

Humorale und zelluläre Immunantwort gegen das Prion-Protein

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

vorgelegt von
Cindy Nitschke
aus Ueckermünde

Würzburg, 2006

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. J. Müller

Gutachter: Prof. Dr. U. Dittmer

Gutachter: PD. Dr. M. Kuhn

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Prionen-Erkrankungen.....	1
1.1.1	Die Prionhypothese und das Prion-Protein.....	3
1.1.2	Umwandlung von PrP ^C in PrP ^{Sc}	5
1.1.3	Therapeutische und prophylaktische Ansätze.....	7
1.2	Das Immunsystem.....	8
1.2.1	Zellvermittelte Immunantwort.....	9
1.2.2	Humorale Immunantwort.....	10
1.2.3	Toleranz.....	10
1.2.3.1	Zentrale Toleranz.....	10
1.2.3.2	Periphere Toleranz.....	11
1.2.4	Th1-/Th2-Antwort.....	12
1.3	Proteinimmunisierung.....	13
1.4	DNA-Immunisierung.....	14
1.4.1	DNA-Vakzine-Vektor.....	14
1.4.2	Strategien zum Toleranzbruch.....	15
1.4.3	Th1-/Th2-Polarisierung durch DNA-Immunisierung.....	16
1.5	Ziel der Arbeit.....	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Material.....	18
2.1.1	Material und Geräte.....	18
2.1.2	Chemikalien.....	20
2.1.3	Radiochemikalien.....	20
2.1.4	Enzyme.....	20
2.1.5	Kits.....	20
2.1.6	Größen-/ Längenstandards.....	21
2.1.7	Antibiotika.....	21
2.1.8	Bakterienstämme.....	21
2.1.9	Zelllinien.....	21
2.1.10	Puffer, Medien und Lösungen.....	22
2.1.10.1	Bakterienkultur.....	22
2.1.10.2	Lösungen zur Analyse und Klonierung von DNA.....	22
2.1.10.3	Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden.....	24
2.1.10.4	Zellkultur.....	25
2.1.10.5	Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden.....	26
2.1.10.6	Standardlösungen und Puffer.....	26
2.1.11	Antikörper.....	27
2.1.12	Scrapie Erregerstamm Rocky-Mountain-Laboratory (RML).....	28
2.1.13	CpG-ODN Sequenzen.....	28
2.1.14	Plasmide.....	29
2.1.15	Primer.....	29
2.1.16	Aminosäuresequenzen.....	29
2.1.17	Tiere.....	30
2.1.17.1	Prion-Protein defiziente <i>Prnp</i> ^{0/0} -Mäuse.....	30
2.1.17.2	C57BL/6-Mäuse.....	30
2.1.17.3	<i>Prnp</i> ^{Tga20} -Mäuse.....	30
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Tierexperimentelle Methoden.....	31
2.2.1.1	Betäubung der Mäuse mit Ether.....	31
2.2.1.2	Injektionen von rekombinantem Prion-Protein.....	31

Inhaltsverzeichnis

2.2.1.3	Injektionen der unterschiedlichen Plasmid-DNAs	31
2.2.1.4	Blutentnahme und Serumgewinnung.....	31
2.2.1.5	Intraperitoneale RML Inokulation und Bioassay zum Prionennachweis	32
2.2.1.6	Herzpunktion und Organentnahme.....	32
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	32
2.2.2.1	Agarose-Gel-Elektrophorese, Gelextraktion	32
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmungen von DNA.....	33
2.2.2.3	Plasmidpräparation aus <i>E. Coli</i>	33
2.2.2.4	Restriktionsverdau	34
2.2.2.5	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	34
2.2.2.6	Phosphorylierung von DNA Fragmenten.....	35
2.2.2.7	Glätten überhängender Enden	35
2.2.2.8	Ligation.....	35
2.2.2.9	Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	35
2.2.2.10	Transformation von Plasmiden in <i>E. Coli</i> Bakterien.....	36
2.2.2.11	Sequenzierung	36
2.2.2.12	Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
2.2.2.13	Klonierung von PCR-Produkten.....	38
2.2.3	Zellbiologische und proteinbiochemische Methoden.....	38
2.2.3.1	Allgemeine Kulturbedingungen	38
2.2.3.2	Bestimmung der Zellzahl mit dem Hämazytometer nach Neubauer... 38	
2.2.3.3	Einfrieren von Zellen.....	39
2.2.3.4	Transiente Transfektion von Eukaryotenzellen durch Calciumphosphat-Präzipitation	39
2.2.3.5	Durchflußzytometrische Analyse (FACS).....	40
2.2.3.6	Herstellung von Zelllysaten.....	40
2.2.3.7	Proteinbestimmung nach Bradford.....	41
2.2.3.8	SDS-PAGE Elektrophorese.....	41
2.2.3.9	Präzipitation von PrP ^{Sc} aus der Milz	41
2.2.3.10	Westernblot, Immunodetektion	42
2.2.4	Immunologische Methoden	42
2.2.4.1	Präparation von Lymphozyten aus der Milz.....	42
2.2.4.2	Lyse von Erythrozyten mit Ammoniumchloridpuffer.....	42
2.2.4.3	Radioaktiver Proliferationsassay	43
2.2.4.4	Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	43
2.2.4.5	ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay)	44
2.2.4.6	Bestimmung der Zytokine im Überstand.....	44
2.2.5	Immunohistochemie	45
2.2.5.1	Hämalaun-Eosin-Färbung.....	45
2.2.5.2	GFAP-Immunhistochemie.....	46
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Immunisierung mit rekombinantem Maus-Prion-Protein.....	47
3.1.1	Untersuchung der induzierten Antikörper in den Seren der proteinimmunisierten Mäuse	48
3.1.2	FACS-Analyse der Seren von proteinimmunisierten Mäusen	50
3.1.3	Westernblot-Analyse der Seren von proteinimmunisierten Mäusen.....	51
3.1.4	Inhibition der PrP ^{Sc} Akkumulation <i>in vitro</i> mit Seren der proteinimmunisierten Mäuse	52

Inhaltsverzeichnis

3.1.5	Untersuchung der intrazellulären Zytokinantwort nach Proteinimmunisierung	54
3.1.6	Untersuchung der PrP-spezifischen Proliferation der CD4 ⁺ -Zellen der proteinimmunisierten Mäuse <i>in vitro</i>	56
3.1.7	Analyse der Zytokine im Überstand nach Antigen-spezifischer Stimulation	57
3.1.8	Proteinimmunisierung in <i>Prnp</i> ^{0/0} - und C57BL/6-Mäusen mit CpG-1826 ODN als Adjuvants.....	58
3.1.8.1	Untersuchung der PrP-spezifischen Antikörper nach Proteinimmunisierung mit CpG-1826	59
3.1.8.2	FACS-Analyse der Seren nach Immunisierung mit rek. mPrP und CpG-1826 als Adjuvants	60
3.1.8.3	Intrazelluläre Zytokinfärbung der CD4 ⁺ -Zellen nach Immunisierung mit rek. mPrP und CpG-1826 als Adjuvants	61
3.1.9	Untersuchung der Proliferation der CD4 ⁺ -Zellen der protein-immunisierten Mäuse mit CpG-1826 als Adjuvants <i>in vitro</i>	63
3.2	DNA-Immunsierung.....	64
3.2.1	Klonierung der DNA-Vakzine-Vektoren	64
3.2.2	Überprüfung der Konstrukte.....	67
3.2.2.1	Sequenzanalyse.....	67
3.2.2.2	Proteinexpression <i>in vitro</i>	68
3.2.3	Immunisierungsprotokoll für die DNA-Immunsierung.....	69
3.2.4	Untersuchung der induzierten Antikörper in den Seren der DNA-immunisierten Mäuse	70
3.2.5	FACS-Analyse der Seren von DNA-immunisierten Tieren.....	71
3.2.6	Westernblot-Analyse mit Seren der DNA-immunisierten Mäuse.....	73
3.2.7	Inhibition der PrP ^{Sc} Akkumulation <i>in vitro</i> mit Seren der DNA-immunisierten Mäuse	74
3.2.8	Untersuchung der intrazellulären Zytokinantwort nach DNA-Immunsierung	75
3.2.9	Untersuchung der PrP-spezifischen Proliferation der CD4 ⁺ -Zellen der DNA-immunisierten Mäuse <i>in vitro</i>	78
3.2.10	Zytokine im Zellkulturüberstand von PrP-stimulierten Milzzellen immunisierter <i>Prnp</i> ^{0/0} -Mäuse	79
3.3	Kombination von DNA- und Proteinimmunisierung	80
3.3.1	Untersuchung der induzierten Antikörper nach Kombinationsimmunisierung mit DNA und Protein.....	80
3.3.2	FACS-Analyse der Seren nach Kombinationsimmunisierung mit DNA und Protein.....	82
3.3.3	Untersuchung der intrazellulären Zytokinantwort nach Kombination von DNA- und Proteinimmunisierung	83
3.3.4	Inokulationen der C57BL/6-Mäuse mit Maus-Prionen.....	85
3.3.5	Untersuchung der induzierten Antikörper in den Seren der DNA-/proteinimmunisierten Mäuse nach Inokulation	86
3.3.6	Bestimmung der Infektiositätstiter der inokulierten C57BL/6-Mäuse.....	87
3.3.7	Überlebensanalyse	87
3.3.8	Untersuchung der Organe der terminal erkrankten Mäuse auf PrP ^{Sc}	88
3.3.9	Histologie von Gehirn und Milz der inokulierten C57BL/6-Mäuse.....	90
4	Diskussion	92
4.1	Proteinimmunisierung mit rekombinantem PrP	92

