachweisbar war. Neben der Analyse von stark überexprimierenden Klonen wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer erhöhten Sensitivität gearbeitet. Als Signalgeber bei der Durchflusszytometrie wurde PE markiertes Konjugat verwendet, das etwa 20mal sensitiver als FITC ist. Bei Durchführung der Durchflusszytometrie oder der Immunfluoreszenz mit FITC als Detektionssignal war es selbst bei den verwendeten stark exprimierenden Zelllinien nicht möglich, PrP mit der T182A-Mutation auf der Zelloberfläche zu detektieren. Um den möglichen Einfluss der Zelllinie auf die Prozessierung zu ermitteln und um auszuschließen, dass die Datendiskrepanz zu den Ergebnissen von Lehmann durch die Wahl der Zelllinie begründet war, wurden die Versuche auch in CHO-Zellen und Maus-Fibroblastenzellen durchgeführt. Auch hier bestätigte sich, dass die PrP-Mutante T182A auf der Zelloberfläche detektierbar war. Ebenso konnten für die anderen Mutanten keine grundlegenden Unterschiede festgestellt werden. Demnach ist das Trafficking unabhängig von der von uns verwendeten PrP-exprimierenden Zelllinie.

Im vorliegenden Fall des Prionproteins stellt sich jetzt die Frage, weshalb nur eine der 17 stabil exprimierten monoglykosylierten Mutanten auf der Zelloberfläche nachweisbar war. Generell sind zwei verschiedene Erklärungsansätze denkbar: durch die Mutation

kommt es entweder zur Instabilität des Proteins, so dass es nach einer kürzeren Halbwertszeit abgebaut wird, oder die Tertiärstruktur des Moleküls wird so verändert, dass ein anderer „Signal Patch“ entsteht und das entstehende Protein in der Zelle so fehl- bzw. nicht weitergeleitet wird.

Spektroskopische und thermodynamische Untersuchungen von rekombinant in *E.coli* hergestelltem und demnach unglykosyliertem Maus-PrP-T182A ergaben, dass diese Mutante im Vergleich mit Wildtyp-PrP bei verminderter intrinsischer Stabilität eine erhöhte Aggregationsbereitschaft aufweist (Liemann & Glockshuber 1999). Im weiteren zeigte dieses Molekül eine verminderte Kooperativität und faltete sich deshalb nicht mehr gemäß den Gesetzmäßigkeiten des Zwei-Zustands-Modells. Diese Instabilität sahen die Autoren in einem Verlust von intramolekularen Van-der-Waals-Kräften begründet und dem Fehlen der beiden von Threonin ausgehenden Wasserstoffbrücken zu Tyrosin an Position 161 und Cystein an Position 178.

Bezüglich der Fähigkeit über Kohlenstoffatome Wasserstoffbrücken auszubilden, sind abgesehen von Serin unter den restlichen Aminosäuren lediglich Asparagin und Glutamin dem zu ersetzenden Threonin analog. Asparagin, Glutamin und Threonin können Wasserstoffbrücken ausbilden und sind neutrale, polare Aminosäuren. Allerdings führte lediglich der Austausch zu Asparagin und nicht der zu Glutamin zu einer stabilen auf der Zelloberfläche exprimierten, monoglykosylierten PrP-Mutante. Die Ursache kann in einer sterischen Behinderung der Tertiärstrukturausbildung gesehen werden. Threonin und Asparagin besitzen beide zwei freie C-Atome in ihrer Seitenkette, während die Seitenkette von Glutamin drei C-Atome umfasst, was die Ausbildung einer mit Wildtyp vergleichbaren Tertiärstruktur verhindern könnte. So könnte begründet werden, dass nur der Austausch zu Asparagin zu einer stabilen auf der Zelloberfläche präsenten PrP-Mutante führte. Berechnungen der Tertiärstruktur auf der Basis des Swiss-Modell-Programmes bestätigten diese Theorien: Wie Threonin bilden auch Alanin, Asparagin und Glutamin eine Wasserstoffbrücke zu Cystein aa178 aus, in einem Abstand von 2.8Å. Wasserstoffbrücken zu Tyrosin aa161 werden jedoch nur von Threonin und Asparagin gebildet. Der Bindungsabstand scheint für die Stabilität eine untergeordnete Rolle zu spielen. Während Threonin eine Wasserstoffbrücke im Abstand von 3.07Å zu Tyrosin an Kodon 161 ausbildet, ist Asparagin über zwei Wasserstoffbrücken im Abstand von 2.22Å und 2.8Å mit

Tyrosin verknüpft. Das Bindungsverhalten zwischen Cystein und Tyrosin war bei allen vier Aminosäuren jedoch gleich und scheint für das Syntheseverhalten von PrP^{sen} keine entscheidende Rolle zu spielen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann postuliert werden, dass die intramolekulare Verbindung zwischen der in der β 2-Faltblattstruktur lokalisierten Aminosäure Tyrosin 161 und der α -Helix2 eine wichtige Schlüsselposition für das biologische Verhalten von PrP^{sen} darstellt.

Während spektroskopische Untersuchungen und berechnete Vorhersagen der nicht-modifizierten Proteinstruktur die geringe Oberflächenexpression der T182A-Mutanten in der Molekülinstabilität begründet sahen, gab jedoch die in Zellkulturexperimenten zunächst ermittelte, mit Wildtyp vergleichbare Gesamtexpressionsrate keinen Hinweis auf eine erhöhte Instabilität dieser Mutanten. Bei der genauen Betrachtung der Glykosylierungsmuster fiel jedoch auf, dass bei der PrP-Mutante T182A die unglykosylierte Bande oft nicht nachweisbar war. Dies könnte als Hinweis auf eine erhöhte Instabilität dieser Mutante gewertet werden, da Petersen et al. (Petersen, Parchi, et al. 1996) zeigten, dass der Verlust der Glykosylierung zu einer verkürzten Halbwertszeit von PrP führen kann. Im Gegensatz dazu wies die PrP-Mutante T182N immer die unglykosylierte Form auf. Zusätzlich zeigte die monoglykosylierte Form dieses Moleküls ein langsames und breiteres Laufverhalten im SDS-PAGE, was auf einen größeren und heterogeneren Glykosylierungsbaum schließen lässt. Beides kann darauf hinweisen, dass diese Mutante eine höhere Stabilität als T182A besitzt. Da die hier vorgestellten Analysen ergaben, dass alle Mutanten eine Disulfidbrücke besitzen, kann die verminderte Stabilität nicht in dem Verlust der kovalenten Schwefelbrücke begründet sein. Auch In-vivo-Versuche deuteten auf eine verminderte Stabilität der T182A-Mutanten hin: transgene Mäuse mit einem Threonin-Alanin-Austausch der ersten Glykosylierungsstelle oder beider Glykosylierungsstellen zeigten eine verminderte PrP^{sen}-Gesamtexpressionsrate (DeArmond, Sanchez, et al. 1997). Immunhistologische Untersuchungen dieser Mäuse ergaben aber auch Hinweise auf eine gestörte Prozessierung. Im Gegensatz zu Wildtypmäusen war die PrP^{sen}-Expression auf einzelne Gehirnbezirke beschränkt, und das Prionprotein war nicht auf Axonen detektierbar, sondern akkumulierte im Zellsoma. Vergleichbare Zellkulturstudien (persönliche Mitteilung Lorenz) sahen eine Akkumulation dieser Mutante im Golgi-Apparat und im ER. Die vorliegende Arbeit bestätigt eine Akkumulation der T182A-

Mutante im cis-Golgi-Kompartiment: Der Großteil der Maus-PrP-T182A-Moleküle war nicht Endo H-resistent, und das Laufverhalten der monoglykosylierten Bande ergab keinen Hinweis auf einen mannosereichen Typ der Glykosylierung. Aufgrund der Modifikation der Zuckerseitenkette müssen die Moleküle also das ER verlassen haben, waren jedoch dann proximal des mid-Golgi Kompartiments, wo Endo H-Resistenz erworben wird, in ihrer weiteren Synthese oder ihrem Transport gestört. Nur einzelne Maus-PrP-T182A-Moleküle konnten jedoch auf der Zelloberfläche detektiert werden, die durch PIPLC ablösbar und Endo H-resistent waren. Die von Korth et. al. (Korth, Kaneko, et al. 2000) aufgeführte Hypothese, dass Prionprotein mit der Mutation T182A zwar normal auf die Zelloberfläche transportiert wird, dort jedoch nur eine sehr kurze Verweildauer hat, scheint aufgrund der beobachteten Prionakkumulation im Golgi-Apparat nicht zuzutreffen (Rogers, Taraboulos, et al. 1990; Lehmann & Harris 1997, persönliche Mitteilung Lorenz).

Demnach scheint die Mutation T182A zu einer durch Instabilität vermittelten Prozessierungsstörung zu führen. Als Folge der Instabilität aggregieren die Moleküle und bleiben im mid-Golgi stecken, wo sie durch zelluläre Kontrollmechanismen eliminiert werden. Dies könnte zum einen über einen retrograden Transportmechanismus mit anschließendem Abbau durch das Proteasom (Mayer, Braun, et al. 1998; Hirsch & Ploegh 2000) oder einem direkt vom Golgi-Kompartiment ausgehenden Abbaumechanismus geschehen. Einzelne Moleküle könnten dabei aufgrund der Überexpression der zellulären Kontrollmaschinerie entkommen sein und wie Wt3F4 auf die Zelloberfläche transportiert worden sein.

Die Zellkulturuntersuchungen der Mutante T198A zeigten, dass dieses glykosylierungsmutierte Prionprotein zwar auf der Zelloberfläche präsentiert wird, jedoch nicht mit dem Enzym PIPLC von der Zelloberfläche ablösbar war. Entweder wird der Angriff des Enzyms PIPLC durch die Konformation der Mutante T198A behindert, oder diese monoglykosylierte Mutante ist auf andere Art in der Zellmembran verankert. Da die entsprechenden „Doppelmutanten“ T182N/T198A und T182A/T198A jedoch sensitiv für einen PIPLC-Verdau waren, ist letztere Vermutung unwahrscheinlich. Dagegen spricht auch, dass die Mutante T198A in beiden hier durchgeführten Versuchsansätzen umfaltbar war. Arbeiten von Rogers et al. (Rogers, Yehiely, et al. 1993) zeigten zwar, dass der vorhandene GPI-Anker nicht die Voraussetzung für eine Konversion in ScN2a-Zellen

sein muss, aber Daten von Kaneko et al. (Kaneko, Vey, et al. 1997) belegen, dass unter vergleichbaren Bedingungen eine alternative Verankerung von PrP die Konversion verhindert. Deshalb ist anzunehmen, dass die PIPLC-Resistenz der Mutante T198A in einer veränderten Molekülstruktur begründet war, die den Angriff des Enzyms sterisch verhindert.

Glykosylierung von PrP Massenspektrometrische Untersuchungen von murinem PrP^{res} ergaben, dass Oligosaccharide der ersten Glykosylierungsstelle vor allem aus neutralen und kaum sialinisierten zweifach- und dreifach verzweigten Zuckerketten aufgebaut sind und ein Molekulargewicht von 1660-2340 Da besitzen. Im Gegensatz dazu sind Zucker der zweiten Glykosylierungsstelle 2000-3020 Da schwer, besitzen mehr Sialinsäurereste und bestehen aus tri- und tetra-antennären Strukturen (Stimson, Hope, et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Westernblotanalyse gezeigt werden, dass dies auch in Zellkultur und für die PK-sensitive Isoform des Prionproteins zutrifft. Auch die Glykosylierungsmutanten spiegelten im Bezug auf Molekulargewicht und Heterogenität der Zuckerketten den Zustand von Wildtyp-PrP wider: beim Vergleich der verschiedenen Glykosylierungsmutanten von PrP in N2a-Zellen zeigte sich, dass Moleküle mit einem Verlust der ersten Glykosylierungsstelle (T182A, T182N) eine breitere monoglykosylierte Bande mit höherem Molekulargewicht aufwiesen als Prionproteine, denen die zweite Glykosylierungsstelle fehlte (T198A). Im Unterschied zu Maus-PrP-T182A zeigte -T182N eine breitere monoglykosylierte Bande mit höherer molekularer Masse. Da dieser Effekt bei einem Vergleich innerhalb einer Zelllinie beobachtet werden konnte, kann nicht die enzymatische Ausstattung einer individuellen Zelllinie Ursache der unterschiedlichen Glykosylierung sein, sondern muss in der Polypeptidkette selbst begründet sein. Es könnte postuliert werden, dass das Molekül T182N eine höhere Stabilität aufweist und deshalb mehr Glykogruppen gebunden werden können. Eine sterische Behinderung der Glykosylierung durch die Tertiärstruktur kann weitgehend ausgeschlossen werden, da die für PrP geschilderten Wildtyp-charakteristischen Grundzüge der N-Glykosylierung an aa180 und aa196 für alle Mutanten zu beobachten waren. Im übrigen zeigten Vorhersagen (DeArmond, Qiu, et al. 1999), dass die Glykosylierungsbäume auf der Aussenfläche des Moleküls liegen, was ebenfalls eine sterische Behinderung als unwahrscheinlich erscheinen

lässt.

Die atypische, in der Literatur für den humanen EGF-(Epidermal-Growth-Factor)-Rezeptor beschriebene Erkennungssequenz N-X-C (Sato, Kim, et al. 2000) wird im Fall von PrP nicht als Erkennungssequenz für N-Glykosylierung durch die Zelle erkannt. Die Mutante T182C zeigte bei Untersuchungen im Westernblot lediglich die mono- und unglykosylierte Bande.