Inhaltsverzeichnis

4.2	DNA-Immunsierung und Immunantwort.....	96
4.3	Kombination von DNA und Proteinimmunsierung zur Verstärkung der PrP-spezifischen Immunantwort.....	98
5	Literaturverzeichnis	101
6	Anhang.....	116
6.1	Zusammenfassung	116
6.2	Summary.....	117
6.3	Abkürzungsverzeichnis	119
6.4	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	121
6.5	Erklärung	123
6.6	Lebenslauf	124
6.7	Publikationsliste.....	125

1 Einleitung

1.1 Prionen-Erkrankungen

Prionen-Erkrankungen oder übertragbare (transmissible) spongiforme Enzephalopathien (TSEs) sind tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankungen beim Menschen und bei Tieren, die durch Prionen (proteinähnliche infektiöse Partikel) verursacht werden. Zu den bekanntesten Krankheitsformen gehören die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rindern, Scrapie bei Schafen und die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) beim Menschen (Prusiner, 1998). Histologisch findet sich eine Degeneration mit Verlust von Neuronen, eine Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen, schwammartige (spongiforme) Veränderungen mit Vakuolen im Nervensystem und eine extra-/intrazelluläre Amyloid-Ablagerung, wie sie auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Alzheimer Krankheit beschrieben wurden. Auf Grund der langen Inkubationszeit ging man zunächst davon aus, dass es sich bei dem infektiösen Agens der TSEs um ein bisher unbekanntes "unkonventionelles" oder "slow" Virus handelt (Gajdusek, 1977). Allerdings zeigte eine Behandlung von infektiösen Geweben mit konventionellen Methoden, die sowohl Viren (Detergenzien, Bestrahlen mit UV-Licht) als auch Bakterien (Autoklavieren bei 120°C) zerstören, keine Wirkung, da die Infektiosität erhalten blieb (McKinley et al., 1983; Bellinger-Kawahara et al., 1987a, 1987b; Prusiner, 1987, 1989 und 1991). Desweiteren konnten keine Nukleinsäuren isoliert werden, die in Zusammenhang mit der Erkrankung stehen (Meyer et al., 1991) und bisherige Veröffentlichungen, in denen von TSE assoziierten Nukleinsäuren berichtet wurde, konnten nicht reproduziert werden (Marx, 1979; Diringier et al., 1988; Manuelidis et al., 1988 und 1995).

Im infizierten Organismus ist nach einer Infektion weder eine humorale noch eine zelluläre Immunantwort meßbar. TSEs treten überwiegend sporadisch auf, jedoch sind beim Menschen auch seltene hereditäre Formen bekannt und im Vergleich zu anderen Proteinaggregations-assoziierten Krankheiten sind TSEs übertragbar (Tabelle 1).

Einleitung

Vorkommen	Krankheitsform	Int. Abkürzung	Referenzen
Mensch	Kuru	Kuru	Zigas et al., 1957
	Fatale familiäre Schlaflosigkeit (F atal F amilär I nsomnia)	FFI	Lugaresi et al., 1986
	G erstmann- S träussler- S cheinker S yndrom	GSS	Gerstmann, 1928 und 1936 Dimitz, 1913
	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (C reutzfeldt- J akob- D isease), davon sind 4 Formen bekannt	CJD (sCJD) (iCJD) (fCJD) (vCJD)	Creutzfeldt, 1920 Jakob, 1921 Will et al., 1996
Tier	Traberkrankheit der Schafe und Ziegen (Scrapie)	Scrapie	McGowan, 1732
	Übertragbare Hirndegeneration der Nerze (T ransmissible M ink E ncephalopathy)	TME	Hartsough et al., 1991; Burger et al., 1965
	Chronisch zehrende Krankheit der Hirsche (C hronic W asting D isease)	CWD	Williams et al., 1980
	Schwammartige Hirndegeneration der Rinder und rinderartigen Wiederkäuer (B ovine S pongiform E ncephalopathy)	BSE	Wells et al., 1987 Jeffrey et al., 1988
	Schwammartige Hirndegeneration der Katzen (F eline S pongiform E ncephalopathy)	FSE	Wyatt et al., 1990

Tabelle 1: Transmissible Spongiforme Enzephalopathien beim Menschen und bei Tieren

1.1.1 Die Prionhypothese und das Prion-Protein

Stanley B. Prusiner stellte 1982 eine Hypothese auf, bei der ein einzelnes Protein für die Krankheit verantwortlich gemacht wurde (Prusiner, 1982). Die Hypothese geht davon aus, dass nur ein einziges Protein oder proteinähnlicher Bestandteil das infektiöse Agens darstellt. In Anlehnung an die Abkürzung seiner Hypothese (proteinaceous infectious particle) nannte er das infektiöse Agens „Prion“.

Die „protein only“ Hypothese besagt, dass Prionen teilweise oder vollständig aus einer abnormal umgefalteten Isoform des endogenen zellulären Prion-Proteins (PrP^{C}) bestehen und bei der Infektion im Organismus die Konversion von PrP^{C} zur pathologischen Form des Prion-Proteins (PrP^{Sc}) auslösen (Griffith, 1967; Prusiner, 1982). Um nähere Informationen über das Prion-Protein zu erhalten, wurde das Gen, welches für PrP^{C} kodiert, identifiziert und genauer untersucht (Abbildung 1) (Oesch et al., 1985).

Das erste Translationsprodukt des Prion-Protein Gens ist zusammengesetzt aus 250 Aminosäuren und beinhaltet zwei Signalsequenzen. Die ersten 22 Aminosäuren am N-Terminus kodieren für ein Signal, welches dafür sorgt, dass das Protein zum endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert wird, wo es beim Eintritt in das ER-Lumen abgeschnitten wird. Die zweite Signalsequenz besteht aus 23 Aminosäuren, die sich am C-Terminus befindet und für einen Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) kodiert (Stahl et al., 1990). Humanes PrP^{C} besitzt eine einzelne Disulfidbrücke zwischen Cystein 179 und Cystein 214. Das Prion-Protein zeigt ein heterogenes Glykosylierungsmuster, das durch den Anhang von Oligosacchariden an die Aminosäuren N181 und N197 entsteht. Weitere posttranslationelle Prozesse finden im Golgi-Apparat statt; diese beinhalten die Modifikation der N-gebundenen Oligosaccharide und des GPI-Ankers. Das Endprodukt ist das Membranprotein PrP^{C} mit einem Molekulargewicht von 33-35kDa, das an die Zelloberfläche transportiert wird. Das Protein ist dort in „Caveolären- oder Raft-ähnlichen Domänen“ lokalisiert, die reich an Cholesterol und Sphingolipiden sind (Taraboulos et al., 1995; Vey et al., 1996; Kaneko et al., 1997).

Es ist bisher unklar welche Rolle PrP^{C} im Zellmetabolismus spielt, aber die Tatsache, dass das *Prnp*-Gen hoch konserviert ist und bei zahlreichen Spezies zu finden ist, könnte für eine relevante funktionelle Rolle sprechen. Deshalb war es

Einleitung

überraschend, dass sich *Prnp*^{0/0}-Mäuse völlig normal entwickeln, bis auf kleine Störungen im circadianen Rhythmus (Bueler et al., 1992, 1993; Prusiner et al., 1993; Weissmann et al., 1993; Manson et al., 1994, Tobler et al., 1997). Einige experimentelle Anhaltspunkte lassen vermuten, dass das Prion-Protein eine Rolle im Kupfer-Metabolismus der Neuronen (Herms et al., 1997) und eine ähnliche Rolle wie die Superoxiddismutase-1 (SOD-1) bei der Degradation von Radikalen spielt (Brown et al., 1999). Diese Ergebnisse konnten von anderen Arbeitsgruppen jedoch nicht bestätigt werden (Hutter et al., 2003). Es wurde mit Hilfe von biochemischen Methoden nach weiteren Bindungspartnern für das Prion-Protein gesucht, um die Funktion zu klären. Zu den gefundenen Bindungspartnern gehören zum Beispiel das gliale saure Faserprotein (GFAP), Bcl-2, molekulare Chaperone und der 37kDa Laminin-Rezeptor (Oesch et al., 1990; Kurschner et al., 1995 und 1996; Edenhofer et al., 1996; Rieger et al. 1997).

Biochemische und biophysikalische Studien zeigten, dass PrP^C in milden Detergenzien gereinigt und gelöst werden kann. Es besitzt einen hohen α -helikalen Anteil und mittels NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass PrP^C drei α -Helices besitzt (Abbildung 2) (Riek et al., 1996; Zahn et al., 2000). Das zelluläre Prion-Protein kann durch Proteaseverdau innerhalb weniger Minuten komplett abgebaut werden (McKinley et al., 1983) und ist nicht infektiös.

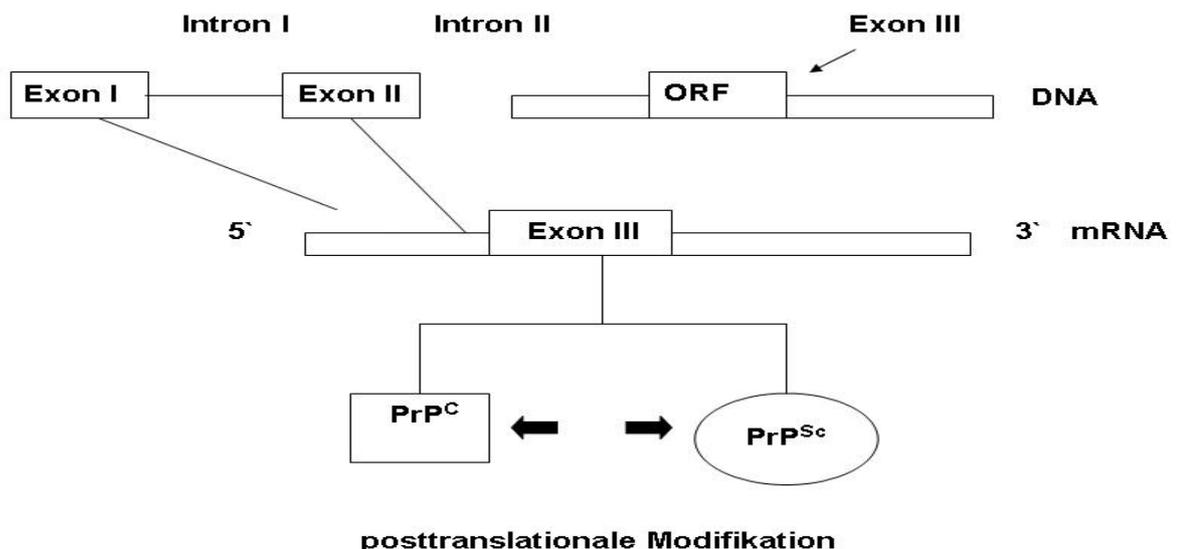


Abbildung 1: Aufbau und Organisation des Prion-Protein-Gens in der Maus

Der gesamte offene Leserahmen (ORF) für das Prion-Protein liegt im Exon III. Hier ist die hypothetische Bildung von PrP^{Sc} aus der zellulären Form PrP^C durch eine posttranslationale Konformationsänderung schematisch dargestellt (nach Prusiner, 1991).

Einleitung

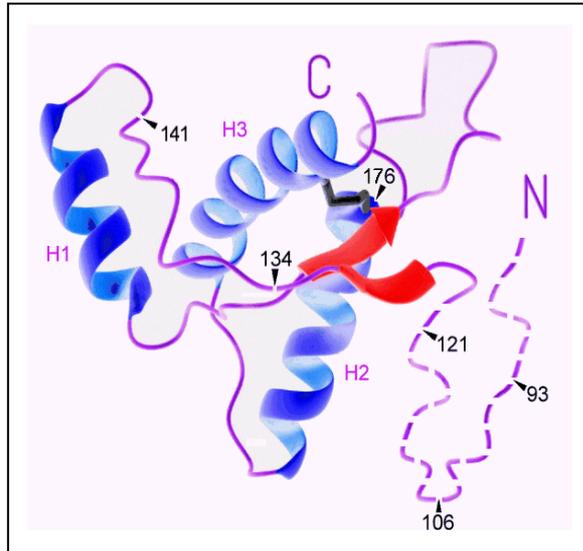


Abbildung 2: Schematische Struktur des zellulären Prion-Proteins (PrP^{C})

PrP^{C} besteht aus einer globulären Domäne, die drei α -Helices (H1-H3), ein kurzes antiparalleles β -Faltblatt (rot) und eine Disulfid-Brücke aufweist (Riek et al., 1996). Der Aminoterminus ist sehr flexibel. Für Struktur- und Funktionsstudien sind die gezeigten aminoterminalen Deletionen im Tiermodell untersucht wurden. (Quelle: von Mering)

1.1.2 Umwandlung von PrP^{C} in PrP^{Sc}

Es sind bis heute keine Unterschiede in der Primärstruktur von PrP^{C} und PrP^{Sc} gefunden worden. Beide Formen des Prion-Proteins sind chemisch identisch. Es konnten auch keine Unterschiede in der Aminosäuresequenz gefunden werden. In der pathogenen Form des Prion-Proteins (PrP^{Sc}) konnten keine kovalenten Modifikationen nachgewiesen werden, die es nicht auch bei der zellulären Form vom PrP gibt (Stahl et al., 1993). Wenn man allerdings PrP aus nicht infektiösen und hoch infektiösen Material isoliert, unterschieden sich die biophysikalischen Eigenschaften drastisch voneinander. Während PrP^{C} löslich ist, eine überwiegend α -helikale Sekundärstruktur besitzt und sensitiv gegen den Abbau durch Proteinase K ist, so ist PrP^{Sc} unlöslich, hat eine überwiegende β -helikale Sekundärstruktur und ist Proteinase K resistent (Cohen und Prusiner, 1998; Ironside et al., 1998). Auf Grund dieser biophysikalischen Eigenschaften ist es möglich, die zelluläre Form von der pathogenen Form des Prion-Proteins zu unterscheiden.

Da PrP^{Sc} allein als die infektiöse Komponente beschrieben wurde (Prusiner, 1982), wurden zwei Modelle der möglichen Entstehung der pathogenen Form aufgestellt (Abbildung 3). Beim ersten Modell, dem "Umfaltungsmodell", geht man

Einleitung

davon aus, dass sich PrP^{C} teilweise entfaltet und dann unter dem Einfluß von PrP^{Sc} rückgefaltet wird. Beide Zustände, normale und falschgefaltene Form, werden getrennt durch eine aktivierte Energie-Barriere (Prusiner, 1991). Das zweite Modell, das „Keimbildungsmodell“, geht davon aus, dass sich PrP^{C} und PrP^{Sc} in einem Gleichgewicht befinden, und dass sich dieses Gleichgewicht normalerweise zu Gunsten des PrP^{C} ausbildet. PrP^{Sc} ist nach dieser Vorstellung nur dann stabil, wenn es in seltenen Fällen (z.B. bei der Krankheitsentstehung) zur Bildung von Multimeren kommt, welche von der Zelle nicht mehr abgebaut werden können (Jarrett und Lansbury, 1993).