5.1.2 Konversion von Erkennungssequenz-mutiertem PrP in ScN2a-Zellen

Umfaltbarkeit von Erkennungssequenz-mutiertem PrP Nach der Charakterisierung von glykosylierungsmutiertem PrP^{sen} sollte die Umfaltbarkeit der PrP-Moleküle untersucht werden. Dabei ergab sich, dass prinzipiell alle Moleküle in ihre Proteinase K-resistente Isoform umfaltbar waren, wenn auch die unglykosylierte Maus-PrP-Mutante T182N/T198A nur in geringen Mengen. Die Umfaltbarkeit dieser Mutante war expressionsabhängig: wurde viel exogenes Maus-Prnp in der Zelle exprimiert, so konnte kein T182N/T198A-PrP^{res} detektiert werden. Standen in der Zelle jedoch nur wenige exogene PrP^{sen} Moleküle zur Verfügung, wurden diese in ihre Proteinase K-resistente Isoform umgefaltet. Da alle anderen Mutanten sich wie Wildtyp 3F4 verhielten, kann dieser Effekt nicht mit dem Fehlen der Glykosylierung erklärt werden. Unsere Versuche bestätigten frühere Arbeiten von Taraboulos et al. (Taraboulos, Rogers, et al. 1990) darin, dass im Gegensatz zu Arbeiten von Korth et al. (Korth, Kaneko, et al. 2000) gezeigt werden konnte, dass die unglykosylierte Mutante T182A/T198A in ScN2a-Zellen in ihre Proteinase K-resistente Isoform umfaltbar war. Demnach wurde bestätigt, dass die Glykosylierung selbst nicht für die Konversionsreaktion in Zellkultur notwendig ist. Ausserdem zeigten die Experimente, dass nicht eine Mutation alleine für die relativ schlechte Konvertierbarkeit der Mutante T182N/T198A verantwortlich ist. Die entsprechenden Einzelmutanten T182N und T198A verhielten sich bezüglich ihrer Umfaltbarkeit wie Wildtyp 3F4. Arbeiten, die der unglykosylierten Form von PrP eine erhöhte Konversionsbereitschaft und damit Pathogenität zusprachen (Kocisko, Come, et al. 1994; Capellari, Zaidi, et al. 1999), konnten indes nicht bestätigt werden: Wurden Konversionsversuche in ScN2a-Zellen durchgeführt, die nur relativ wenig endogenes PrP^{res} enthielten, so waren die monoglykosylierten Mutanten wie Wildtyp-PrP umfaltbar. Die Proteinase K-resistente

Form unglykosylierter PrP-Moleküle konnte jedoch nicht detektiert werden. Im Weiteren zeigen die hier vorgestellten Daten, dass eine geringe Oberflächenexpression ausreicht, um eine Umfaltung in ScN2a-Zellen zu ermöglichen. Obwohl die Mutanten T182A und T182A/T198A nur in geringen Mengen auf der Zelloberfläche detektiert werden konnten, waren sie im Vergleich wie Wildtyp 3F4-PrP konvertierbar. Die fehlende Disulfidbrücke war nicht die Ursache der ineffektiven Umfaltbarkeit der PrP-Mutante T182N/T198A. Frühere Untersuchungen (Muramoto, Scott, et al. 1996; Herrmann & Caughey 1998; Yanai, Meiner, et al. 1999) zeigten, dass das Fehlen einer Disulfidbrücke die Umfaltungsreaktion verhindern kann. Die hier dargelegten Ergebnisse bestätigten jedoch für jede der Glykosylierungsmutanten das Vorhandensein einer Disulfidbrücke.

Einfluss von Erkennungssequenz-mutiertem PrP auf endogenes murines PrP

Während die PrP-Mutanten T182A, T182N, T198A und T182A/T198A wie Wildtyp 3F4 keinen Einfluss auf Gesamt-PrP^{res} zeigten, führte die Mutante T182N/T198A zu einer deutlichen Abnahme von endogenem PrP^{res}. Dieser hemmende Einfluss der Mutante stand im direkten Zusammenhang mit der Konvertierbarkeit dieses Konstruktes. Endogenes PrP^{sen} nahm mit der Umfaltbarkeit der Mutante, d.h. mit Abnahme der PrP^{sen}-Expression zu. Dieser Effekt auf endogenes und exogenes PrP^{res} wurde in der Literatur für verschiedene PrP-Mutanten (Priola, Caughey, et al. 1994; Priola & Chesebro 1995; Kaneko, Zulianello, et al. 1997; Holscher, Delius, et al. 1998; Zulianello, Kaneko, et al. 2000) unter anderem auch für Wildtyp 3F4 (Priola 1999) beschrieben und als (trans-)dominant-negative Hemmung bezeichnet. Bei Durchführung der Experimente in ScN2a-Zellen, die in großen Mengen PrP^{res} exprimierten, konnte für Wildtyp 3F4 dieses Phänomen jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Nur bei Verwendung schwach PrP^{res}-haltiger ScN2a-Zellen konnte dieser Hemmeffekt beobachtet werden.

Theoretisch kann die Umfaltungsreaktion von PrP zeitlich in zwei Abschnitte gegliedert werden. Zunächst muss es zur Bindung zwischen PrP^{sen} und PrP^{res} kommen, auf die dann die Umfaltungsreaktion erfolgt. Deshalb stellte sich zunächst die Frage, ob die für die Mutante T182N/T198A beobachtete Hemmung der Konversion auf eine mögliche Fehlbindung zurückgeführt werden kann. Theoretisch gibt es für die exogenen PrP^{sen}-Moleküle drei verschiedene Bindungspartner: exogenes PrP^{sen}, endogenes PrP^{sen} und en-

dogenes PrP^{res}. Autoaggregation kann ausgeschlossen werden, da eine starke Bindung zwischen den exogenen PrP^{sen}-Molekülen zwar die geringe Umfaltbarkeit der Mutante erklären würde, jedoch nicht den hemmenden Einfluss auf endogenes PrP^{res}. Auch die Bindung zwischen exogenem und endogenem PrP^{sen} kann ausgeschlossen werden, da in Löslichkeitsversuchen gezeigt werden konnte, dass exogene PrP^{sen}-Aggregate kein endogenes PrP^{sen} beinhalten. Demnach kann im vorliegenden Fall von einer Bindung zwischen exogenem PrP^{sen} und endogenem PrP^{res} ausgegangen werden. Nachdem demnach eine Fehlbindung theoretisch ausgeschlossen werden konnte, muss das besondere Verhalten der Mutante T182N/T198A nun im Ablauf der Umfaltungsreaktion begründet sein. In der Literatur werden zwei Faktoren genannt, die eine Umfaltungsreaktion beeinflussen: zum einen die Speziesbarriere (Loopregionen zwischen aa112-187) (Priola 1999), d.h. die Sequenzhomologie, und zum anderen die Affinität für einen konversionsvermittelnden Faktor, Protein X (aa167, 171, 214, 218) (Telling, Scott, et al. 1995; Kaneko, Zulianello, et al. 1997; Scott, Safar, et al. 1997; Zulianello, Kaneko, et al. 2000). Zunächst kann angenommen werden, dass mutiertes, also bezüglich der Primärstruktur heterologes PrP mit der Mutation T182N/T198A zwar eine hohe Bindungsaffinität für endogenes PrP^{res} besitzt, selbst jedoch nur schlecht konvertiert wird. Die schlechte Konvertierbarkeit würde dann einen lang andauernden Umfaltungsprozess implizieren, der einer hohen Aktivierungsenergie bedarf. So könnte die Mengenabhängigkeit der Hemmeffekte erklärt werden: Sind viele exogene PrP^{sen}-Moleküle vorhanden, können diese effizient große Mengen an endogenem PrP^{res} binden und so für lange Zeit die Bindungs- oder Konversionsstelle blockieren. Mit der Folge, dass endogenes PrP^{sen} nicht mehr binden oder umgefaltet werden kann und so aufgrund der fehlenden Regeneration abnimmt. Exogenes PrP^{res} entstünde dabei nur in nicht-detektierbaren Mengen. Werden jedoch nur wenige Moleküle exogenes PrP^{sen} exprimiert, so kann nur wenig endogenes PrP^{res} blockiert werden. Endogenes PrP^{res} wäre so im Überschuss vorhanden und könnte exogenes PrP^{sen} von mehreren Seiten räumlich angreifen. Dadurch könnte die angenommene hohe Aktivierungsenergie, die zur Konversion dieser Mutante notwendig ist, überwunden werden und das entstandene exogene PrP^{res} könnte als Template für eine nun wieder homologe Konversion exogener PrP-Moleküle fungieren.

Da gleichzeitig die homologe Umfaltung von endogenem PrP in der Zelle ablaufen kann

und dies aufgrund des relativen Überschusses an endogenem PrP^{sen} weitgehend ungestört verläuft, erklärt sich so auch die Aufhebung des Hemmeffektes. Mit dieser Theorie ließe sich auch erklären, dass der Hemmeffekt von Wt3F4 nur in schwach PrP^{res}-haltigen ScN2a-Zellen zu beobachten war. Diesem Erklärungsansatz zufolge könnte die Speziesbarriere innerhalb einer Zelle überwunden werden, solange nur relativ wenige heterologe Moleküle in die Reaktion eingebracht werden. Dieses Experiment würde so eine Art Überschreiten der Speziesbarriere in Zellkultur widerspiegeln. Das stöchiometrische Verhältnis von exogenem PrP^{sen} zu endogenem PrP^{res} könnte dabei als Maß für die Speziesbarriere dienen. Diese Hypothese schließt die Beteiligung eines Chaperons bei der Umfaltung nicht aus. Mit der Protein X Hypothese allein kann der dominant-negative Effekt jedoch nicht erklärt werden. Die Annahme, dass ein konversionsvermittelndes Chaperon, Protein X genannt, eine spezifische Affinität für das umzufaltende Molekül haben muss, würde implizieren, dass eine zu hohe oder eine zu niedrige Affinität des Moleküls die beobachteten Phänomene erklärt. Eine niedrige Affinität zu Protein X erklärt jedoch nur die verminderte Umfaltbarkeit von exogenem PrP^{sen}, aber nicht, dass bei geringer Expression von exogenem PrP^{sen} dessen Konversion trotz geringer Affinität dann fast unbeeinträchtigt abläuft. Denkbar wäre auch eine gesteigerte Affinität für Protein X bei fehlender intrinsischer Aktivität. Aber auch diese Hypothese begründet nicht die fast unbeeinträchtigte Konversion geringer exogener Molekülmengen. Dieses Phänomen der dominant-negativen Hemmung konnte bislang noch nie für Mutationen in dieser PrP-Region beobachtet werden konnte. Sowohl für die Speziesbarriere als auch für Protein X wurden bislang stets andere Regionen des Prionproteins verantwortlich gemacht. Da sich die entsprechenden Einzelmutanten und T182A/T198A wie Wildtyp 3F4 verhielten, kann postuliert werden, dass dieser Effekt in der zuvor erwähnten stabilen Tertiärstruktur dieser Mutante begründet sein muss. Im Weiteren können noch zwei andere, jedoch unwahrscheinliche Hypothesen angeführt werden. Zum einen könnte angenommen werden, dass viele PrP-T182N/T198A Moleküle aufgrund einer hohen und stabilen Rigidität in der Lage sind endogenes PrP^{res} über einen Intermediatzustand wieder zu PrP^{sen} rückzukonvertieren. Das Molekülverhältnis zwischen exogenem PrP^{sen} und endogenem PrP^{res} könnte auch in diesem Fall die Umfaltbarkeit in exogenes PrP^{res} und die Aufhebung des Hemmeffektes erklären. Ein anderer Erklärungsansatz kann auf einer mengenabhängig unterschiedlichen

Translokation von PrP-T182N/T198A beruhen. Je nach Expressionslevel könnten die Moleküle am ER in verschiedene membranäre Formen angeordnet werden (als ctm-, ntm- oder sec-Form), von denen einige schlechter zu konvertieren sind und so mit dem Umfaltungprozess interferieren. Am wahrscheinlichsten ist jedoch, dass die Bindung an Protein X unbeeinträchtigt ist, die Doppelmutation aber zu einer Art tertiärstrukturvermittelten „Speziesbarriere“ führt.

5.1.3 Infektion von N2a-Zellen, die Erkennungssequenz-mutiertes PrP exprimieren

Nachdem die Konversionsexperimente in ScN2a-Zellen zeigten, dass sich jede glykosylierungsmutierte Prionprotein-Mutante in ihre Proteinase K-resistente Isoform umfalten ließ, sollte eine Infektion in vivo simuliert werden. Bei einer Infektion mit Scrapie muss das infektiöse Agens zunächst in die Zelle eindringen und liegt nicht schon wie bei ScN2a-Zellen in der Zelle vor. Zu diesem Zweck wurden N2a-Zellen, die Erkennungssequenz-mutiertes PrP exprimierten, mit Hirnhomogenat der Scrapiestämme Chandler, Me7 und 79A überschichtet.

Nur in N2a-Zellen, die exogenes Prionprotein stark auf der Zelloberfläche präsentierten, konnte unter diesen Versuchsbedingungen Proteinase K-resistentes, exogenes Prionprotein nachgewiesen werden. Je nach Versuchsansatz entstanden Wt3F4-, T182N-, T198A- oder T182N/T198A-PrP^{res}. Eine Konversion der Mutanten T182A und T182A/T198A konnte nicht nachgewiesen werden. Demnach war unter diesen Versuchsbedingungen eine starke Zelloberflächenexpression des zu konvertierenden PrP^{sen}-Moleküls die Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion der Zellen. Die vorliegenden Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Korth et al. (Korth, Kaneko, et al. 2000): In vergleichbaren Infektionsexperimenten gelang es nicht, die Mutante T182A/T198A zu konvertieren, während die stark auf der Oberfläche nachweisbare PrP-Mutante N180Q/N196Q umgefaltet wurde. Dies wirft die Frage auf, welche Rolle die Oberflächenexpression von PrP^{sen} unter den gewählten Versuchsbedingungen bei einer Infektion von „ausen“ spielt. Theoretisch gibt es zwei Erklärungsansätze: entweder dient das Prionprotein auf der Zelloberfläche als Rezeptor für die PrP^{res}-Aufnahme, oder die Konversion findet direkt auf der Zellmembran statt. Gegen eine Konversion direkt auf der Zellmembran sprechen je-

doch die Versuche in ScN2a-Zellen. Zum einen ist in diesem System eine starke Oberflächenexpression nicht die Voraussetzung für eine Umfaltung und zum anderen konnte in ScN2a-Zellen PrP^{res} bislang nur intrazellulär nachgewiesen werden. Die Rezeptorfunktion des exogenen PrP^{sen} würde jedoch die angeführten Experimente erklären. Exogenes PrP^{sen} bindet PrP^{res}, wird internalisiert und anschließend umgefaltet. Beim Vergleich dieses Infektionsversuchs mit den Versuchen in ScN2a-Zellen fällt auf, dass sich die Mutante T182N/T198A trotz ihrer erwiesenen schlechten Konvertierbarkeit in ihre Proteinase K-resistente Isoform umfalten ließ. Nimmt man die Überzahl an Maus-PrP^{res} als Voraussetzung für die Konversion dieser Mutante, so kann die Umfaltung nach Inokulation ebenfalls mit einem mengenmäßigen Überangebot von PrP^{res} begründet werden. Aufgrund der fehlenden Glykosylierung könnten mehrere PrP^{res}-Moleküle an den PrP^{sen}-Rezeptor binden, in die Zelle aufgenommen werden und so zur Umfaltung führen. Die anscheinende Diskrepanz für das Umfaltungsverhalten der Mutante T182N/T198A wäre damit aufgehoben. Da endogenes Maus-PrP^{sen} den Genotyp a/a besitzt (108L; 189T) und exogenes Maus-PrP^{sen} aufgrund des 3F4-Epitops einen a/a-ähnlichen (108M/189T) Genotyp, wurden für die „Inokulation“ der Zellen Scrapiestämme des a/a-Genotyps verwendet. Während der Stamm Me7 vor allem die monoglykosylierte Form von PrP^{res} exprimiert, dominiert bei den Stämmen Chandler und 79A vor allem die diglykosylierte Form. Unter den gewählten Versuchsbedingungen führte nur die Infektion mit dem Stamm Me7 zu einer detektierbaren Konversion exogener, 3F4 getaggtter PrP^{sen}-Moleküle. Da kein Unterschied bezüglich der Umfaltung für die verschiedenen Glykosylierungsmutanten (T182N, T198A und T182N/T198A) festgestellt werden konnte, ist dieser Effekt wahrscheinlich nicht mit dem Glykotyp der Inokula zu begründen. Versuche mit Maus-Prionprotein exprimierenden oder überexprimierenden N2a-Zellen zeigten, dass diese Zellen mit den Stämmen 79A (Vorberg 1999), Chandler, RML (Vorberg 1999); (Nishida, Harris, et al. 2000), (Bosque & Prusiner 2000), 139A (Nishida, Harris, et al. 2000) und 22L (Nishida, Harris, et al. 2000) infizierbar waren. Eine Inokulation mit Me7 gelang jedoch nicht (Vorberg 1999); (Bosque & Prusiner 2000). Demnach scheint der Stamm Me7 eine erhöhte Affinität für Prionprotein mit dem 3F4-Tag zu besitzen. Da eine Konversion mit Me7 in N2a-Zellen prinzipiell möglich ist, müssen also alle für die Konversion notwendigen Faktoren in der Zelle vorhanden sein. Das Fehlen eines Me7 spezifischen Chaperons in N2a-

Zellen kann demnach nicht die Ursache für die "Immunität" dieser nicht-transfizierten oder mit murinem PrP transfizierten N2a-Zellen sein. Die Inokulation von Wildtyp 3F4 exprimierenden N2a-Zellen mit Me7 führte in der vorliegenden Arbeit zu Proteinase K-resistentem 3F4 getagtem PrP^{res}, dessen Glykopprofil im Gegensatz zur deutlich detektierbaren mono- und unglykosylierten, nur eine schwache zweifachglykosylierte Bande aufwies. Dieser Effekt kann entweder direkt auf die Eigenschaft des vor allem einfachglykosylierten Me7 Stammes zurückgeführt werden, oder darauf, dass zweifachglykosyliertes Prionprotein schwerer konvertierbar ist. Die letztere Erklärung kann als wahrscheinlicher gelten, da die Abnahme an PrP^{res} in ScN2a-Zellen sich im Westernblot zunächst in einem Verlust der diglykosylierten Bande äussert (eigene Beobachtungen). Dies würde für die These sprechen, dass die Glykosylierung vor einer Konversion schützen kann (Petersen, Parchi, et al. 1996; Capellari, Zaidi, et al. 1999).