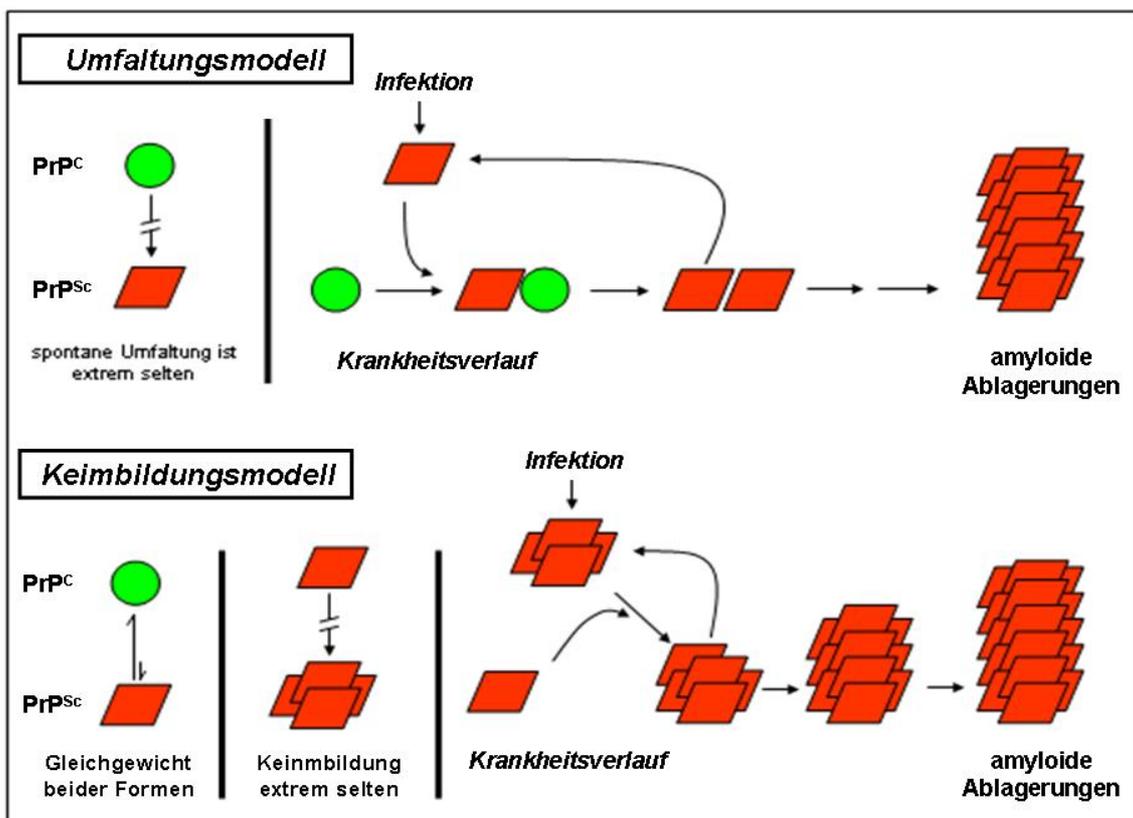


Abbildung 3: Modellvorstellungen für die Umfaltung von PrP^{C} in PrP^{Sc}

Das Umfaltungsmodell postuliert, dass eine spontane Umfaltung durch eine hohe Aktivierungsenergie sehr selten ist. Nach Infektion mit Prionen kann PrP^{Sc} jedoch als Katalysator für die Prionreplikation fungieren (Prusiner et al., 1989 und 1990).

Beim Keimbildungsmodell wird ein Gleichgewicht zwischen beiden PrP -Formen angenommen, welches normalerweise auf die Seite von PrP^{C} verlagert ist. Somit ist die Entstehung von „Kristallisationskeimen“ für die Bildung von amyloiden Ablagerungen sehr selten (Brown et al., 1991; Jarrett und Lansbury, 1993). Die Krankheit könnte jedoch aus einer Infektion resultieren.

1.1.3 Therapeutische und prophylaktische Ansätze

Im Laufe der letzten Jahre wurden zahlreiche Versuche unternommen, eine Therapie oder Prophylaxe gegen Prionen-Erkrankungen zu entwickeln. Da die klinische Erkrankung erst auftritt, wenn neuronale Veränderungen vorliegen, ist es schwierig diese Schäden mit pharmakologischen Medikamenten zu behandeln. Ziel vieler Arbeiten ist es deshalb, eine Verlängerung der Inkubationszeit durch Inhibierung der Akkumulation von PrP^{Sc} oder der Umfaltung von PrP^C in seine pathogene Form zu erreichen. Es gibt zahlreiche Substanzen, wie Kongo Rot, polyene Antibiotika, Anthracyclin-Derivate, Porphyrine, Suramin und Beta-Faltblatt-brechende Peptide, die einen therapeutischen Effekt im Tiermodell oder in Zellkultur zeigten (Barret et al., 2003; Prusiner und De Armond, 2003). Diese Effekte resultieren zum einen durch die Stimulation der Endozytose von PrP^C (Pentosan oder Dextran-Sulfat) oder durch die Rückführung des Proteins in saure Kompartimente (Suramin). Für die Ansammlung oder Akkumulation von Prionen in peripheren Organen ausserhalb des Nervensystems spielen sekundäre lymphatische Organe eine entscheidende Rolle, da sich bei verschiedenen Prionen-Erkrankungen der Erreger zuerst in den folliculär dendritische Zellen (FDC) der lymphatischen Organe nachweisen lässt, bevor es zu einer Ausbreitung ins Nervensystem (Neuroinvasion) kommt. Deshalb beschäftigen sich neuere Strategien mit einer Postexpositions-Prophylaxe und einer therapeutischen Intervention nach Infektion, aber vor der eigentlichen Krankheitsentstehung (Hilton et al., 1998; Brown et al., 1999; Hill et al., 1999; Beekes und Mc Bride, 2000; Mabbot et al., 2000; Montrasio et al., 2000).

Die Rolle des Immunsystems bei Prionenerkrankungen (Klein et al., 1997 und 2001; Mabbot und Bruce, 2001) und Immunisierungsstudien im Maus-Modell geben einen ersten Ansatzpunkt für mögliche Vakzinierungsstrategien gegen Prioninfektionen (Heppner et al., 2001; Ingram et al., 2001). In Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass durch eine Behandlung mit anti-PrP monoklonalen Antikörpern oder rekombinanten Fab-Fragmenten es zu einer Verminderung der Replikation von Prionen in infizierten Zellen kommt (Enari et al., 2001; Peretz et al., 2001; Gilch et al., 2003; White et al., 2004). Es ist schwierig eine humorale Immunantwort gegen PrP^C oder PrP^{Sc} durch eine aktive Immunisierung zu induzieren, da es sich bei PrP^C um ein ubiquitär vorkommendes, endogenes

Protein handelt und eine Toleranz besteht. Das ist nicht der Fall, wenn die Immunisierung in PrP defizienten Tieren oder mit einem Spezies-fremden Prion-Protein als Immunogen durchgeführt wird (Prusiner et al., 1993; Williamson et al., 1996).

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem ermöglicht einem Organismus, auf verschiedenste Pathogene wie Viren, Bakterien und Parasiten zu reagieren, und diese zu bekämpfen. Es kann zwischen körperfremd und körpereigen unterscheiden und darauf entweder mit einer Immunantwort oder Toleranz reagieren. Man unterscheidet bei Säugetieren zwischen der "erworbenen" und der "angeborenen" Immunantwort. Alle Zellen des Immunsystems stammen von denselben Vorläuferzellen ab – den hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark.

Zu den Zellen, die für die angeborene Immunantwort wichtig sind, gehören die Granulozyten und die Makrophagen. Makrophagen und Granulozyten sind in der Lage Mikroorganismen zu phagozytieren und abzutöten, ohne sie spezifisch erkennen zu müssen. Bei den Granulozyten unterscheidet man zwischen neutrophilen, eosinophilen und basophilen. Die neutrophilen Granulozyten sind neben der Fähigkeit zur Phagozytose, auch in der Lage Entzündungsmediatoren freizusetzen. Eosinophile Granulozyten scheinen bei parasitären Infektionen eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Funktion der basophilen Granulozyten ist weitgehend unklar.

Eine weitere Zelllinie, die zum angeborenen Immunsystem gehört, ist die natürliche Killerzelle (NK-Zelle). Diese Zellen stammen von einer lymphatischen Vorläuferzelle ab. Sie besitzen zytotoxische Granula und spielen eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und Abtötung von anormalen Zellen (Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen).

Der frühen angeborenen Immunantwort liegt ein unveränderliches Rezeptorprofil zugrunde. Diese Rezeptoren erkennen nur allgemein vorkommende Merkmale von Pathogenen, deshalb kann dieses Abwehrsystem leicht überwunden werden. Desweiteren sind die Zellen der angeborenen Immunantwort nicht in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln.