Die 3F4-markierte, unglykosylierte Mutante N180Q/N196Q von Korth et al. (Korth, Kaneko, et al. 2000) war mit Me7 und im Gegensatz zu Wildtyp 3F4 mit den von Chandler abstammenden Stämmen RML und 301V unter vergleichbaren Versuchsbedingungen unfaltbar. Theoretisch könnte dieser Effekt in der fehlenden Glykosylierung begründet sein oder in der Struktur der Polypeptidkette. Da die hier vorgestellte unglykosylierte Mutante T182N/T198A lediglich mit dem Stamm Me7 infizierbar war, war das von Korth et al. beobachtete Phänomen wahrscheinlich nicht Folge der fehlenden Glykosylierung, sondern in der Struktur des Proteins begründet.

5.2 Transgenes Tiermodell

Nach der Charakterisierung von Erkennungssequenz-mutiertem Prionprotein in Zellkultur wurden transgene Mäuse hergestellt, die PrP^{sen}-T182N, -T198A bzw. -T182N/T198A exprimierten. Da diese Prionprotein-Mutanten auf der Zelloberfläche nachweisbar und nach Infektion der Zellen unfaltbar waren, versprachen sie eine Infizierbarkeit und damit Verbesserung im Vergleich zu den von DeArmond et al. (DeArmond, Sanchez, et al. 1997) generierten Erkennungssequenz-Mutanten T182A und T182A/T198A.

5.2.1 Überprüfung der Expression von Erkennungssequenz-mutiertem PrP unter der Kontrolle des Prionprotein-Promotors in Zellkultur

Zur Herstellung der transgenen Mäuse wurden die Konstrukte in den Vektor phgPrP (Fischer, Rulicke, et al. 1996) kloniert, in dem diese unter Kontrolle des prioneigenen Promotors stehen. Um die Expressionsfähigkeit dieser Plasmide zu überprüfen, wurden N2a-Zellen mit den zuvor erwähnten Konstrukten transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden anschliessend im Westernblot und in der FACS-Analyse auf ihre Expressionsfähigkeit und Oberflächenpräsentation der PrP-Mutanten untersucht. Untersuchte Subklone der Mutante T182N wurden auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Jede Mutante konnte im Westernblot detektiert werden. Demnach war der Prionprotein-Promotor geeignet, um PrP^{sen} in Zellkultur zu exprimieren. Die mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1Zeo(+), der den ORF unter die Kontrolle des CMV-Promotors stellt, erhaltenen Ergebnisse konnten bestätigt werden.

5.2.2 Untersuchung der transgenen Mäuse

Mikroinjektion Da Inokulationsversuche an transgenen Mäusen zeigten, dass das künstlich eingeführte, spezie fremde Genom zu Wechselwirkungen mit endogenem murinem PrP führt (Telling, Scott, et al. 1995), die sich in unterschiedlichen Inkubationszeiten widerspiegeln, wurde in der vorliegenden Arbeit die DNA in Embryonen von PrP-Mäusen injiziert, welche kein PrP exprimieren (Bueler, Fischer, et al. 1992).

Insgesamt wurden 1267 Embryonen mikroinjiziert und in Ammentiere transferiert. 246 Nachkommen wurden geboren. Damit überlebten insgesamt 19.4% der mikroinjizierten Embryonen die Manipulation. Für die einzelnen Konstrukte wurden folgende Überlebensraten ermittelt: T182N 20.9%; T198A 22.2%; T182N/T198A 15.9%. Die Ursache für die relativ geringe Überlebensrate der T182N/T198A-Embryonen blieb unklar. Da jedoch in der Literatur eine Überlebensrate zwischen 5-24% bei der Herstellung transgener Mäuse als Normbereich angegeben wird (Waller & Murphy 1995), wurde auf eine weitere Untersuchung verzichtet. Die Qualität der Mikroinjektionsdurchführung durch Dr. Reifenberg kann demnach als sehr gut bewertet werden, besonders unter dem Aspekt, dass die Manipulation von PrP-Mäusen als schwer durchführbar gilt (persönliche Auskunft Dr.

Reifenberg).

Mittels einer Standard-PCR-Reaktion nach Bueler et al. (Bueler, Fischer, et al. 1992) konnten von den 246 Nachkommen 77 bezüglich des Transgens positive Foundertiere ermittelt werden, was einem prozentualen Anteil von 31.3% entspricht. Für die einzelnen Konstrukte ergaben sich folgende Erfolgsraten: T182N 27.5%; T198A 34.3%; T182N/T198A 33.8%. In der Literatur werden Erfolgsraten im Normbereich zwischen 20-40% genannt. Deshalb liegt dieses Ergebnis der Mikroinjektion im oberen Normbereich.

Zucht Die 77 Foundertiere wurden dann mit PrP-Tieren verpaart. Sieben Tiere ließen sich nicht verpaaren. Entweder starben die Mäuse kurz nach dem Ansetzen stressbedingt, oder es gab keine Nachkommen. Aus zehn Verpaarungen gingen keine positiven Foundertiere hervor. Diese Mäuse waren demnach Mosaiktiere, bei denen die DNA-Integration nicht im Einzell- sondern in einem späteren Entwicklungsstadium erfolgte, so dass die Tiere die DNA nicht in allen Körperzellen trugen. So konnte die Transgen-DNA zwar in Gewebeproben, wie dem Schwanzspitzen-Bioptat, nachgewiesen werden, obwohl dieses Gen nicht in die Zellen der Keimbahn integriert worden war (Waller & Murphy 1995).

Bei der Weitervererbung des Transgens konnten Vererbungsraten zwischen 25-75% ermittelt werden. Dies kann in der Häufigkeit und Lokalisation des DNA-Einbaus begründet sein. Trägt nur eine Chromatide die Fremd-DNA, so ist nur ein Viertel der Nachkommen positiv bezüglich des Transgens. Tragen zwei Chromatiden die Fremd-DNA, kann die Hälfte der Nachkommen positiv sein und theoretisch könnten zwei verschiedene Mauslinien gezüchtet werden. Sind drei oder vier Chromatiden Transgen-Träger, so ist mit 75% bzw. 100% positiver Nachkommen zu rechnen und drei bzw. vier Linien könnten jeweils weitergezüchtet werden. In der vorliegenden Arbeit trugen die meisten Foundertiere das Gen auf einer Chromatide. So konnte auf eine weitere „Selektion“ auf „Unterlinien“ verzichtet werden.

Nachdem Zellkulturversuche ergaben, dass die Prionprotein-Mutante T182N/T198A einen dominant-negativen Effekt bei Konversionsexperimenten in ScN2a-Zellen zeigte und sich damit hemmend auf die Akkumulation von endogenem PrP^{res} auswirkte, sollte dieses

Phänomen auch in vivo untersucht werden. Dazu wurden transgene Tiere mit Wildtypmäusen verpaart. Die Tiere wurden anschließend mit Scrapiestämmen inokuliert. Durch diesen Versuch soll geklärt werden, ob die Anwesenheit dieser Mutante in Wildtypmäusen vor einer Scrapie-Infektion schützen kann. Dies würde sich in einer verlängerten Inkubationszeit widerspiegeln. Da jedoch allein schon das Einführen von heterologem PrP eine Veränderung der Inkubationszeit verursachen kann, wurden als Kontrolle auch die entsprechenden monoglykosylierten Mäuse mit Wildtypmäusen verpaart und inokuliert. Da die Inkubationszeit direkt proportional zur PrP^{sen}-Expression ist, sollten als weitere Kontrollen für dieses Experiment auch Wildtypmäuse, die mit PrP-Mäusen verpaart wurden, mitgeführt werden. Diese wären dann wie die eingesetzten transgenen Versuchstiere bezüglich Wildtyp-Prnp haploid.

Prnp-Kopienzahlen Zur Ermittlung der Kopienzahl wurden verschiedene Mengen an genomischer DNA in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Dazu wurden jeweils die gleichen Mengen an Transgen-DNA und Wildtypmaus-DNA eingesetzt. Da bekannt war, dass homozygote Wildtypmäuse zwei Kopien des PrP-Gens besitzen, konnte durch den Vergleich der jeweiligen Amplifikatmengen die Kopienzahl des Transgens abgeschätzt werden. Dabei wurden Kopienzahlen zwischen 2 und 200 ermittelt. Zu beachten ist jedoch, dass diese Untersuchungen an für das Transgen heterozygoten Tieren durchgeführt wurden und anschließend mit Prnp-homozygoten Wildtypmäusen verglichen wurde. Demnach wäre die Kopienzahl für homozygote Transgene doppelt so hoch.

PrP^{sen}-Expression Die Gehirne PCR-positiver Nachkommen wurden auf ihre PrP^{sen}-Expression hin untersucht. Von 77 Mauslinien konnte bei 54 PrP^{sen} im Gehirn nachgewiesen werden. Ein direkter Zusammenhang zwischen Kopienzahl und PrP-Expression wurde dabei nicht beobachtet. Dies erklärt sich dadurch, dass sich bei Integration mehrerer Kopien das Transgen meist an einem Integrationsort und meistens hintereinander in einer sogenannten "head-to-tail" Orientierung anordnet (Waller & Murphy 1995). Erfolgte der Einbau an einem Ort des Genoms, wo regulatorische Elemente die Transgenexpression negativ beeinflussen (niedrige Transkriptionsfrequenz), so kann die Expression trotz hoher Kopienzahl relativ gering sein.

Zur Bestimmung der Expressionsrate wurde 10%iges Hirnhomogenat bezüglich des Transgens heterozygoter Tiere im SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot analysiert. Der Vergleich zu Prnp-homozygoten Wildtypmäusen ergab Expressionsraten zwischen $< 0,5-4 \times$ Wildtyp-PrP^{sen}. Während die PrP-monoglykosylierten Mäuse bis zu vierfache Überexpressionsraten zeigten, lag die Expression bei den PrP-unglykosylierten Mäuse zwischen ein- bis zweifach im Vergleich zu Wildtypmäusen.

Ein Vergleich der Expressionslevel der hier vorgestellten Mäuse mit den von DeArmond et al. (DeArmond, Sanchez, et al. 1997) beschriebenen war nur für die Mutante T198A möglich, für die diese eine im Vergleich zu Hamster zwei- bis vierfache Überexpression ermittelten und als ausreichend bezeichneten. Für Mäuse mit PrP-T182A und T182A/T198A entsprechenden Mutationen gab er aufgrund der geringen Expressionslevel keine Zahlen an. Demnach kann geschlossen werden, dass die im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit generierten transgenen Mäuse höhere Transgen-PrP^{sen}-Expressionsraten besaßen, was durch die erhöhte Stabilität der PrP^{sen}-Mutanten begründet sein kann.

Zur weiteren Charakterisierung der Mauslinien wurden verschiedene Organe (Herz, Milz, Leber, Skelettmuskel und Niere) auf PrP^{sen}-Expression mittels Westernblot untersucht. Transgenes Prionprotein konnte in Herz, Skelettmuskel, Milz und in einem Fall auch in Niere und Leber nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurden Wildtypmäuse und PrP^{sen}-überexprimierende tg20-Mäuse untersucht. Während bei Wildtypmäusen mit der hier durchgeführten Methode keine Expression in diesen Organen nachgewiesen werden konnte, war bei tg20-Mäusen PrP^{sen} in Herz, Skelettmuskel und Milz detektierbar. Die nicht-detektierbare PrP-Organexpression der Wildtypmaus lag wahrscheinlich in der Nachweisgrenze des gewählten Systems. Unsere Versuche ergaben, dass der hier zur Detektion von Maus-Prionprotein verwendete mAk6H4 weniger sensitiv ist als der zum Screening der transgenen Tiere verwendete Antikörper mAk3F4.

Die im Vergleich zu tg20-Mäusen geringe PrP^{sen}-Expression in Organen der hier untersuchten transgenen Tiere kann nicht auf den zur Mikroinjektion verwendeten Vektor phgPrP zurückgeführt werden, da dieser auch die Basis für die Generierung der tg20-Mäuse war. Als Begründung könnte zum einen angeführt werden, dass die hier vorgestellten Untersuchungen an für das Transgen heterozygoten Tieren durchgeführt wurden, während die tg20-Mäuse homozygot sind. Zum anderen könnte der Einbau der mutierten

PrP-Gene an Stellen des Genoms erfolgt sein, die in den entsprechenden Organen herunterreguliert sind. Gegen diese Theorie spricht jedoch, dass es unwahrscheinlich ist, dass bei über 20 untersuchten Mauslinien immer der Einbau „organungünstig“ erfolgt sein soll. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Stabilität der glykosylierungsmutierten PrP-Moleküle stärker von der exprimierenden Zelle abhängt und damit vom Organ. In Zellkultur durchgeführte Versuche ergaben aber keine zelllinienabhängigen Unterschiede in der PrP-Prozessierung.

Beim Vergleich der Glykosylierungsmuster der glykosylierungsmutierten Mäuse fiel erneut auf, dass bei den PrP-monoglykosylierten Mäusen sowohl die un- als auch die monoglykosylierte Bande zu sehen war. Im weiteren waren die Zuckerseitenketten der T182N-Mutante heterogener und stellten sich im Westernblot bei einem höheren Molekulargewicht als die der T198A-Mutante dar. Somit spiegeln diese beiden Glykosylierungsmutanten auch in vivo die mit Wildtyp vergleichbaren jeweiligen Oligosaccharidstrukturen wider (Stimson, Hope, et al. 1999).

Inokulation und Ausblick Bei der Scrapie-Erkrankung können verschiedene Stämme unterschieden werden (Seite 25). Im Rahmen der Protein-Only-Theorie stellt sich die Frage, wie eine Polypeptdikette zu verschiedenen Stammphänotypen führen kann. Grundsätzlich gibt es zwei Erklärungsansätze: die „Targeting-Theorie“ und die „Konformations-Hypothese“.

Um die Rolle der Glykosylierung in der Pathogenese der Scrapie-Erkrankung zu klären, wurden die hier vorgestellten transgenen Mäuse mit drei verschiedenen, sich im Glykosylierungsmuster unterscheidenden TSE-Stämme Chandler, Me7 und BSE inokuliert. Diese Infektionsversuche waren beim Zusammenstellen der hier vorgestellten Arbeiten noch nicht beendet. Nach einer Erkrankung der Mäuse sollen deren Gehirne dann histologisch auf Läsionsprofile und PrP^{res}-Ablagerung und biochemisch auf das Glykopprofil von PrP^{res} im Westernblot untersucht werden. Infektiöse Hirnhomogenate dieser Mäuse sollen anschließend in für die Stammcharakterisierung etablierten Mausinzuchtstämmen passagiert werden. Bei der histologischen und biochemischen Untersuchung kann untersucht werden, ob die stammcharakteristischen Eigenschaften auch nach Passage in glykosylierungsmutierten Tieren erhalten bleiben oder nicht. Falls diese Mäuse infizierbar sind,

leisten sie so eine wichtige Grundvoraussetzung zur Erforschung der Kausalität der Existenz von Prion-Stämmen.

6 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung der Glykosylierung des Prionproteins für die Pathogenese der Scrapie-Erkrankung zu untersuchen.

Obwohl nach dem derzeitigen Wissensstand ein fehlgefaltetes Protein (PrP^{Sc}) die Krankheit verursacht, können bei der Scrapie-Erkrankung verschiedene Stämme unterschieden werden (Seite 25). Zuckerseitenketten des Prionproteins werden als eine mögliche Ursache dieser Stammvielfalt diskutiert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb verschiedene transgene Mäuse hergestellt werden, die un- bzw. monoglykosyliertes Mausprionprotein exprimieren. Frühere Arbeiten (Rogers et al. 1990; Lehmann & Harris 1997) zeigten, dass die Deletion der ersten Erkennungssequenz für N-Glykosylierung durch den Austausch von Threonin zu Alanin an Kodon 182 des Maus-Prionproteins zu einer gestörten PrP^{sen} -Synthese mit behinderter Oberflächenexpression führt. Ebenso waren transgene Mäuse mit dieser Mutation resistent gegenüber einer Scrapie-Infektion mit zwei verschiedenen Stämmen (DeArmond et al. 1997). Die Zerstörung der zweiten Glykosylierungsstelle beeinträchtigte indes weder Trafficking noch die grundsätzliche Scrapie-Infizierbarkeit. Da es in der Literatur Hinweise gab, dass PrP^{sen} auf der Zelloberfläche exprimiert werden muss, damit PrP^{res} Zellen infizieren kann (Caughey and Raymond, 1991; Borchelt, Taraboulos, et al. 1992; Taraboulos, Scott, et al. 1995; Kaneko, Vey, et al. 1997), stellte sich die Aufgabe transgene Tiere herzustellen, deren glykosylierungsmutiertes PrP möglichst authentisch prozessiert wird, um so eine wichtige Grundvoraussetzung für die Infizierbarkeit der Mäuse zu schaffen. Aus diesem Grund wurden verschiedene Erkennungssequenz-mutierte PrP-Moleküle in Zellkultur charakterisiert. Dazu wurden über 20 verschiedene PrP^{sen} -Mutanten kloniert, sequenziert und anschließend in verschiedenen Zelllinien mit immunologischen und biochemischen Methoden untersucht. Mittels Oberflächenbiotinylierung, Immunfluoreszenz, Endo H-Verdau und Durchflusszytometrie wurde die Zell-Topologie der PrP-Mutanten ermittelt. Im Westernblotverfahren in Verbindung mit PNGase F-Verdau wurde der Glykosylierungszustand der Moleküle untersucht. Die Verankerungsform der Moleküle wurde mittels PIPLC-Verdau, das Vorhandensein von Schwefelbrücken in einem weiteren proteinbiochemischen Verfahren untersucht. Über Ultrazentrifugation wurde die Löslichkeit

der Moleküle bestimmt.

Nach der Charakterisierung von PrP^{sen} wurden verschiedene ausgewählte Mutanten in scrapieinfizierten Zellen (ScN2a) auf Umfaltbarkeit in ihre Proteinase K-resistente Isoform (PrP^{res}) untersucht. Zu diesem Zweck wurden ScN2a Zellen mittels eines retroviralen Systems transduziert und Zellhomogenate direkt bzw. nach Proteinase K-Verdau und Ultrazentrifugation im Westernblot untersucht. Dabei zeigte sich, dass prinzipiell jede der sechs untersuchten Mutanten (Wt3F4, T182A, T182N, T198A, T182A/T198A, T182N/T198A) konvertierbar war. Die unglykosylierte Mutante T182N/T198A zeigte jedoch einen dominant-negativen Effekt, d.h. eine Umfaltung war nur möglich, wenn dieses Konstrukt in geringen Mengen in der Zelle exprimiert wurde. In Anwesenheit von vielen mutierten PrP^{sen}-Molekülen konnte keine Konversion dieser Mutante detektiert werden, während gleichzeitig die nachweisbare Menge an endogenem Maus-PrP^{res} abnahm. Dieser Effekt wurde bis dato noch nicht im Zusammenhang mit Mutationen in diesem Bereich des Prionproteins beschrieben.

Bei dem Versuch Maus-Neuroblastomzellen (N2a), welche mutiertes PrP^{sen} exprimieren, mit drei verschiedenen TSE-Stämmen (Me7, Chandler und 79A) zu infizieren, war nur der Stamm Me7 in der Lage 3F4-getaggtetes Prionprotein umzufalten. Unter den gewählten Versuchsbedingungen wurden nur die Mutanten umgefaltet, die vergleichbar mit Wildtyp 3F4 auf der Zelloberfläche detektiert werden konnten (T182N, T198A, T182N/T198A). Demnach bestätigte sich, dass für eine de novo Scrapie-Infektion einer Zelle das umzufaltende PrP^{sen}-Molekül in ausreichender Menge auf der Zelloberfläche vorhanden sein muss.

PrP-Mutanten (T182N, T198A, T182N/T198A) mit wildtypähnlichem Verhalten wurden anschließend zur Herstellung transgener Mäuse verwendet. Zu diesem Zweck wurden PrP⁰-Mäuse, welche kein Prionprotein besitzen, mit dem jeweiligen Konstrukt mikroinjiziert. Das Genom der Nachkommen wurde mittels verschiedener PCR-Reaktionen auf das Vorliegen und die Kopienzahl eingebauter, transgener DNA untersucht. Die Prionprotein-Expression wurde sowohl qualitativ als auch quantitativ analysiert. Diese Mäuse überexprimierten bis zu vierfach im Vergleich zur Wildtypmaus Maus-Prionprotein und stellen so eine Infizierbarkeit versprechende Verbesserung der bisher von DeArmond et al. (DeArmond et al., 1997) publizierten Mäuse T182A, T182A/T198A dar, die bei geringer

PrP^{sen}-Expressionsrate nicht mit Scrapie infizierbar waren. In Infektionsexperimenten kann nun mittels der hier vorgestellten Mäuse ermittelt werden, wie Prionproteine in der Lage sind, allein auf der Basis einer Polypeptidkette Stammeigenschaften zu vermitteln.

7 Summary

The aim of this work was to elucidate the role of the glycosylation of the prion protein for the pathogenesis of the scrapie disease.

The infectious agent of this disease is postulated to be only one misfolded protein (PrP^{Sc}). Therefore, it is an intriguing question, how one protein can encipher different scrapie strains. In this context oligosaccharide-chains are discussed as a possible reason for this variety of strains. Therefore, a set of different transgenic mice was generated, which of them express mono- or diglycosylated prion protein. Earlier work (Rogers et al. 1990; Lehmann & Harris 1997) showed that the deletion of the first consensus-site for N-glycosylation leads to an aberrant synthesis of PrP^{sen} characterized by missing surface expression. This was achieved by the substitution of threonine by alanine at codon 182. Transgenic mice carrying this mutation were resistant to scrapie infection with two different scrapie strains (DeArmond et al. 1997). On the other hand, the deletion of the second glycosylation site did neither change the trafficking of the prion protein nor the fundamental susceptibility. There was evidence in literature, that the surface expression of PrP^{sen} is preponderance for a de novo scrapie infection of cells (Caughey and Raymond, 1991; Borchelt, Taraboulos, et al. 1992; Taraboulos, Scott, et al. 1995; Kaneko, Vey, et al. 1997). Therefore, the aim was to generate transgenic mice, which express surface expressed glycosylation mutants of PrP.

The first step was to generate 20 different glycosylation mutants. All mutants were verified by sequencing, expressed in different cell-lines, and investigated by immunological and biochemical methods. Thereafter, the topology of PrP-mutants in the cell was determined by surface-biotinylation, immunocytochemical staining, digestion by Endo H and FACS-analysis. The state of glycosylation was validated by PNGaseF-digestion and westernblotting. The attachment of PrP to the cell membrane was elucidated by PIPLC-release. Last, the solubility of the mutant proteins was defined by ultracentrifugation and the existence of S-S-bridges was elucidated by biochemical methods.

After the characterization of PrP^{sen}, particular mutants were selected and investigated for their convertibility into the proteinase K-resistant isoform (PrP^{res}). For this purpose, scrapie infected cells (ScN2a-cells) were transduced using a retroviral system and cell

homogenates were treated with proteinase K, ultracentrifugated, and analyzed by western blotting. It became apparent that all of the investigated mutants (Wt3F4, T182A, T182N, T198A, T182A/T198A, T182N/T198A) were convertible. However, the unglycosylated mutant T182N/T198A showed a dominant-negative inhibition. In other words, conversion was only possible if this construct was expressed in small amounts. In the presence of many mutated proteins no conversion was found and the detectable amount of endogenous mouse-PrP was reduced. This effect has never been described before in context with mutations in this region of the protein.

The next step was to challenge Maus-Neuroblastoma cells (N2a), which express mutated PrP^{sen}, with three different scrapie strains (Me7, Chandler and 79A). Only the challenge by scrapie strain Me7 lead to conversion of 3F4-tagged prion protein. At the chosen experimental conditions only mutants were convertible, which showed wildtype-like surface expression in tissue culture (T182N, T198A, T182N/T198A). Therefore, it was demonstrated that for a de novo infection of cells the target protein (PrP^{sen}) must be present on the cell surface in sufficient amount.

PrP-mutants (T182N, T198A, T182N/T198A) with wildtype-like behavior were used for the generation of transgenic mice. For this reason, PrP⁰-mice, missing any PrP, were microinjected with the corresponding construct. The genome of the offspring was screened by different PCR-reactions and analyzed for the existence and the copy-number of the transgene. The protein expression was analyzed in a qualitative and quantitative manner. The transgenic mice overexpressed prion protein of up to four times as much as the wildtype-mice and promise therefore to be infectible. This result represents an improvement to the earlier published work by DeArmond et al. (T182A, T182A/T198A), whose mice showed low expression rates and low susceptibility to scrapie infection (DeArmond et al., 1997).

In addition, further infection experiments with the presented transgenic mice could help to clarify the principle how prion proteins are capable to encipher strain variety on the basis of only one single polypeptide chain.

Literatur

- [1] Aizawa, S. I., F. Vonderviszt, R. Ishima, and K. Akasaka. Termini of Salmonella flagellin are disordered and become organized upon polymerization into flagellar filament. *Journal of Molecular Biology* 211: 673-677, 1990.
- [2] Ali, B. R. and M. C. Field. Glycopeptide export from mammalian microsomes is independent of calcium and is distinct from oligosaccharide export. *Glycobiology* 10: 383-391, 2000.
- [3] Alper, T., D. A. Haig, and M. C. Clarke. The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochemical & Biophysical Research Communication* 22: 278-284, 1966.
- [4] Alper, T., W. A. Cramp, D. A. Haig, and M. C. Clarke. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*. 214: 764-766, 1967.
- [5] Alpers, M. P. *Epidemiology and clinical aspects of kuru*. Academic Press, New York 451-465, 1987.
- [6] Anderson, R. M., C. A. Donnelly, N. M. Ferguson, M. E. Woolhouse, C. J. Watt, H. J. Udy, S. MaWhinney, S. P. Dunstan, T. R. Southwood, J. W. Wilesmith, J. B. Ryan, L. J. Hoinville, J. E. Hillerton, A. R. Austin, and G. A. Wells. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature*. 382: 779-788, 1996.
- [7] Andrews, A. H., R. Laven, and J. G. Matthews. Clinical observations on four cases of scrapie in goats. *Veterinary Record* 130: 101-101, 1992.
- [8] Asakura, S. Reconstitution of Salmonella flagella. *Seikagaku* 38: 797-807, 1966.
- [9] Asakura, S., G. Eguchi, and T. Iino. Salmonella flagella: in vitro reconstruction and over-all shapes of flagellar filaments. *Journal of Molecular Biology* 16: 302-316, 1966.
- [10] Baker, H. F., R. M. Ridley, L. W. Duchon, T. J. Crow, and C. J. Bruton. Evidence for the experimental transmission of cerebral beta- amyloidosis to primates. *International Journal of Experimental Pathology* 74: 441-454, 1993.

- [11] Beck, E., P. M. Daniel, Davey A., and D. C. Gajdusek. A comparison between the neuropathological changes in kuru and scrapie, a system degeneration. In Luthi F and Bischoff A, eds. Proceedings of the Fifth International Congress of Neuropathology. Amsterdam, Excerpta Medica. 1966, 213-218.
- [12] Beekes, M., E. Baldauf, and H. Diringer. Pathogenesis of scrapie in hamsters after oral and intraperitoneal infection. In Court, L. and B. Dodet, eds. Transmissible subacute spongiform encephalopathies: prion diseases. Paris, Elsevier. 1996a, 143-150.
- [13] Beekes, M., E. Baldauf, and H. Diringer. Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *Journal of General Virology* 77: 1925-1934, 1996b.
- [14] Beekes, M., P. A. McBride, and E. Baldauf. Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *Journal of General Virology* 79: 601-607, 1998.
- [15] Bell, J. E. and J. W. Ironside. How to tackle a possible Creutzfeldt-Jakob disease necropsy. *Journal of Clinical Pathology* 46: 193-197, 1993.
- [16] Bellinger-Kawahara, C., J. E. Cleaver, T. O. Diener, and S. B. Prusiner. Purified scrapie prions resist inactivation by UV irradiation. *Journal of Virology* 61: 159-166, 1987.
- [17] Bellinger-Kawahara, C., T. O. Diener, M. P. McKinley, D. F. Groth, D. R. Smith, and S. B. Prusiner. Purified scrapie prions resist inactivation by procedures that hydrolyze, modify, or shear nucleic acids. *Virology* 160: 271-274, 1987.
- [18] Bessen, R. A., D. A. Kocisko, G. J. Raymond, S. Nandan, P. T. Lansbury, and B. Caughey. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* 375: 698-700, 1995.
- [19] Bessen, R. A. and R. F. Marsh. Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *Journal of Virology* 66: 2096-2101, 1992.