Einleitung

Bei der "erworbenen" Immunität handelt es sich um eine spezifische Antwort auf ein bestimmtes Antigen. Die Zellen dieser Immunantwort, Lymphozyten, gehen ebenfalls aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle hervor. Die Lymphozyten werden in zwei Hauptgruppen unterteilt, in die B-Lymphozyten oder B-Zellen und in die T-Lymphozyten oder T-Zellen. Die B-Lymphozyten reifen im Knochenmark heran. Die T-Zellen entwickeln sich im Thymus. T-Zellen werden in zwei Klassen unterteilt, von denen die eine nach Aktivierung zur zytotoxischen T-Zelle (CTL) wird, wohingegen die andere Helferfunktionen (Th-Zelle) übernimmt und andere Zellen des Immunsystems aktiviert. Lymphozyten zirkulieren nach ihrer Reifung im Blut und gelangen so zu den lymphatischen Organen. In den peripheren lymphatischen Geweben kann es zur spezifischen Immunantwort kommen, wenn die Lymphozyten auf ihr Antigen treffen, dass durch eine Antigen-präsentierende-Zelle (APC) dargeboten wird. Jede T-Zelle reagiert spezifisch auf nur ein Antigen mit Proliferation und Differenzierung. Auch die B-Zellen können nach spezifischer Stimulation proliferieren und sich zu antikörperfreisetzenden Zellen ausdifferenzieren. Damit bei erneutem Kontakt mit dem Pathogen eine schnellere Immunantwort eingeleitet werden kann, differenzieren einige der proliferierenden Lymphozyten zu Gedächtniszellen.

1.2.1 Zellvermittelte Immunantwort

Der zellvermittelten Immunantwort liegt eine direkte Wechselwirkung zwischen T-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden-Zellen zugrunde. Die beiden Gruppen der T-Lymphozyten lassen sich durch ihre Oberflächenantigene unterscheiden. Zytotoxische T-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche das CD8-Molekül, Helferzellen oder Th-Zellen exprimieren das CD4-Molekül auf ihrer Zelloberfläche (Parnes, 1989).

Die T-Helferzellen lassen sich in zwei weitere Gruppen unterteilen; die Th1-Zellen und die Th2-Zellen. Th1-Zellen sind für die Bekämpfung von intrazellulären Bakterien und Viren verantwortlich, indem sie durch Freisetzung von Zytokinen Makrophagen an den Infektionsherd locken. Die Th2-Zellen sind für die Zerstörung extrazellulärer Erreger, und Aktivierung von B-Zellen verantwortlich (Mosmann und Coffman, 1989; Seder und Paul, 1994; Bliss et al., 1996).

1.2.2 Humorale Immunantwort

Für die humorale Immunantwort sind B-Lymphozyten verantwortlich. Diese werden durch Antigene und den Kontakt mit antigenspezifischen T-Helferzellen aktiviert. B-Zellen nehmen das Antigen auf und präsentieren Peptidfragmente über den MHC-Klasse-II-Komplex den Helferzellen. Die Stimulation der B-Zelle erfolgt durch eine Wechselwirkung ihres auf der Oberfläche befindlichen CD40-Moleküls mit dem CD40-Liganden auf der T-Zelle. Desweiteren haben spezifisch sezernierte Zytokine und Wechselwirkungen anderer Ligandenpaare aus der Tumor-Nekrose-Faktor-(TNF)/TNF-Rezeptor-Familie einen Einfluss auf die Aktivierung von B-Zellen. Die T-Helferzellen induzieren die Proliferation der B-Zellen und die Differenzierung zu antikörpersezernierenden Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen.

1.2.3 Toleranz

In der Immunologie versteht man unter Toleranz sämtliche Phänomene, die dafür sorgen dass Reaktionen gegen körpereigene Strukturen verhindert werden. Man unterscheidet hierbei zwischen zentraler und peripherer Toleranz. Beide Mechanismen ergänzen sich gegenseitig.

1.2.3.1 Zentrale Toleranz

Die zentrale Toleranz wird in den primären lymphatischen Organen vermittelt, im Thymus für T-Lymphozyten und im Knochenmark für B-Lymphozyten. Zentrale Toleranz wird im Thymus durch negative Selektion, die Induktion von Anergie und die Induktion regulatorischer T-Zellen vermittelt. Durch die negative Selektion werden T-Zellen, die mit hoher Affinität an körpereigene Peptide binden würden, aus dem Repertoire entfernt (Kappler et al., 1987; Kisielow et al., 1988; Sprent et al., 1988). Damit möglichst viele autoreaktive Thymozyten eliminiert werden können, müssen im Thymus viele, im Körper auftretende Antigene, ständig präsentiert werden. Die übrigen Thymozyten sterben durch Apoptose. Bei der Anergie, wird ein spezifisches Antigen von naiven T-Zellen erkannt ohne dass eine Kostimulation erfolgt, so werden diese Zellen inaktiviert und verfallen in den Zustand der Anergie. Anergische T-Zellen können kein Interleukin-2 (IL-2) mehr

Einleitung

synthetisieren. Dadurch wird die T-Zelle beim Zusammentreffen mit dem Antigen daran gehindert zu proliferieren und sich zur Effektorzelle zu entwickeln. Die Anergie trägt also zur Toleranz der T-Zellen gegen körpereigene Gewebeantigene bei. Die regulatorischen T-Zellen können bei erneuter Begegnung mit dem Antigen aktiv antigenspezifische Reaktionen unterdrücken. Bei der Stimulation mit dem Antigen kommt es zur Ausschüttung von Interleukin 4 (IL-4), Interleukin 10 (IL-10) und Tumor-Wachstums-Faktor β (TGF- β). Das Zytokinsekretionsmuster hemmt die Entwicklung der Th1-Reaktionen und ist mit geringen Antikörpermengen verbunden. Desweiteren gibt es keine T-Zell-Reaktionen (Janeway und Travers, 2002)

1.2.3.2 Periphere Toleranz

Es können jedoch trotz dieses umfangreichen Selektionsmechanismus autoreaktive T-Zellen in der Peripherie gefunden werden, da einige gewebsspezifische Autoantigene nicht von Thymus-Epithelzellen exprimiert werden können. Diese T-Zellen müssen nun in der Peripherie kontrolliert werden (periphere Toleranz).

Hierbei unterscheidet man zwei Mechanismen. Zum einen die klonale Deletion und zum anderen Anergie. Unter klonaler Deletion versteht man die Eliminierung unreifer Lymphozyten, die körpereigene Antigene erkennen. Bei der Anergie handelt es sich um ein temporäres oder anhaltendes Abschalten der Effektorfunktionen einer T-Zelle. Die Aktivierung einer naiven T-Zelle erfolgt über zwei Signale, die von einer APC ausgehen müssen. Hierfür ist zum einen der Kontakt des T-Zell-Rezeptors mit dem auf der APC präsentierten Peptid-MHC-Komplex erforderlich und zum anderen muss der costimulatorische Rezeptor CD28 auf der Oberfläche der naiven Zelle durch die Bindung an B7 auf der APC aktiviert werden (Allison und Krummel, 1995; Howland et al., 2000). Da gewöhnliche Gewebszellen zwar den Peptid-MHC-Klasse-I-Komplex besitzen, allerdings nicht das B7 Oberflächenmolekül exprimieren, erhält die T-Zelle nur ein Aktivierungssignal. Durch das Ausbleiben des costimulatorischen CD28-B7 Signals kommt es zu einer unvollständigen T-Zell-Aktivierung und zu Anergie oder Deletion der entsprechenden T-Zelle.

1.2.4 Th1-/Th2-Antwort

Als erster zeigte Mosmann et al. (1986), dass Th-Zellen anhand der von ihnen produzierten Zytokine in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Er definierte Th1-Zellen als Interleukin 2 (IL-2), Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$), GM-CSF und Interleukin 3 (IL-3) produzierende und Th2 als IL-4, Interleukin 5 (IL-5) und Interleukin 13 (IL-13) produzierende Zellen (Kelso und Gough, 1988). Es wurden seitdem viele Zytokine den einzelnen Subpopulationen zugeordnet. Aktuell gilt $\text{IFN}\gamma$ als das Th1-definierende und IL-4 als das Th2-definierende Zytokin. IL-5 und IL-13 werden ebenfalls fast ausschließlich von Th2-Zellen produziert. Es wurde jedoch vielfach gezeigt, dass sowohl IL-2 als auch IL-10 von beiden T-Zelltypen exprimiert werden können und es gibt auch noch andere Zytokine, die nicht eindeutig zugeordnet werden können (Mosmann und Coffman, 1989).