- [20] Bessen, R. A. and R. F. Marsh. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *Journal of Virology* 68: 7859-7868, 1994.
- [21] Bestwick, R. K., S. L. Kozak, and D. Kabat. Overcoming interference to retroviral superinfection results in amplified expression and transmission of cloned genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 85: 5404-5408, 1988.
- [22] Betmouni, S., V. H. Perry, and J. L. Gordon. Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. *Neuroscience* 74: 1-5, 1996.
- [23] Blattler, T., S. Brandner, A. J. Raeber, M. A. Klein, T. Voigtlander, C. Weissmann, and A. Aguzzi. PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* 389: 69-73, 1997.
- [24] Bodemer, W. The use of monoclonal antibodies in human prion disease. *Naturwissenschaften* 86: 212-220, 1999.
- [25] Bolton, D. C., M. P. McKinley, and S. B. Prusiner. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218: 1309-1311, 1982.
- [26] Borchelt, D. R., M. Rogers, N. Stahl, G. Telling, and S. B. Prusiner. Release of the cellular prion protein from cultured cells after loss of its glycoinositol phospholipid anchor. *Glycobiology* 3: 319-329, 1993.
- [27] Borchelt, D. R., M. Scott, A. Taraboulos, N. Stahl, and S. B. Prusiner. Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *Journal of Cell Biology* 110: 743-752, 1990.
- [28] Borchelt, D. R., A. Taraboulos, and S. B. Prusiner. Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *Journal of Biological Chemistry* 267: 16188-16199, 1992.
- [29] Bosque, P. J. and S. B. Prusiner. Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection. *Journal of Virology* 74: 4377-4386, 2000.

- [30] Bradley, R. The research programme on transmissible spongiform encephalopathies in Britain with special reference to bovine spongiform encephalopathy. *Developments in Biological Standardization* 80: 157-170, 1993.
- [31] Bradley, R. Experimental transmission of bovine spongiform encephalopathy. In Court, L. and B. Dodet, eds. *Transmissible subacute spongiform encephalopathies: prion diseases*. Paris, Elsevier. 1996, 51-56.
- [32] Brandner, S., S. Isenmann, A. Raeber, M. Fischer, A. Sailer, Y. Kobayashi, S. Marino, C. Weissmann, and A. Aguzzi. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379: 339-343, 1996.
- [33] Brandner, S., A. Raeber, A. Sailer, T. Blattler, M. Fischer, C. Weissmann, and A. Aguzzi. Normal host prion protein (PrP^C) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 13148-13151, 1996.
- [34] Bratberg, B., K. Ueland, and G. A. Wells. Feline spongiform encephalopathy in a cat in Norway. *Veterinary Record* 136: 444, 1995.
- [35] Brockes, J. P. Topics in prion cell biology. *Current Opinion in Neurobiology* 9: 571-577, 1999.
- [36] Brown, D. R., K. Qin, J. W. Herms, A. Madlung, J. Manson, R. Strome, P. E. Fraser, T. Kruck, A. von Bohlen, W. Schulz-Schaeffer, A. Giese, D. Westaway, and H. Kretzschmar. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390: 684-687, 1997.
- [37] Brown, D. R., J. W. Herms, Schmidt B. and H. Kretzschmar. PrP and beta-amyloid fragments activate different neurotoxic mechanisms in cultured mouse cells. *European Journal of Neuroscience* 9:1162-1169, 1997.
- [38] Brown, K. L., K. Stewart, M. E. Bruce, and H. Fraser. Scrapie in immunodeficient mice. *Biochemical Society Transactions* 25: 173, 1997.

- [39] Brown, P. Human growth hormone therapy and Creutzfeldt-Jakob disease: a drama in three acts. *Pediatrics* 81: 85-92, 1988.
- [40] Brown, P. and D. C. Gajdusek. Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet* 337: 269-270, 1991.
- [41] Brown, P., J. Hooks, R. Roos, D. C. Gajdusek, and C. J. Gibbs, Jr. Attempt to identify the agent for Creutzfeldt-Jakob disease by CF antibody relationship to known viruses. *Nature -New Biology* 235: 149-152, 1972.
- [42] Brown, P., P. P. Liberski, A. Wolff, and D. C. Gajdusek. Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360 degrees C: practical and theoretical implications. *Journal of Infectious Diseases* 161: 467-472, 1990.
- [43] Brown, P., E. H. Rau, B. K. Johnson, A. E. Bacote, C. J. Gibbs, Jr., and D. C. Gajdusek. New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent: threshold survival after ashing at 600 degrees C suggests an inorganic template of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97: 3418-3421, 2000.
- [44] Brown, P., R. G. Rohwer, and D. C. Gajdusek. Newer data on the inactivation of scrapie virus or Creutzfeldt- Jakob disease virus in brain tissue. *Journal of Infectious Diseases* 153: 1145-1148, 1986.
- [45] Bruce, M. E. Scrapie strain variation and mutation. *British Medical Bulletin* 49: 822-838, 1993.
- [46] Bruce, M. E. Strain Typing Studies of Scrapie and BSE. In Baker, H. F. and R. M. Ridley, eds. *Prion Diseases*. Totowa, New Jersey, Humana Press Inc. 1996, 223-236.
- [47] Bruce, M. E., K. L. Brown, N. A. Mabbott, C. F. Farquhar, and M. Jeffrey. Follicular dendritic cells in TSE pathogenesis. *Immunology Today* 21: 442-446, 2000.
- [48] Bruce, M. E. and Fraser, H. Scrapie strain variation and its implications. Springer-Verlag, Berlin, 1991, 125-138.

- [49] Bruce, M. E., R. G. Will, J. W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttie, L. McCardle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, S. Cousens, H. Fraser, and C. J. Bostock. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389: 498-501, 1997.
- [50] Bueler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R. A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet, and C. Weissmann. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73: 1339-1347, 1993.
- [51] Bueler, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H. P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet, and C. Weissmann. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356: 577-582, 1992.
- [52] D. A. Butler, M. R. Scott, J. M. Bockman, D. R. Borchelt, A. Taraboulos, K. K. Hsiao, D. T. Kingsbury, and S. B. Prusiner. Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *Journal of Virology* 62: 1558-1564, 1988.
- [53] Campbell, I. L., M. Eddleston, P. Kemper, M. B. Oldstone, and M. V. Hobbs. Activation of cerebral cytokine gene expression and its correlation with onset of reactive astrocyte and acute-phase response gene expression in scrapie. *Journal of Virology* 68: 2383-2387, 1994.
- [54] Capellari, S., S. I. Zaidi, C. B. Urig, G. Perry, M. A. Smith, and R. B. Petersen. Prion protein glycosylation is sensitive to redox change. *Journal of Biological Chemistry* 274: 34846-34850, 1999.
- [55] Carp, R. I., S. M. Callahan, E. A. Sersen, and R. C. Moretz. Preclinical changes in weight of scrapie-infected mice as a function of scrapie agent-mouse strain combination. *Intervirology* 21: 61-69, 1984.
- [56] Caughey, B. In vitro expression and biosynthesis of prion protein. *Current Topics in Microbiology Biochemical & Biophysical Research Communication* 172: 93-107, 1991.

- [57] Caughey, B. and G. J. Raymond. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *Journal of Biological Chemistry* 266: 18217-18223, 1991.
- [58] Caughey, B. Scrapie associated PrP accumulation and its prevention: insights from cell culture. *British Medical Bulletin* 49: 860-872, 1993.
- [59] Caughey, B., G. J. Raymond, and R. A. Bessen. Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *Journal of Biological Chemistry* 273: 32230-32235, 1998.
- [60] Caughey, B., G. J. Raymond, S. A. Priola, D. A. Kocisko, R. E. Race, R. A. Bessen, P. T. Lansbury, Jr., and B. Chesebro. Methods for studying prion protein (PrP) metabolism and the formation of protease-resistant PrP in cell culture and cell-free systems. An update. *Molecular Biotechnology* 13: 45-55, 1999.
- [61] Chandler, R. L. Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie-brain material. *Lancet* 1, 1378-1379. 1961.
- [62] Colling, S. B., J. Collinge, and J. G. Jefferys. Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K⁺ currents. *Neuroscience Letters* 209: 49-52, 1996.
- [63] Colling, S. B., M. Khana, J. Collinge, and J. G. Jefferys. Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. *Brain Research* 755: 28-35, 1997.
- [64] Collinge, J., M. A. Whittington, K. C. Sidle, C. J. Smith, M. S. Palmer, A. R. Clarke, and J. G. Jefferys. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370: 295-297, 1994.
- [65] Collinge, J., M. S. Palmer, K. C. Sidle, A. F. Hill, I. Gowland, J. Meads, E. Asante, R. Bradley, L. J. Doey, and P. L. Lantos. Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature* 378: 779-783, 1995.
- [66] Collinge, J., J. Beck, T. Campbell, K. Estibeiro, and R. G. Will. Prion protein gene analysis in new variant cases of Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 348: 56-56, 1996.

- [67] Collinge, J., K. C. Sidle, J. Meads, J. Ironside, and A. F. Hill. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383: 685-690, 1996.
- [68] Collinge, J., A. F. Hill, K. C. L. Sidle, and J. Ironside. Typing prion isoforms. *Nature* 386: 232-234, 1997.
- [69] Creutzfeldt, H. G. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z. Gesam. Neurol. Psychiatr.* 57, 1-18. 1920.
- [70] Cuillé, J. and P. L. Chelle. La tremblante du mouton est bien inoculable. *C. r. hebdomadaire des seances de l'Académie des Sciences (Paris)* 206, 78-79. 1936.
- [71] Cuillé, J. and P. L. Chelle. Experimental transmission of trembling to the goat. *C. r. hebdomadaire des seances de l'Académie des Sciences (Paris)* 208: 1058-1060, 1939.
- [72] Dawson, M., G. A. Wells, and B. N. Parker. Preliminary evidence of the experimental transmissibility of bovine spongiform encephalopathy to cattle. *Veterinary Record* 126: 112-113, 1990a.
- [73] Dawson, M., G. A. Wells, B. N. Parker, and A. C. Scott. Primary parenteral transmission of bovine spongiform encephalopathy to the pig. *Veterinary Record* 127: 338-338, 1990b.
- [74] Dawson, M., G. A. H. Wells, B. N. J. Parker, and A. C. Scott. Transmission studies of BSE in cattle, hamsters, pigs and domestic fowl. In Bradley, R., M. Savey, and B. Marchant, eds. *Sub-Acute Spongiform Encephalopathies*. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers. 1991, 25-32.
- [75] Dawson, M., G. A. H. Wells, B. N. J. Parker, M. E. Francis, A. C. Scott, S. A. C. Hawkins, T. C. Martin, M. M. Simmons, and A. R. Austin. Transmission studies of BSE in cattle, pigs and domestic fowl. In Bradley, R. and B. Marchant, eds. *Transmissible spongiform encephalopathies*. Brussels, European Commission Agriculture. 1993, 161-168.

- [76] DeArmond, S. J., H. Sanchez, F. Yehiely, Y. Qiu, A. Ninchak-Casey, V. Daggett, A. P. Camerino, J. Cayetano, M. Rogers, D. Groth, M. Torchia, P. Tremblay, M. R. Scott, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. Selective neuronal targeting in prion disease. *Neuron* 19: 1337-1348, 1997.
- [77] DeArmond, S. J., Y. Qiu, H. Sanchez, P. R. Spilman, A. Ninchak-Casey, D. Alonso, and V. Daggett. PrP^C glycoform heterogeneity as a function of brain region: implications for selective targeting of neurons by prion strains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58: 1000-1009, 1999.
- [78] Demart S., J. G. Fournier, C. Creminon, Y. Frobert, F. Lamoury, D. Marce, C. Lasmezas, D. Dormont, J. Grassi, and J. P. Deslys. New insight into abnormal prion protein using monoclonal antibodies. *Biochemical & Biophysical Research Community* 265 (3): 652-657, 1999.
- [79] Dickinson, A. G. and Fraser, H. Scrapie pathogenesis in inbred mice: an assessment of host control and response involving many strains of agent. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York , 1977, 3-14.
- [80] Dickinson, A. G. and V. M. Meikle. A comparison of some biological characteristics of the mouse-passaged scrapie agents, 22A and ME7. *Genetical Research.* 13: 213-225, 1969.
- [81] Dickinson, A. G., J. T. Stamp, and C. C. Renwick. Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *Journal of Comparative Pathology* 84: 19-25, 1974.
- [82] Dickinson, A. G. and D. M. Taylor. Resistance of scrapie agent to decontamination. *New England Journal of Medicine* 299: 1413-1414, 1978.
- [83] Dickinson, A. G. and G. W. Outram. Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Foundation Symposium* 135: 63-83, 1988.
- [84] Diedrich, J. F., P. E. Bendheim, Y. S. Kim, R. I. Carp, and A. T. Haase. Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88: 375-379, 1991.