Th1- und Th2-Zellen können den Ausgang einer Immunantwort entscheidend beeinflussen, da sie auf unterschiedliche Art und Weise in das Immunsystem eingreifen. Durch die Sekretion von Th1-Zytokinen wird die zelluläre und inflammatorische Immunreaktion phagozytischer Zellen verstärkt. $\text{IFN}\gamma$ induziert in Makrophagen die Produktion von IL-12, dem proinflammatorischen Zytokin Tumornekrosefaktor alpha ($\text{TNF}\alpha$) und die Synthese von Stickstoffmonoxid, welches der effektiven Bekämpfung von intrazellulären Parasiten dient (Snapper und Paul, 1987; Anggard, 1994). Makrophagen, die durch $\text{IFN}\gamma$ aktiviert wurden, exprimieren verstärkt MHC-Klasse-II, was ihnen eine verbesserte Antigenpräsentation ermöglicht. Durch die gleichzeitige Ausschüttung von Interleukin 12 (IL-12) wird eine Th1-Polarisierung verstärkt, so dass sowohl Inflammation, als auch Th1-Polarisierung weiter fortschreiten kann (Seder et al., 1993). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch $\text{IFN}\gamma$ ein Isotypenwechsel auf B-Zellen von Immunglobulinen der Klasse M (IgM) zur Subklasse 2a der Immunglobulinklasse G (IgG2a) kontrolliert werden kann, was bedeutet, dass Th1-Zellen die IgG2a Synthese induzieren (Finkelman et al., 1990). IgG2a hat eine wichtige Funktion bei der Komplementbindung, Opsonierung und Bindung an hochaffine $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptoren zum phagozytischen Abbau von extrazellulären Pathogenen.

Zytokine, die von Th2-Zellen produziert werden, induzieren eine humorale Immunreaktion (Stevens et al., 1988). Diese zeichnet sich durch die Rekrutierung

Einleitung

von Mastzellen und Eosinophilen und die Aktivierung von B-Zellen und damit die Produktion von Antikörpern aus. Die Th2-Antwort spielt eine zentrale Rolle bei der Neutralisierung von Toxinen durch Antikörper und bei der Abwehr von extrazellulären Erregern. Das von den Th2-Zellen produzierte IL-4 ist ein sehr potenter Stimulus von B-Zellen und kontrolliert den Antikörperklassenwechsel zu den Isotypen IgG1 (Maus), IgG4 (Mensch) und IgE (Snapper und Paul, 1987; Swain et al., 1990). Th2-Zellen verstärken die Produktion dieser Antikörper. Die Typ 2 Zytokine spielen auf Grund ihrer anti-inflammatorischen Eigenschaften eine große Rolle bei der Begrenzung potentiell gefährlicher, Th1-dominierter Immunreaktionen. So wirken IL-4 und IL-10 der IFN γ induzierten Makrophagenaktivierung entgegen. Zusätzlich wirkt IL-4 direkt inhibitorisch auf die Th1-Differenzierung (Powrie und Coffman, 1993).

1.3 Proteinimmunisierung

Die Immunisierung mit rekombinanten Proteinen konnte schon im Menschen erfolgreich durchgeführt werden zum Beispiel bei der Hepatitis B und E. Durch die Proteinimmunisierung wird eine MHC-Klasse-II Immunantwort ausgelöst, da Proteine in der Lage sind, T-Lymphozyten zu aktivieren, die an der Induktion der meisten Antikörperreaktionen mitwirken. Die Aktivierung des MHC-Klasse-II Weges kommt durch den Abbau des Proteins zu Peptiden, die an MHC-Moleküle der Klasse II binden, zustande. Der Peptid-MHC-Komplex kann von T-Zellen erkannt werden und es kommt somit zur Auslösung einer Immunantwort. Durch die Immunisierung mit rekombinanten Proteinen kann keine MHC-Klasse-I Immunantwort ausgelöst werden und somit erfolgt keine Induktion der zytotoxischen T-Zellen.

Da gereinigte Proteine nicht immer sehr immunogen sind, werden sie zusammen mit einem Adjuvants verabreicht, um eine Immunreaktion auszulösen. Diese Adjuvantien gehen mit dem Immunogen keine stabile Bindung ein, können allerdings die Immunogenität der Proteine auf zwei Weisen verstärken. Diese Hilfsstoffe können lösliche Proteinantigene in partikuläres Material umwandeln und so die Aufnahme durch antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen) beschleunigen. Dies geschieht etwa durch die Emulsion in mineralischem Öl. Wenn das Adjuvants Bakterien oder deren Produkte (CpG-Motive) enthält, kann

es ebenfalls zur Erhöhung der Immunogenität kommen. Durch die bakteriellen Zusätze in den Adjuvantien kann die Produktion von Zytokinen der Th1-Antwort ($\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$) induziert werden, die einen Einfluss auf die Verstärkung der Immunantwort haben.

1.4 DNA-Immunsierung

Im Jahr 1990 berichteten erstmals Wissenschaftler, dass die intramuskuläre Injektion von gereinigter bakterieller Plasmid-DNA, die für ein fremdes Protein kodiert, in Muskelzellen der Mäuse zur Expression dieses Proteins führt (Wolff et al., 1990). Durch diese Beobachtung wurden neue Möglichkeiten der Gentherapie und Impfstoffentwicklung eröffnet. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Injektion von "nackter" DNA sowohl eine zelluläre als auch eine humorale Immunantwort ausgelöst werden kann, die sogar zu einem Schutz vor nachfolgenden Infektionen mit diesem Antigen führen kann (Tang et al., 1992; Robinson et al., 1993; Ulmer et al., 1993).

Die DNA-Immunsierung hat den großen Vorteil, dass das Antigen intrazellulär produziert wird und somit direkt in den MHC-Klasse-I Weg gelangen kann. Somit können Gefahren, die bei Lebendimpfstoff-Immunsierungen auftreten, umgangen werden, aber dennoch zytotoxische T-Zellen induziert werden. Desweiteren besteht ein großer Vorteil in der Herstellung und Lagerung der DNA im Vergleich zu Proteinimpfstoffen oder Impfviren. DNA-Immunsierungen wurden vielfach bei verschiedenen Krankheitsmodellen erfolgreich getestet (Michel et al., 1995; Fensterle et al., 1999; Hwang et al., 1999).

1.4.1 DNA-Vakzine-Vektor

Der DNA-Impfstoff besteht aus einem fremden Antigen, einem "gene of interest", das in ein eukaryotisches Expressionsvektorsystem inseriert wird. An dieses Vektorsystem werden bestimmte Anforderungen gestellt. Zum einen sollte der Vektor einen Replikationsursprung für das Wachstum in Bakterien besitzen. Desweiteren muss ein Antibiotika-Resistenz-Gen zur Plasmidselektion, ein starker Promotor für eine optimale Expression des Proteins in Säugerzellen (z.B. CMV-Promotor oder SV40-Promotor) und eine Polyadenylierungs-Sequenz zur

Stabilisierung der mRNA-Transkripte (z.B. vom bovinen Wachstumshormon BGH oder SV40) (Gurunathan et al., 2000) vorhanden sein. Zusätzlich zu den genannten Bausteinen des Vakzine-Vektors, gibt es spezifische Nukleotidsequenzen, die eine wichtige Rolle bei der Immunogenität der Vakzine spielen. Es handelt sich dabei um unmethylierte Cytosin-Guanosin-Dinukleotide (CpG-Motive), die in prokaryotischer DNA etwa 20mal häufiger vorkommen als in eukaryotischer DNA. Diese Motive sind in der Lage direkt B-Zellen zu aktivieren (Krieg et al., 1995). Desweiteren induzieren sie die Zytokinsekretion von professionellen Antigen-präsentierenden-Zellen (Klinman et al., 1996; Stacey et al., 1996; Jakob et al., 1998) und NK-Zellen (Cowdery et al., 1996). Außerdem werden auch T-Zellen indirekt von CpG-Motiven stimuliert (Bendigs et al., 1999).

1.4.2 Strategien zum Toleranzbruch

Es sind in den letzten Jahren viele Strategien entwickelt worden, um immunologische Toleranz zu induzieren oder zu brechen. Toleranzbruch spielt eine wichtige Rolle in der Tumorforschung. Häufig kann keine Immunantwort gegen einen Tumor ausgebildet werden, da Tumorzellen sich aus körpereigenem Gewebe entwickeln und somit Selbstantigene auf der Zelloberfläche tragen, die von T-Zellen toleriert werden. Wichtigstes Ziel ist es daher, eine Immunantwort gegen körpereigene Antigene zu induzieren (Ohashi und DeFranco, 2002).