- [85] Diener, T. O., M. P. McKinley, and S. B. Prusiner. Viroids and prions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 79: 5220-5224, 1982.
- [86] Diringer, H., H. R. Braig, and M. Czub. Scrapie: a virus-induced amyloidosis of the brain. Ciba Foundation Symposium 135: 135-145, 1988.
- [87] Diringer, H., M. Beekes, and U. Oberdieck. The nature of the scrapie agent: the virus theory. Annual NY Academy of Science. 724, 246-258. 1994.
- [88] Donne, D. G., J. H. Viles, D. Groth, I. Mehlhorn, T. L. James, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, P. E. Wright, and H. J. Dyson. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N-terminus is highly flexible. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 94: 13452-13457, 1997.
- [89] Duffy, P., J. Wolf, G. Collins, A. G. DeVoe, B. Streeten, and D. Cowen. Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt- Jakob disease. New England Journal of Medicine 290: 692-693, 1974.
- [90] Eggens, I., B. Fenderson, T. Toyokuni, B. Dean, M. Stroud, and S. Hakomori. Specific interaction between Lex and Lex determinants. A possible basis for cell recognition in preimplantation embryos and in embryonal carcinoma cells. Journal of Biological Chemistry 264: 9476-9484, 1989.
- [91] Endo, T., D. Groth, S. B. Prusiner, and A. Kobata. Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. Biochemistry 28: 8380-8388, 1989.
- [92] Ernst, D. R. and R. E. Race. Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods. Journal of Virological Methods 41: 193-201, 1993.
- [93] Fiedler, K. and K. Simons. The role of N-glycans in the secretory pathway. Cell 81: 309-312, 1995.
- [94] Fischer, M., T. Rulicke, A. Raeber, A. Sailer, M. Moser, B. Oesch, S. Brandner, A. Aguzzi, and C. Weissmann. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions

- restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *The EMBO Journal* 15: 1255-1264, 1996.
- [95] Foote, W. C., W. Clark, A. Maciulis, J. W. Call, J. Hourrigan, R. C. Evans, M. R. Marshall, and M. de Camp. Prevention of scrapie transmission in sheep, using embryo transfer. *American Journal of Veterinary Research*. 54: 1863-1868, 1993.
- [96] Forloni, G., N. Angeretti, R. Chiesa, E. Monzani, M. Salmona, O. Bugiani, and F. Tagliavini. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362: 543-546, 1993.
- [97] Forloni, G. Neurotoxicity of beta-amyloid and prion peptides. *Current Opinion in Neurology* 9: 492-500, 1996.
- [98] Foster, J. D., W. A. McKelvey, M. J. Mylne, A. Williams, N. Hunter, J. Hope, and H. Fraser. Studies on maternal transmission of scrapie in sheep by embryo transfer. *Veterinary Record* 130: 341-343, 1992.
- [99] Foster, J. D., J. Hope, and H. Fraser. Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Veterinary Record* 133: 339-341, 1993.
- [100] Foster, J. D., N. Hunter, A. Williams, M. J. Mylne, W. A. McKelvey, J. Hope, H. Fraser, and C. Bostock. Observations on the transmission of scrapie in experiments using embryo transfer. *Veterinary Record* 138: 559-562, 1996.
- [101] Fraser, H. and A. G. Dickinson. Studies of the lymphoreticular system in the pathogenesis of scrapie: the role of spleen and thymus. *Journal of Comparative Pathology* 88: 563-573, 1978.
- [102] Fraser, H., I. McConnell, G. A. Wells, and M. Dawson. Transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice. *Veterinary Record* 123: 472-472, 1988.
- [103] Fraser, H. and J. D. Foster. Transmission to mice, sheep and goats and bioassay of bovine tissues. In Bradley, R. and B. Marchant, eds. *Transmissible spongiform encephalopathies*. Brussels, European Commission Agriculture 1993, 145-160.
- [104] Fukushima, Y., Y. Oka, T. Saitoh, H. Katagiri, T. Asano, N. Matsushashi, K. Takata, E. van Breda, Y. Yazaki, and K. Sugano. Structural and functional analysis of the

- canine histamine H2 receptor by site-directed mutagenesis: N-glycosylation is not vital for its action. *Biochemical Journal* 310 (Pt 2): 553-558, 1995.
- [105] Gajdusek, D. C. and V. Zigas. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. The endemic occurrence of „kuru” in the native population. *New England Journal of Medicine* 257: 947-948, 1957.
- [106] Gajdusek, C. D. Kuru in childhood: implications for the problem of whether bovine spongiform encephalopathy affects humans. In Court, L. and B. Dodet, eds. *Transmissible subacute spongiform encephalopathies: prion diseases*. 1996, 15-28.
- [107] Galili, U., M. R. Clark, S. B. Shoheit, J. Buehler, and B. A. Macher. Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1—3Gal epitope in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 84: 1369-1373, 1987.
- [108] Gambetti, P., R. Petersen, L. Monari, M. Tabaton, L. Autilio-Gambetti, P. Cortelli, P. Montagna, and E. Lugaresi. Fatal familial insomnia and the widening spectrum of prion diseases. *British Medical Bulletin* 49: 980-994, 1993.
- [109] Garcia, R. C., D. R. Cundell, E. I. Tuomanen, L. F. Kolakowski, Jr., C. Gerard, and N. P. Gerard. The role of N-glycosylation for functional expression of the human platelet-activating factor receptor. Glycosylation is required for efficient membrane trafficking. *Journal of Biological Chemistry* 270: 25178-25184, 1995.
- [110] Gerstmann, J., E. Sträussler, and J. Scheinker. Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z. Neurol.* 1936 154: 736-762, 1936.
- [111] Gibbs, C. J., Jr., D. C. Gajdusek, D. M. Asher, M. P. Alpers, E. Beck, P. M. Daniel, and W. B. Matthews. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161: 388-389, 1968.
- [112] Giese, A., M. H. Groschup, B. Hess, and H. A. Kretzschmar. Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathology* 5: 213-221, 1995.

- [113] Glatzel, M. and A. Aguzzi. PrP^C expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *Journal of General Virology* 81: 2813-2821, 2000.
- [114] Gorodinsky, A. and D. A. Harris. Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent- resistant complexes without caveolin. *Journal of Cell Biology* 129: 619-627, 1995.
- [115] Greig, J. R. Scrapie in sheep. *Journal of Comparative Pathology* 60, 263-266. 1950.
- [116] Griffith, J. S. Self-replication and scrapie. *Nature* 215: 1043-1044, 1967.
- [117] Groschup M. H. and E. Pfaff. Studies on a species-specific epitope in murine, ovine and bovine prion protein. *Journal of General Virology* 74: 1451-1456, 1993.
- [118] Groschup M. H., S. Harmeyer, and E. Pfaff. Antigenic features of prion proteins of sheep and of other mammalian species. *Journal of Immunological Methods* 207: 89-101, 1997.
- [119] Hakomori, S. Le(X) and related structures as adhesion molecules. *Histochemical Journal* 24: 771-776, 1992.
- [120] Hanson, R. P., R. J. Eckroade, R. F. Marsh, G. M. Zu Rhein, C. L. Kanitz, and D. P. Gustafson. Susceptibility of mink to sheep scrapie. *Science* 172: 859-861, 1971.
- [121] Haraguchi, T., S. Fisher, S. Olofsson, T. Endo, D. Groth, A. Tarentino, D. R. Borchelt, D. Teplow, L. Hood and A. Burlingame Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Archives of biochemistry and biophysics* 274: 1-13, 1989.
- [122] Hecker, R., A. Taraboulos, M. Scott, K. M. Pan, S. L. Yang, M. Torchia, K. Jendroska, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. Replication of distinct scrapie prion isolates is region specific in brains of transgenic mice and hamsters. *Genes & Development* 6: 1213-1228, 1992.

- [123] Hegde, R. S., J. A. Mastrianni, M. R. Scott, K. A. DeFea, P. Tremblay, M. Torchia, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and V. R. Lingappa. A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* 279: 827-834, 1998.
- [124] Hegde, R. S., P. Tremblay, D. Groth, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and V. R. Lingappa. Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature* 402: 822-826, 1999.
- [125] Helenius, A. How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 5: 253-265, 1994.
- [126] Herms, J. W., H. A. Kretzschmar, S. Titz, and B. U. Keller. Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar purkinje cells of prion protein knockout mice. *European Journal of Neuroscience* 7: 2508-2512, 1995.
- [127] Herrmann, L. M. and B. Caughey. The importance of the disulfide bond in prion protein conversion. *Neuroreport* 9: 2457-2461, 1998.
- [128] Hill, A. F., M. Desbruslais, S. Joiner, K. C. Sidle, I. Gowland, J. Collinge, L. J. Doey, and P. Lantos. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389: 448-450, 1997.
- [129] Hill, A. F., M. Zeidler, J. Ironside, and J. Collinge. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 349: 99-100, 1997.
- [130] Hill, A. F., M. Antoniou, and J. Collinge. Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *Journal of General Virology* 80: 11-14, 1999.
- [131] Hill, A., S. Joiner, M. Desbruslais, P. L. Lantos, J. Collinge, and Linehan J. Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97: 2000.
- [132] Hirsch, C. and H. L. Ploegh. Intracellular targeting of the proteasome. *Trends in Cell Biology* 10: 268-272, 2000.

- [133] R. N. Hogan, K. A. Bowman, J. R. Baringer, and S. B. Prusiner. Replication of scrapie prions in hamster eyes precedes retinal degeneration. *Ophthalmic Research*. 18 (4): 230-235, 1986.
- [134] Holscher, C., H. Delius, and A. Burkle. Overexpression of nonconvertible PrP^C delta114-121 in scrapie- infected mouse neuroblastoma cells leads to trans-dominant inhibition of wild-type PrP^{Sc} accumulation. *Journal of Virology* 72: 1153-1159, 1998.
- [135] Horiuchi, M., S. A. Priola, J. Chabry, and B. Caughey. Interactions between heterologous forms of prion protein: binding, inhibition of conversion, and species barriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97: 5836-5841, 2000.
- [136] Hunter, N. Natural transmission and genetic control of susceptibility of sheep to scrapie. *Current Topics in Microbiology & Immunology* 172: 165-180, 1991.
- [137] Inoue, S., M. Tanaka, M. Horiuchi, N. Ishiguro, and M. Shinagawa. Characterization of the bovine prion protein gene: the expression requires interaction between the promoter and intron. *Journal of Veterinary Medical Science* 59: 175-183, 1997.
- [138] Ironside, J. W. and J. E. Bell. Florid plaques and new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 350: 1475-1475, 1997.
- [139] Jakob, A. Über die eigenartige Erkrankung des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunden (spastische Pseudosklerose-Encephalomyopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Deutsche Zeitung für Nervenheilkunde* 70: 132, 1921.
- [140] Jakob, A. Über eine der multiplen Sklerose klinisch nahestehende Erkrankung des Zentralnervensystems (spastische Pseudosklerose) mit bemerkenswerten anatomischen Befunden: Mitteilung eines vierten Falls. *Med. Klin.* 17: 372, 1921.
- [141] Jarrett, J. T. and P. T. Lansbury, Jr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73: 1055-1058, 1993.

- [142] Jeffrey, M., G. McGovern, C. M. Goodsir, K. L. Brown, and M. E. Bruce. Sites of prion protein accumulation in scrapie-infected mouse spleen revealed by immunoelectron microscopy. *Journal of Pathology* 191: 323-332, 2000.
- [143] Kaaden, O. R., U. Truyen, M. H. Groschup, A. Uysal, E. Kaiser, H. Kretzschmar, T. Bogumil, J. Pohlenz, H. Diringer, P. Steinhagen, and et al. Bovine spongiform encephalopathy in Germany. *Zentralblatt für Veterinärmedizin-Reihe B* 41: 294-304, 1994.
- [144] Kaneko, K., M. Vey, M. Scott, S. Pilkuhn, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94: 2333-2338, 1997.
- [145] Kaneko, K., L. Zulianello, M. Scott, C. M. Cooper, A. C. Wallace, T. L. James, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94: 10069-10074, 1997.
- [146] Kanyo, Z. F., K. M. Pan, R. A. Williamson, D. R. Burton, S. B. Prusiner, R. J. Fletterick, and F. E. Cohen. Antibody binding defines a structure for an epitope that participates in the PrP^C → PrP^{Sc} conformational change. *Journal of Molecular Biology* 293: 855-863, 1999.
- [147] R. J. Kascsak, R. Rubenstein, P. A. Merz, M. Tonna-DeMasi, R. Fersko, R. I. Carp, H. M. Wisniewski, and H. Diringer. Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *Journal of Virology* 61 (12): 3688-3693, 1987.
- [148] Kellings, K., S. B. Prusiner, and D. Riesner. Nucleic acids in prion preparations: unspecific background or essential component? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.- Series B: Biological Sciences.* 343: 425-430, 1994.
- [149] Kimberlin, R. H., C. A. Walker, and G. C. Millson. Letter: Interspecies transmission of scrapie-like diseases. *Lancet* 2: 1309-1310, 1975.

- [150] Kimberlin, R. H. and C. A. Walker. Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *Journal of General Virology* 39: 487-496, 1978.
- [151] Kimberlin, R. H. and C. A. Walker. Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for neural spread of infection to the CNS. *Journal of General Virology* 51: 183-187, 1980.
- [152] Kimberlin, R. H., S. M. Hall, and C. A. Walker. Pathogenesis of mouse scrapie. Evidence for direct neural spread of infection to the CNS after injection of sciatic nerve. *Journal of the Neurological Sciences* 61: 315-325, 1983.
- [153] Kimberlin, R. H., C. A. Walker, G. C. Millson, D. M. Taylor, P. A. Robertson, A. H. Tomlinson, and A. G. Dickinson. Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrapie agent. Guidelines for Creutzfeldt-Jakob and related agents. *Journal of the Neurological Sciences* 59: 355-369, 1983.
- [154] Kimberlin, R. H. and C. A. Walker. Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *Journal of General Virology* 67: 255-263, 1986.
- [155] Kimberlin, R. H. and C. A. Walker. The role of the spleen in the neuroinvasion of scrapie in mice. *Virus Research*. 12: 201-211, 1989.
- [156] Kirkwood, J. K., G. A. Wells, A. A. Cunningham, S. I. Jackson, A. C. Scott, M. Dawson, and J. W. Wilesmith. Scrapie-like encephalopathy in a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*) which had not been fed ruminant-derived protein. *Veterinary Record* 130: 365-367, 1992.
- [157] Kitamoto, T., T. Muramoto, S. Mohri, K. Doh-ura, and J. Tateishi. Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of Virology* 65: 6292-6295, 1991.
- [158] Klatzo, I., D. C. Gajdusek, and V. Zigas. Pathology of kuru. *Lab. Invest.* 8: 799-847, 1959.

- [159] Klein, M. A., R. Frigg, E. Flechsig, A. J. Raeber, U. Kalinke, H. Bluethmann, F. Bootz, M. Suter, R. M. Zinkernagel, and A. Aguzzi. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 390: 687-690, 1997.
- [160] Kocisko, D. A., J. H. Come, S. A. Priola, B. Chesebro, G. J. Raymond, P. T. Lansbury, and B. Caughey. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370: 471-474, 1994.
- [161] Korth C., B. Stierli, P. Streit, M. Moser, O. Schaller, R. Fischer, W. Schulz-Schaeffer, H. Kretzschmar, A. Raeber, U. Braun, F. Ehrensperger, S. Hornemann, R. Glockshuber, R. Riek, M. Billeter, K. Wuthrich, and B. Oesch. Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* 390: 74-77, 1997.
- [162] Korth, C., K. Kaneko, and S. B. Prusiner. Expression of unglycosylated mutated prion protein facilitates PrP^{Sc} formation in neuroblastoma cells infected with different prion strains. *Journal of General Virology* 2555-2563, 2000.
- [163] Kozak, S. L. and D. Kabat. Ping-pong amplification of a retroviral vector achieves high-level gene expression: human growth hormone production. *Journal of Virology* 64: 3500-3508, 1990.
- [164] Kristensson, K., B. Feuerstein, A. Taraboulos, W. C. Hyun, S. B. Prusiner, and S. J. DeArmond. Scrapie prions alter receptor-mediated calcium responses in cultured cells. *Neurology* 43: 2335-2341, 1993.
- [165] Kuczius, T., I. Haist, and M. H. Groschup. Molecular analysis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie strain variation. *Journal of Infectious Diseases* 178: 693-699, 1998.
- [166] Kuwahara, C., A. M. Takeuchi, T. Nishimura, K. Haraguchi, A. Kubosaki, Y. Matsumoto, K. Saeki, Y. Matsumoto, T. Yokoyama, S. Itohara, and T. Onodera. Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400: 225-226, 1999.
- [167] Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.

- [168] Lasmezas, C. I., J. Y. Cesbron, J. P. Deslys, R. Demaimay, K. T. Adjou, R. Rioux, C. Lemaire, C. Locht, and D. Dormont. Immune system-dependent and -independent replication of the scrapie agent. *Journal of Virology* 70: 1292-1295, 1996.
- [169] Lasmezas, C. I., J. P. Deslys, R. Demaimay, K. T. Adjou, F. Lamoury, D. Dormont, O. Robain, J. Ironside, and J. J. Hauw. BSE transmission to macaques. *Nature* 381: 743-744, 1996.
- [170] Lee, I. Y., D. Westaway, A. F. Smit, K. Wang, J. Seto, L. Chen, C. Acharya, M. Ankener, D. Baskin, C. Cooper, H. Yao, S. B. Prusiner, and L. E. Hood. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Research* 8: 1022-1037, 1998.
- [171] Lehmann, S. and D. A. Harris. Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells. *Journal of Biological Chemistry* 272: 21479-21487, 1997.
- [172] Li, L. and S. Lindquist. Creating a protein-based element of inheritance. *Science* 287: 661-664, 2000.
- [173] Liemann, S. and R. Glockshuber. Influence of amino acid substitutions related to inherited human prion diseases on the thermodynamic stability of the cellular prion protein. *Biochemistry* 38: 3258-3267, 1999.
- [174] Locht, C., B. Chesebro, R. Race, and J. M. Keith. Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 83: 6372-6376, 1986.
- [175] Lopez, G. F., R. Zahn, R. Riek, and K. Wuthrich. NMR structure of the bovine prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97: 8334-8339, 2000.
- [176] Lu, P., J. A. Sturman, and D. C. Bolton. Altered GABA distribution in hamster brain is an early molecular consequence of infection by scrapie prions. *Brain Research* 681: 235-241, 1995.

- [177] Lynch, C. M. and A. D. Miller. Production of high-titer helper virus-free retroviral vectors by cocultivation of packaging cells with different host ranges. *Journal of Virology* 65: 3887-3890, 1991.
- [178] Mann, R., R. C. Mulligan, and D. Baltimore. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 33: 153-159, 1983.
- [179] Manson, J. C., A. R. Clarke, M. L. Hooper, L. Aitchison, I. McConnell, and J. Hope. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Molecular Neurobiology* 8: 121-127, 1994.
- [180] Manuelidis, L., T. Sklaviadis, A. Akowitz, and W. Fritch. Viral particles are required for infection in neurodegenerative Creutzfeldt-Jakob disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 5124-5128, 1995.
- [181] Marsh, R. F. and R. H. Kimberlin. Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology, and pathogenesis. *Journal of Infectious Diseases* 131: 104-110, 1975.
- [182] Marsh, R. F. Risk assessment on the possible occurrence of bovine spongiform encephalopathy in the United States. In Bradley, R., M. Savey, and B. Marchant, eds. *Sub-Acute Spongiform Encephalopathies*. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers. 1991, 41-46.
- [183] Marsh, R. F. Transmissible mink encephalopathy. Abstracts of the conference on prion diseases in humans and animals, 2-4 September 1991, London.
- [184] Marsh, R. F., R. A. Bessen, S. Lehmann, and G. R. Hartsough. Epidemiological and experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy. *Journal of General Virology* 72: 589-594, 1991.
- [185] Mayer, T. U., T. Braun, and S. Jentsch. Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER- transmembrane protein. *The EMBO Journal* 17: 3251-3257, 1998.

- [186] McBride, P. A., P. Eikelenboom, G. Kraal, H. Fraser, and M. E. Bruce. PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice. *Journal of Pathology* 168: 413-418, 1992.
- [187] McFarlane, I., K. C. Breen, L. Di Giamberardino, and K. L. Moya. Inhibition of N-glycan processing alters axonal transport of synaptic glycoproteins in vivo. *Neuroreport* 11: 1543-1547, 2000.
- [188] McGowan, J. P. Scrapie in sheep. *J.Agric.* 5: 365-375, 1922.
- [189] McKinley, M. P., A. Taraboulos, L. Kenaga, D. Serban, A. Stieber, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and N. Gonatas. Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Laboratory Investigation* 65: 622-630, 1991.
- [190] Meyer, R. K., M. P. McKinley, K. A. Bowman, M. B. Braunfeld, R. A. Barry, and S. B. Prusiner. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 83: 2310-2314, 1986.
- [191] Middleton, D. J. and R. M. Barlow. Failure to transmit bovine spongiform encephalopathy to mice by feeding them with extraneural tissues of affected cattle. *Veterinary Record* 132: 545-547, 1993.
- [192] Miller, A. D. and C. Buttimore. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Molecular and Cellular Biology* 6: 2895-2902, 1986.
- [193] Miller, M. W., E. S. Williams, C. W. McCarty, T. R. Spraker, T. J. Kreeger, C. T. Larsen, and E. T. Thorne. Epizootiology of chronic wasting disease in free-ranging cervids in Colorado and Wyoming. *Journal of Wildlife Diseases* 36: 676-690, 2000.
- [194] Miura, T., A. Hori-i, and H. Takeuchi. Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein. *FEBS Letters*. 396: 248-252, 1996.

- [195] Moore, R. C., I. Y. Lee, G. L. Silverman, P. M. Harrison, R. Strome, C. Heinrich, A. Karunaratne, S. H. Pasternak, M. A. Chishti, Y. Liang, P. Mastrangelo, K. Wang, A. F. Smit, S. Katamine, G. A. Carlson, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, D. W. Melton, P. Tremblay, L. E. Hood, and D. Westaway. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *Journal of Molecular Biology* 292: 797-817, 1999.
- [196] Morgan, K. L., K. Nicholas, M. J. Glover, and A. P. Hall. A questionnaire survey of the prevalence of scrapie in sheep in Britain. *Veterinary Record* 127: 373-376, 1990.
- [197] Mouillet-Richard, S., M. Ermonval, C. Chebassier, J. L. Laplanche, S. Lehmann, J. M. Launay, and O. Kellermann. Signal transduction through prion protein. *Science* 289: 1925-1928, 2000.
- [198] Moya, K. L., N. Sales, R. Hassig, C. Creminon, J. Grassi, and L. Di Giamberardino. Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain. *Microsc. Res. Tech.* 50: 58-65, 2000.
- [199] Muramoto, T., M. Scott, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 15457-15462, 1996.
- [200] Narang, H. The nature of the scrapie agent: the virus theory. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine* 212: 208-224, 1996.
- [201] Nishida, N., D. A. Harris, D. Vilette, H. Laude, Y. Frobert, J. Grassi, D. Casanova, O. Milhavet, and S. Lehmann. Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. *Journal of Virology* 74: 320-325, 2000.
- [202] Nitrini, R., S. Rosemberg, M. R. Passos-Bueno, L. S. da Silva, P. Iughetti, M. Papadopoulos, P. M. Carrilho, P. Caramelli, S. Albrecht, M. Zatz, and A. LeBlanc. Familial spongiform encephalopathy associated with a novel prion protein gene mutation. *Annals of Neurology* 42: 138-146, 1997.

- [203] Oesch, B., D. Westaway, M. Walchli, M. P. McKinley, S. B. Kent, R. Aebersold, R. A. Barry, P. Tempst, D. B. Teplow, L. E. Hood, and et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40: 735-746, 1985.
- [204] Olivares, L., C. Aragon, C. Gimenez, and F. Zafra. The role of N-glycosylation in the targeting and activity of the GLYT1 glycine transporter. *Journal of Biological Chemistry* 270: 9437-9442, 1995.
- [205] Olmstedt JB et al. Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 65: 129-136, 1970.
- [206] Pan, K. M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, F. E. Cohen, and et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 10962-10966, 1993.
- [207] Parchi, P., S. Capellari, S. G. Chen, R. B. Petersen, P. Gambetti, N. Kopp, P. Brown, T. Kitamoto, J. Tateishi, A. Giese, and H. Kretzschmar. Typing prion isoforms. *Nature* 386: 232-234, 1997.
- [208] Parekh, R. B., R. A. Dwek, B. J. Sutton, D. L. Fernandes, A. Leung, D. Stanworth, T. W. Rademacher, T. Mizuochi, T. Taniguchi, K. Matsuta, and . Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* 316: 452-457, 1985.
- [209] Pattison, I. H. and Millson, G. C. Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *Journal of Comparative Pathology* 71: 101-108. 1961.
- [210] Pattison, I. H., M. N. Hoare, J. N. Jebbett, and W. A. Watson. Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Veterinary Record* 90: 465-468, 1972.

- [211] Pearson, G. R., T. J. Gruffydd-Jones, J. M. Wyatt, J. Hope, A. Chong, A. C. Scott, M. Dawson, and G. A. Wells. Feline spongiform encephalopathy. *Veterinary Record* 128: 532, 1991.
- [212] Petersen, R. B., P. Parchi, S. L. Richardson, C. B. Urig, and P. Gambetti. Effect of the D178N mutation and the codon 129 polymorphism on the metabolism of the prion protein. *Journal of Biological Chemistry* 271: 12661-12668, 1996.
- [213] Priola, S. A., B. Caughey, R. E. Race, and B. Chesebro. Heterologous PrP molecules interfere with accumulation of protease-resistant PrP in scrapie-infected murine neuroblastoma cells. *Journal of Virology* 68: 4873-4878, 1994.
- [214] Priola, S. A. and B. Chesebro. A single hamster PrP amino acid blocks conversion to protease-resistant PrP in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *Journal of Virology* 69: 7754-7758, 1995.
- [215] Priola, S. A. Prion protein and species barriers in the transmissible spongiform encephalopathies. *Biomed. Pharmacother.* 53: 27-33, 1999.
- [216] Prusiner, S. B., D. F. Groth, M. P. McKinley, S. P. Cochran, K. A. Bowman, and K. C. Kasper. Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 78: 4606-4610, 1981.
- [217] Prusiner, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136-144, 1982.
- [218] Prusiner, S. B., M. Scott, D. Foster, K. M. Pan, D. Groth, C. Mirenda, M. Torchia, S. L. Yang, D. Serban, G. A. Carlson, and et al. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 63: 673-686, 1990.
- [219] Prusiner, S. B. Molecular biology of prion diseases. *Science* 252: 1515-1522, 1991.
- [220] Prusiner, S. B., D. Groth, A. Serban, N. Stahl, and R. Gabizon. Attempts to restore scrapie prion infectivity after exposure to protein denaturants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 2793-2797, 1993.

- [221] Prusiner, S. B. Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 278: 245-251, 1997.
- [222] Prusiner, S. B. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 13363-13383, 1998.
- [223] Puck, T. et al. Genetics of somatic mammalian cells III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *Journal of Experimental Medicine* 108: 945-956, 1958.
- [224] R. E. Race, L. H. Fadness, and B. Chesebro. Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells. *Journal of General Virology* 68: 1391-1399, 1987.
- [225] Race, R., M. Oldstone, and B. Chesebro. Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *Journal of Virology* 74: 828-833, 2000.
- [226] Raeber, A. J., R. E. Race, S. Brandner, S. A. Priola, A. Sailer, R. A. Bessen, L. Mucke, J. Manson, A. Aguzzi, M. B. Oldstone, C. Weissmann, and B. Chesebro. Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie. *The EMBO Journal* 16: 6057-6065, 1997.
- [227] Raymond, G. J., J. Hope, D. A. Kocisko, S. A. Priola, L. D. Raymond, A. Bossers, J. Ironside, R. G. Will, S. G. Chen, R. B. Petersen, P. Gambetti, R. Rubenstein, M. A. Smits, P. T. Lansbury, Jr., and B. Caughey. Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature* 388: 285-288, 1997.
- [228] Raymond, G. J., A. Bossers, L.D. Raymond, K.I. O'Rourke, L.E. McHolland, P.K. Bryant 3rd, M.W. Miller, E.S. Williams, M. Smits, B. Caughey. Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease. *The EMBO Journal* 19: 4425-4430, 2000
- [229] Rieger, R., F. Edenhofer, C. I. Lasmezas, and S. Weiss. The human 37kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nature Medicine* 3: 1383-1388, 1997.

- [230] Rieger, R., C. I. Lasmezas, and S. Weiss. Role of the 37kDa laminin receptor precursor in the life cycle of prions. *Transfusion clinique et biologique* 6: 7-16, 1999.
- [231] Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, and K. Wuthrich. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* 382: 180-182, 1996.
- [232] Riesner, D., K. Kellings, K. Post, H. Wille, H. Serban, D. Groth, M. A. Baldwin, and S. B. Prusiner. Disruption of prion rods generates 10nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity. *Journal of Virology* 70: 1714-1722, 1996.
- [233] Roberts, C., N. Platt, A. Streit, M. Schachner, and C. D. Stern. The L5 epitope: an early marker for neural induction in the chick embryo and its involvement in inductive interactions. *Development* 112: 959-970, 1991.
- [234] Roberts, S. J., M. Petropavlovskaja, K. N. Chung, C. B. Knight, and P. C. Elwood. Role of individual N-linked glycosylation sites in the function and intracellular transport of the human alpha folate receptor. *Archives of biochemistry and biophysics* 351: 227-235, 1998.
- [235] Robertson, M. N., G. J. Spangrude, K. Hasenkrug, L. Perry, J. Nishio, K. Wehrly, and B. Chesebro. Role and Specificity of T-Cell Subsets in Spontaneous Recovery from Friend Virus-Induced Leukemia in Mice. *Journal of Virology* 66: 3271-3277, 1992.
- [236] Robinson, M. M., W. J. Hadlow, T. P. Huff, G. A. Wells, M. Dawson, R. F. Marsh, and J. R. Gorham. Experimental infection of mink with bovine spongiform encephalopathy. *Journal of General Virology* 75: 2151-2155, 1994.
- [237] Rogers, M., A. Taraboulos, M. Scott, D. Groth, and S. B. Prusiner. Intracellular accumulation of the cellular prion protein after mutagenesis of its Asn-linked glycosylation sites. *Glycobiology* 1: 101-109, 1990.