Für die Aktivierung von naiven T-Zellen ist eine Wechselwirkung mit Zellen, die sowohl den geeigneten Peptid-MHC-Komplex als auch kostimulatorische Moleküle tragen, erforderlich. Das bedeutet, dass immunologische Toleranz immer dann entsteht, wenn Antigen-präsentierende-Zellen (APCs) fehlen, um eine Immunantwort auszulösen oder T-Helfer-Zellen fehlen, die eine Immunantwort entsprechend verstärken können. Ohne eine vollständige Kostimulierung führt die spezifische Antigenerkennung zur Anergie oder zur Zerstörung der reifen T-Zellen. Eine mögliche Variante, um die Toleranz zu brechen, ist die Beladung von APCs (z.B. dendritische Zellen) mit dem Antigen (Hsu et al., 1996; Prasad et al., 2005). Weitere Schritte sind die Verwendung von Adjuvantien, um APCs zu aktivieren (Sykes und Mapara, 2004) oder die Immunisierung mit Antigen und spezifischen Epitopen, die speziell Th-Zellen induzieren können (Hertz et al., 2001). Die Verstärkung der Immunogenität von Tumoren durch das Einschleusen von Genen,

die für kostimulierende Moleküle oder Zytokine kodieren, ist ein vielversprechender Ansatz in der Krebstherapie. Durch die kostimulierenden Moleküle (z.B. B7) können tumorspezifische naive T-Zellen aktiviert werden und sich zu Effektorzellen umwandeln, um so den Tumor abzustoßen. Durch die Expression von Zytokinen (z.B. der Granulozyten-Makrophagenkoloniestimulierende Faktor (GM-CSF)) in den Tumorzellen sollen APCs angelockt werden, um so eine Immunantwort gegen den Tumor auszulösen (Chu et al., 2005).

1.4.3 Th1-/Th2-Polarisierung durch DNA-Immunisierung

Zwei Mechanismen, die einen besonderen Einfluss auf die Th-Zelldifferenzierung haben sind zum einen die immunstimulatorische Wirkung von bakterieller DNA (CpG-Motive) und zum anderen die Immunisierungsrouten.

CpG-Sequenzen verstärken nicht nur die Immunreaktion nach DNA-Immunisierungen, sondern wirken auch indirekt polarisierend auf die Th1-Antwort (Leclerc et al., 1997; Krieg et al., 2002). Es wurde bereits gezeigt, dass durch den Einsatz von CpG-ODN eine vorhandene Th2-Antwort in eine Th1-Immunantwort umgewandelt werden konnte (Chu et al., 2000).

Das Th-Zellprofil kann ebenfalls durch die Applikationsroute der DNA-Immunisierung beeinflusst werden (Pertmer et al., 1996). Bei der intramuskulären Injektion wird meist eine Th1-Antwort induziert mit einem erhöhtem IgG2a:IgG1 Verhältnis im Serum und vermehrter IFN γ Produktion durch Lymphozyten. Die intradermale Applikationsroute führt dagegen eher zu einer balancierten Th1-/Th2-Antwort (Pertmer et al., 1996; Robinson, 1996; Cardoso et al., 1998).

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die humorale und zelluläre Immunantwort nach Immunisierung gegen das Prion-Protein zu untersuchen. Hierzu sollte mit unterschiedlichen Immunisierungsstrategien versucht werden, die Toleranz gegen das körpereigene Prion-Protein zu brechen. Um die Effektivität der jeweiligen Immunisierung zu untersuchen, wurde die Vakzinierung nicht nur in *Prnp*^{+/-}-Mäusen (C57BL/6-Mäuse), sondern auch in *Prnp*^{0/0}-Tieren durchgeführt, die kein Prion-Protein besitzen.

Im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Ist es möglich durch Verwendung unterschiedlicher Adjuvantien bei Proteinimmunisierung gegen das Prion-Protein eine zelluläre und humorale Immunantwort in *Prnp*^{+/-}-Mäusen zu induzieren?
- Kann durch DNA-Immunisierung mit einem Plasmid, das das Prion-Protein exprimiert, eine zelluläre und humorale Immunantwort in *Prnp*^{+/-}-Mäusen induziert werden, und kann dieser Effekt durch das zusätzliche Einbringen eines T-Helfer-Epitops des Tetanustoxins verstärkt werden?
- Ist es möglich die Inkubationszeit der TSE in Mäusen nach einer Kombinationsimmunisierung mit DNA und Protein zu verlängern?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Material und Geräte

Autoklav	Münchner Medizin
Bakterienkulturschüttler	Certomat, Braun
Blot Filterpapier	Schleicher & Schuell
Computer	Mac OS X; PC
Digitale Kamera	Diagnostic Instruments
Eismaschine	Scotsman
Elektrophoresekammern	Hauswerkstatt
FACS	FACS Calibur, Becton-Dickinson
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Leica
Gefrierschränke	Bosch electronic
Graphitblottingkammern	Hauswerkstatt
Harvester	Perkin Elmer
Heizblock	Eppendorf
Inkubatoren	Heraeus
Kapillarsequenzierer	ABI Prism 310, Perkin Elmer ABI Prism 3100, PE Applied Biosystems
Kühlschränke	Bosch
Laborwaage	Sartorius
Magnetrührer	Ikamag®RH
Mikrotom	Leica

Material und Methoden

Mikrowellenherd	Severin
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Nitrocellulose/PVDF Membran	Schleicher & Schuell; Roth
pH-Meter	Denver Instrument
Pipetten	Gilson, Eppendorf
Pipettierhilfe	Gilson
Plastikmaterial	Costar, Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc, Roth
Küvetten	Eppendorf
Röntgenfilme	Amersham Biosciences
Scintillator	Perkin Elmer
Sonifier (Ultraschall)	Branson
Spektralphotometer	Ultrospec III, Pharmacia
Sterilbank	Nuaire™
Thermocycler	Eppendorf
UV-Handlampe	Bachofer
UV-Leuchttisch/Videodrucker	MWG und Mitsubishi
Vortexer	Heidolph
Wasserbäder	GFL
Wippe	Heidolph
Zentrifugen	Kendro
Tischzentrifuge	Eppendorf
Zellkulturzentrifuge	Hettich
Großzentrifuge	Sorvall (SLC-6000, SLC-3000 und SLC- 1500)

2.1.2 Chemikalien

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Applichem, Darmstadt; Merck, Darmstadt; Sigma, Deisenhofen; Roth, Karlsruhe und werden nicht einzeln aufgelistet.

2.1.3 Radiochemikalien

[Methyl-3H]-Thymidin (1mCi/ml)

2.1.4 Enzyme

CIAP (calf intestinale alkaline phosphatase)	MBI Fermentas
Klenow-Polymerase	MBI Fermentas
Proteinase K	Roche
Pfu-Polymerase	Stratagene
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas; New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
T4 Polynukleotidkinase	MBI Fermentas
Taq-Polymerase	Promega

2.1.5 Kits

ABI Prism Big Dye Kit	PCR Sequenzierung	PE Applied Biosystems
Dye Ex Kit	Sequenzierprobenaufreinigung	Qiagen
ECL Western Blot Detection Kit	Immunoblot Entwicklung	Perbio Science
Gelextraktionskit	Gelextraktion	Qiagen
Plasmid Megaprep Kit	Plasmidpräparation	Qiagen
Plasmid Miniprep Kit	Plasmidpräparation	Qiagen

Material und Methoden

Substrat AEC	Entwicklung der Schnitte	DCS
Nachweissystem Link und Label	GFAP Färbung	DCS
CBA Flex Set System	Bestimmung der Zytokine im Überstand	BD Biosciences

2.1.6 Größen-/ Längenstandards

Nukleinsäurelängenstandards

λ -HindIII Marker	MBI-Fermentas
1kB DNA Ladder	MBI-Fermentas
100bp DNA Ladder	MBI-Fermentas

Proteingrößenstandard

MagicMark™XP	Invitrogen
--------------	------------

2.1.7 Antibiotika

Ampicillin	Sigma
Penicillin	Grünenthal
Streptomycin	Fatol Arzneimittel

2.1.8 Bakterienstämme

<i>E. Coli</i> DH5 α	Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Rethwilm (Transformation v. Ligationsprodukten)
<i>E. Coli</i> JM109	Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Rethwilm (Schnelltransformation von Plasmiden)

2.1.9 Zelllinien

293T	Humane embryonale Nierenzelllinie, die das SV-40 T-Antigen exprimiert
N2a	Murine Neuroblastoma Zelllinie

Material und Methoden

ScN2a	Scrapie-infizierte N2a Zelllinie
A3	N2a Zelllinie, die PrP ^C überexprimiert

2.1.10 Puffer, Medien und Lösungen

2.1.10.1 Bakterienkultur

5x LB Medium	LB Broth Base	100g		
		in	1000ml	H ₂ O, autoklavieren
LB Agar	LB Agar	20g		
		in	1000ml	H ₂ O, autoklavieren

Nach dem autoklavieren wird das Medium auf 60°C abgekühlt bevor das jeweilige Antibiotikum zugegeben werden kann und die Agarplatten gegossen werden können.