- [238] Rogers, M., F. Yehiely, M. Scott, and S. B. Prusiner. Conversion of truncated and elongated prion proteins into the scrapie isoform in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 3182-3186, 1993.
- [239] Rubenstein, R., H. Deng, C. L. Scalici, and M. C. Papini. Alterations in neurotransmitter-related enzyme activity in scrapie-infected PC12 cells. *Journal of General Virology* 72: 1279-1285, 1991.
- [240] Rudd, P. M., T. Endo, C. Colominas, D. Groth, S. F. Wheeler, D. J. Harvey, M. R. Wormald, H. Serban, S. B. Prusiner, A. Kobata, and R. A. Dwek. Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 13044-13049, 1999.
- [241] Safar, J., H. Wille, V. Itri, D. Groth, H. Serban, M. Torchia, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations. *Nature Medicine* 4: 1157-1165, 1998.
- [242] Sailer, A., H. Bueler, M. Fischer, A. Aguzzi, and C. Weissmann. No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* 77: 967-968, 1994.
- [243] Sakaguchi, S., S. Katamine, N. Nishida, R. Moriuchi, K. Shigematsu, T. Sugimoto, A. Nakatani, Y. Kataoka, T. Houtani, S. Shirabe, H. Okada, S. Hasegawa, T. Miyamoto, and T. Noda. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380: 528-531, 1996.
- [244] Santoso, A., P. Chien, L. Z. Osherovich, and J. S. Weissman. Molecular basis of a yeast prion species barrier. *Cell* 100: 277-288, 2000.
- [245] Sato, C., J. H. Kim, Y. Abe, K. Saito, S. Yokoyama, and D. Kohda. Characterization of the N-oligosaccharides attached to the atypical Asn-X-Cys sequence of recombinant human epidermal growth factor receptor. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 127: 65-72, 2000.
- [246] Schatzl, H. M., L. Laszlo, D. M. Holtzman, J. Tatzelt, S. J. DeArmond, R. I. Weiner, W. C. Mobley, and S. B. Prusiner. A hypothalamic neuronal cell line persistently

- infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *Journal of Virology* 71: 8821-8831, 1997.
- [247] Scott, M., D. Foster, C. Mirenda, D. Serban, F. Coufal, M. Walchli, M. Torchia, D. Groth, G. Carlson, S. J. DeArmond. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59: 847-857, 1989.
- [248] Scott, M. R., D. Groth, J. Tatzelt, M. Torchia, P. Tremblay, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. Propagation of prion strains through specific conformers of the prion protein. *Journal of Virology* 71: 9032-9044, 1997.
- [249] Scott, M. R., J. Safar, G. Telling, O. Nguyen, D. Groth, M. Torchia, R. Koehler, P. Tremblay, D. Walther, F. E. Cohen, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94: 14279-14284, 1997.
- [250] Shyng, S. L., M. T. Huber, and D. A. Harris. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 268: 15922-15928, 1993.
- [251] Shyng, S. L., J. E. Heuser, and D. A. Harris. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *Journal of Cell Biology* 125: 1239-1250, 1994.
- [252] Sigurdarson, S. Epidemiology of scrapie in Iceland and experience with control measures. In Bradley, R., M. Savey, and B. Marchant, eds. *Sub-Acute Spongiform Encephalopathies*. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers. 1991, 233-242.
- [253] Sigurdarson, S. Scrapie in Island. Symposium on Prion and Lentiviral Diseases IX Northern Lights Neuroscience Symposium in Reykjavik, Iceland (P41), 97. 20-8-1998.
- [254] Silverman, L., K. Qin, R. C. Moore, Y. Yang, P. Mastrangelo, P. Tremblay, S. B. Prusiner, F. E. Cohen, and D. Westaway. Doppel is an N-glycosylated GPI-anchored

- protein: expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp^{0/0} mice predisposed to Purkinje cell loss. *Journal of Biological Chemistry* 275: 26834-26841, 2000.
- [255] Somerville, R. A. and L. A. Ritchie. Differential glycosylation of the protein (PrP) forming scrapie-associated fibrils. *Journal of General Virology* 71: 833-839, 1990.
- [256] Somerville, R. A., A. Chong, O. U. Mulqueen, C. R. Birkett, S. C. Wood, and J. Hope. Biochemical typing of scrapie strains. *Nature* 386: 564-564, 1997.
- [257] Somerville, R. A. Host and transmissible spongiform encephalopathy agent strain control glycosylation of PrP. *Journal of General Virology* 80: 1865-1872, 1999.
- [258] Sondheimer, N. and S. Lindquist. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol. Cell* 5: 163-172, 2000.
- [259] Stahl, N., D. R. Borchelt, and S. B. Prusiner. Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase. *Biochemistry* 29: 5405-5412, 1990.
- [260] Stimson, E., J. Hope, A. Chong, and A. L. Burlingame. Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography, electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry* 38: 4885-4895, 1999.
- [261] Streit, A., C. D. Stern, C. Thery, G. W. Ireland, S. Aparicio, M. J. Sharpe, and E. Gherardi. A role for HGF/SF in neural induction and its expression in Hensen's node during gastrulation. *Development* 121: 813-824, 1995.
- [262] Taraboulos, A., M. Rogers, D. R. Borchelt, M. P. McKinley, M. Scott, D. Serban, and S. B. Prusiner. Acquisition of protease resistance by prion proteins in scrapie-infected cells does not require asparagine-linked glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87: 8262-8266, 1990.

- [263] Taraboulos, A., A. J. Raeber, D. R. Borchelt, D. Serban, and S. B. Prusiner. Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Molecular Biology of the Cell* 3: 851-863, 1992.
- [264] Taraboulos, A., M. Scott, A. Semenov, D. Avrahami and S. B. Prusiner Biosynthesis of the prion protein in scrapie-infected cells in culture. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27: 303-307, 1994.
- [265] Taraboulos, A., M. Scott, A. Semenov, D. Avrahami, L. Laszlo, S. B. Prusiner, and D. c. t. A. D. Avraham. Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *Journal of Cell Biology* 129: 121-132, 1995.
- [266] Tatzelt, J., J. Zuo, R. Voellmy, M. Scott, U. Hartl, S. B. Prusiner, and W. J. Welch. Scrapie prions selectively modify the stress response in neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 2944-2948, 1995.
- [267] Tatzelt, J., R. Voellmy, and W. J. Welch. Abnormalities in stress proteins in prion diseases. *Cell Mol. Neurobiol.* 18: 721-729, 1998.
- [268] Taylor, D. M., H. Fraser, I. McConnell, D. A. Brown, K. L. Brown, K. A. Lamza, and G. R. Smith. Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Archives of Virology* 139: 313-326, 1994.
- [269] Taylor, D. M. and S. L. Woodgate. Bovine spongiform encephalopathy: the causal role of ruminant- derived protein in cattle diets. *Revue Scientifique et Technique* 16: 187-198, 1997.
- [270] Taylor, D. M., K. Fernie, I. McConnell, C. E. Ferguson, and P. J. Steele. Solvent extraction as an adjunct to rendering: the effect on BSE and scrapie agents of hot solvents followed by dry heat and steam. *Veterinary Record* 143: 6-9, 1998.
- [271] Telling, G. C., M. Scott, J. Mastrianni, R. Gabizon, M. Torchia, F. E. Cohen, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83: 79-90, 1995.

- [272] Telling, G. C., T. Haga, M. Torchia, P. Tremblay, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice. *Genes & Development* 10: 1736-1750, 1996.
- [273] Telling, G. C., P. Parchi, S. J. DeArmond, P. Cortelli, P. Montagna, R. Gabizon, J. Mastrianni, E. Lugaresi, P. Gambetti, and S. B. Prusiner. Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274: 2079-2082, 1996.
- [274] Teufel, B. Expression und Charakterisierung von Insertionsmutanten des Prion-Proteins (PrP). Inaugural-Dissertation an der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2001
- [275] Tobler, I., S. E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rulicke, M. Moser, B. Oesch, P. A. McBride, and J. C. Manson. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380: 639-642, 1996.
- [276] Tobler, I., T. Deboer, and M. Fischer. Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *Journal of Neuroscience* 17: 1869-1879, 1997.
- [277] Vey, M., S. Pilkuhn, H. Wille, R. Nixon, S. J. DeArmond, E. J. Smart, R. G. Anderson, A. Taraboulos, and S. B. Prusiner. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 14945-14949, 1996.
- [278] Vorberg, I. Expressionsregulation des murinen Prionproteins und Konversion chimärer Prionproteine in permissiven neuronalen Zellen. Inaugural-Dissertation an der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1999.
- [279] Waller, S. J. H. M. Y. and D. Murphy. Production of transgenic rodents by microinjection of cloned DNA into fertilized one-cell eggs. In Glover, D. M. and Hames B.D., eds. *DNA cloning 4, Mammalian Systems*. 1995, 185-229.
- [280] Weissmann, C. and A. Aguzzi. Perspectives: neurobiology. PrP's double causes trouble. *Science* 286: 914-915, 1999.

- [281] Wells, G. A., A. C. Scott, C. T. Johnson, R. F. Gunning, R. D. Hancock, M. Jeffrey, M. Dawson, and R. Bradley. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Veterinary Record* 121: 419-420, 1987.
- [282] Wells, G. A., M. Dawson, S. A. Hawkins, R. B. Green, I. Dexter, M. E. Francis, M. M. Simmons, A. R. Austin, and M. W. Horigan. Infectivity in the ileum of cattle challenged orally with bovine spongiform encephalopathy. *Veterinary Record* 135: 40-41, 1994.
- [283] Wells, G. A., S. A. Hawkins, R. B. Green, A. R. Austin, I. Dexter, Y. I. Spencer, M. J. Chaplin, M. J. Stack, and M. Dawson. Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Veterinary Record* 142: 103-106, 1998.
- [284] Wickner, R. B. URE3 as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 264: 566-569, 1994.
- [285] Wilesmith, J. W., G. A. Wells, M. P. Cranwell, and J. B. Ryan. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Veterinary Record* 123: 638-644, 1988.
- [286] Wilesmith, J. W., J. B. Ryan, and M. J. Atkinson. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Veterinary Record* 128: 199-203, 1991.
- [287] Will, R. G. and W. B. Matthews. Evidence for case-to-case transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 45: 235-158, 1982.
- [288] Will, R. G., J. W. Ironside, B. Hornlimann, and M. Zeidler. Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 347: 65-66, 1996a.
- [289] Will, R. G., J. W. Ironside, M. Zeidler, S. N. Cousens, K. Estibeiro, A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari, A. Hofman, and P. G. Smith. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347: 921-925, 1996b.
- [290] Williams, E. S. and S. Young. Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *Journal of Wildlife Diseases* 16: 89-98, 1980.

- [291] Williams, A. E., L. J. Lawson, V. H. Perry, and H. Fraser. Characterization of the microglial response in murine scrapie. *Neuropathology & Applied Neurobiology* 20: 47-55, 1994.
- [292] Wood, J. L., I. S. McGill, S. H. Done, and R. Bradley. Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982- 1991. *Veterinary Record* 140: 167-174, 1997.
- [293] Wyatt, J. M., G. R. Pearson, T. N. Smerdon, T. J. Gruffydd-Jones, G. A. Wells, and J. W. Wilesmith. Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Veterinary Record* 129: 233-236, 1991.
- [294] Yanai, A., Z. Meiner, I. Gahali, R. Gabizon, and A. Taraboulos. Subcellular trafficking abnormalities of a prion protein with a disrupted disulfide loop. *FEBS Letter* 460: 11-16, 1999.
- [295] Young, A., N. Sumar, K. Bodman, S. Goyal, H. Sinclair, I. Roitt, and D. Isenberg. Agalactosyl IgG: an aid to differential diagnosis in early synovitis. *Arthritis Rheum.* 34: 1425-1429, 1991.
- [296] Zahn, R., A. Liu, T. Luhrs, R. Riek, C. von Schroetter, G. F. Lopez, M. Billeter, L. Calzolari, G. Wider, and K. Wuthrich. NMR solution structure of the human prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97: 145-150, 2000.
- [297] Zanusso, G., E. Nardelli, A. Rosati, G. Fabrizi, S. Ferrari, A. Carteri, F. De Simone, N. Rizzuto, and S. Monaco. Simultaneous occurrence of spongiform encephalopathy in a man and his cat in Italy. *Lancet* 352: 1116-1117, 1998.
- [298] Zeidler, M., E. C. Johnstone, R. W. Bamber, C. M. Dickens, C. J. Fisher, A. F. Francis, R. Goldbeck, R. Higgs, E. C. Johnson-Sabine, G. J. Lodge, P. McGarry, S. Mitchell, L. Tarlo, M. Turner, P. Ryley, and R. G. Will. New variant Creutzfeldt-Jakob disease: psychiatric features. *Lancet* 350: 908-910, 1997.
- [299] Zeidler, M., G. E. Stewart, C. R. Barraclough, D. E. Bateman, D. Bates, D. J. Burn, A. C. Colchester, W. Durward, N. A. Fletcher, S. A. Hawkins, J. M. Mackenzie,

and R. G. Will. New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests. *Lancet* 350: 903-907, 1997.

[300] Zlotnik, I. The histopathology of the brain stem of sheep affected with natural scrapie. *Journal of Comparative Pathology* 68: 148-166, 1958.

[301] Zulianello, L., K. Kaneko, M. Scott, S. Erpel, D. Han, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. Dominant-negative inhibition of prion formation diminished by deletion mutagenesis of the prion protein. *Journal of Virology* 74: 4351-4360, 2000.

Danke

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ganz besonders bedanke ich mich bei PD Dr. Martin H. Groschup für die Themenstellung, den Arbeitsplatz, die nette Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Dies gilt auch für PD Dr. Eberhard Pfaff, der die Arbeit mit seinen molekularbiologischen Ideen bereicherte.

Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel danke ich für die Vertretung der Arbeit am Fachbereich Tiermedizin der JLU-Gießen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Armin Saalmüller, der geduldig und äußerst professionell unzählige FACS-Analysen wider dem letzten Zweifel an seinem Apparat durchführte.

Dr. Kurt Reifenberg an der Universität Mainz dient mein Dank für die hervorragende Herstellung der transgenen Mäuse und die ständige professionelle Hilfsbereitschaft bei allen Fragen um die Zucht von Baby-, Papa- und hochschwangeren Mamamäusen.

Bedanken möchte ich mich bei der ganzen Arbeitsgruppe für lebhaftige Diskussion, Unterstützung und die täglichen Kichersalven, die die Arbeit erst so richtig schön machten: Andrea, Anne, Annett, Artur, Bertholdi, Christina, Dan, Frauke, Gritti, Harriet, Inella, Maria, Michi, dem „kleinen“ Martin, Roswitha, Sandra und Thorsten. Besonders bedanken möchte ich mich für die exzellente technische Hilfe von Roswitha Fischer und Annett Bünten, ohne die ich in Mäuseschwänzen und Zellen heillos ertrunken wäre. Tausend Dank für die zahllosen, wertvollen praktischen Tips rund ums Laborleben.

Dr. Ina Vorberg möchte ich für all die Tips und den Spaß im Labor und besonders darüber hinaus danken. Mit ihr und Dr. Harriet Mella hatte ich super Mitkämpferinnen im Feldzug gegen widerborstige ScN2a-Zellen, mystische Blots und hunderte von Zellflaschen.

Dr. Anne Buschmann danke ich für die aufbauende Begleitung meiner ersten mühseligen Schritte in die Welt der transgenen Mäuse.

Dr. Artur Weber und den Kleintierpflegern der BFAV (vor allem Herrn Wagner) möchte ich für die hervorragende Betreuung der Versuchstiere danken.

Und natürlich bedanke ich mich bei Herrn Kramer für die Hilfe beim Erstellen der Abbildungen.

Darüberhinaus Danke an alle restlichen Mitarbeiter der BFAV, die für den täglichen reibungslosen Ablauf und den speziellen Charm der Anstalt sorgten.

Meiner Familie und Freunden danke ich für die Unterstützung in Zeiten wissenschaftlichen Zweifels, ein Leben jenseits des Isolierbereiches und die schöne Zeit in Tübingen. Mein ganz besonderer Dank gilt Ralf Neuendorf ohne dessen unermüdlichen Zuspruch und tatkräftig-computertechnischen Beistand die Arbeit nicht mehr aus dem Schattenreich des Datenschrotts auferstanden wäre.