2.1.10.2 Lösungen zur Analyse und Klonierung von DNA

50x TAE	Tris pH 8,0	2M
	Konz. Essigsäure	5,71%
	EDTA pH 8,0	50mM
6x DNA Probenpuffer	Bromphenolblau	0,25%
	Xylencyanol	0,25%
	Glycerin	30%
3M Natriumacetat	Natriumacetat	3M
	pH 5,2 mit konz. Essigsäure einstellen, autoklavieren	

Material und Methoden

Plasmidpräparation	Tris-HCl pH 8,0	50mM
Qiagen Puffer P1	EDTA	10mM
(Resuspensionspuffer)	RNase A	100µg/ml
Plasmidpräparation	NaOH	200mM
Qiagen Puffer P2	SDS	1%
(Lyse-Puffer)		
Plasmidpräparation	Kaliumacetat pH 5,5	3M
Qiagen Puffer P3		
(Neutralisations-Puffer)		
Plasmidpräparation	NaCl	750mM
Qiagen Puffer QBT	MOPS pH 7,0	50mM
(Äquilibrierungs-Puffer)	Isopropanol	15%
	Triton X 100	0,15%
Plasmidpräparation	NaCl	1M
Qiagen Puffer QC	MOPS pH 7,0	50mM
(Wasch-Puffer)	Isopropanol	15 %
Plasmidpräparation	NaCl	1,25M
Qiagen Puffer QF	Tris-HCl pH 8,5	50mM
(Elutions-Puffer)	Isopropanol	15%
1 M KOH	KOH	1M
	KOH Plätzchen in H ₂ O lösen	
1 M Tris-HCl pH 7,5	Tris	1M
	pH 7,5 mit konz. HCl	
	einstellen	

2.1.10.3 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

RIPA-Puffer	Tris-HCl pH 7,5	20mM
	NaCl	300mM
	Natrium-Deoxycholat	1 %
	Triton X-100	1%
	SDS	0,1%
	Lagerung bei 4°C	
Lysispuffer für Zelllysate	Tris-HCl	50 mM
	Desoxycholatsäure	0,5%
	NP40	0,5%
	NaCl	100mM
2x Probenpuffer für Proteinproben	Tris-HCl pH 6,8	125mM
	SDS	4%
	Glycerin	20%
	β-Mercaptoethanol	10%
	Bromphenolblau	0,1%
Tricine Gel-Puffer	Tris-HCl pH 8,45	3M
	SDS	0,3%
Lauf-Puffer für Fertiggele (1l)	SDS	10g
	Tris	30,3g
	Glycin	144,1g
10x Anodenpuffer	Tris-HCl pH 8,9	2M
5x Kathodenpuffer	Tris	500mM
	Tricine	500mM
	SDS	0,5%

Material und Methoden

Blot-Puffer (semi dry)	Tris	50mM
	Glycin	40mM
	SDS	0,037%
	Methanol	20%

Blot-Puffer (wet) (1l)	Glycin	144g
	Tris	30g
	SDS	7,5g

PBS Tween (PBST)	PBS mit	
	Tween 20	0,5%

TBST	Tris-HCl pH 7,4	25mM
	KCl	1mM
	NaCl	150mM
	Tween 20	0,1%

2.1.10.4 Zellkultur

MEM (Minimal Essential Medium, Gibco)	FCS (Biochrom AG)	10%
	Penicillin/Streptomycin	120mg/l

DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium; Gibco)	FCS (Biochrom AG)	10%
	Penicillin/Streptomycin	120mg/l

RPMI (Gibco)	RPMI 1640	
	FCS oder Mausserum	10% oder 3%

Lysispuffer	Tris-HCL pH 7,5	50mM
	NaCl	150mM
	NP40	1%
	Sodium Deoxycholate	0,1%

2.1.10.5 Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden

2x HBS	Hepes, pH 7,05	50mM
	KCl	10mM
	Dextrose	12mM
	NaCl	280mM
	Na ₂ HPO ₄	1,5ml
	3 Aliquots mit pH 7,0, 7,05 und 7,1 herstellen, 0,2 µm steril filtrieren, Effizienz testen, bei -20°C lagern	
2M CaCl ₂	CaCl ₂ (Sigma, cell culture grade)	2M
	0,22 µm sterilfiltrieren, bei -20°C lagern	
Natriumbutyrat	PBS mit	
	Natriumbutyrat	500mM
0,22 µm sterilfiltrieren, bei 4°C lagern		
FACS-Puffer	PBS	
	FCS	
	EDTA pH 8,0	
	Natriumazid	0,1%
Cytofix/Cytoperm-Puffer und Perm/Wash-Puffer	BD Pharmingen	

2.1.10.6 Standardlösungen und Puffer

PBS	NaCl	137mM
	KCl	2,7mM
	Na ₂ HPO ₄	4,3mM
	KH ₂ PO ₄	1,4mM
	CaCl ₂	1,5mM
	MgCl ₂	1mM

Material und Methoden

PBS-	NaCl	137mM
	KCl	2,7mM
	Na ₂ HPO ₄	4,3mM
	KH ₂ PO ₄	1,4mM
TE pH 8,0	Tris-HCl pH 8,0	10mM
	EDTA pH 8,0	1mM
Citratpuffer	Citronensäure	10,6g
	Monohydrat	5g
	NaOH	
	pH 6,0 (2,5 l)	

2.1.11 Antikörper

Antikörper für Durchflußzytometrie

Antikörper	Klon	Hersteller
Ratte Anti-Maus CD4(L3T4)-Cy	RM4-5	Pharmingen
Ratte Anti-Maus CD4(L3T4)-PE	H129.19	Pharmingen
Ratte Anti-Maus CD8(Ly2)-Cy	53-6.7	Pharmingen
Ratte Anti-Maus IL-2-PE	JeS6-5H4	Pharmingen
Ratte Anti-Maus TNF α -PE	MP6-XT22	Pharmingen
Ratte Anti-Maus IFN γ -PE	XMG1.2	Pharmingen
Ratte Anti-Maus IL-10-PE	JES5-16E3	Pharmingen
Ratte Anti-Maus IL-4-PE	11B11	Pharmingen
Ratte Anti-Maus IL-5-PE	TRFK4	Pharmingen
Ratte IgG1 Isotypkontrolle	R3-34	Pharmingen
Ziege Anti-Maus IgG-FITC		Dianova

Sonstige Antikörper

Anti Maus IgG 1-HRP	Zymed
Anti Maus IgG 2a-HRP	Zymed
Anti Maus IgM-HRP	Zymed
Anti Maus Ig gesamt-HRP	Dako
CD28	Pharmingen
Anti CD3e	Pharmingen
GFAP	Dako
Nachweissystem Link und Label	DCS
Anti Maus PrP IgG1 (6H4)	Prionics

2.1.12 Scrapie Erregerstamm Rocky-Mountain-Laboratory (RML)

Für die Inokulationsstudien wurde der Erregerstamm RML genutzt. Von diesem Stamm ist sowohl die klinische Symptomatik, die Inkubationszeit, das histopathologische Läsionsprofil als auch das PrP^{Sc}-Glykosylierungsmuster bekannt. RML ist ein Maus-adaptiertes Scrapie-Isolat (Chandler, 1961) und in CD-1 Mäusen passagiert. Es wurde ein 10%iges Hirnhomogenat von diesen Mäusen in 0,32M Sucrose hergestellt. Der Überstand nach Zentrifugation bei 2000upm für 20 Minuten wurde bei -20°C weggefroren.

2.1.13 CpG-ODN Sequenzen

Die CpG-ODN Sequenzen wurden phosphothioatmodifiziert bei MWG (Ebersberg) bestellt. Die Oligodinukleotide wurden in sterilem doppelt destilliertem Wasser gelöst und bei 4°C aufbewahrt. Es wurden unterschiedliche CpG-ODN als Adjuvantien genutzt. CpG-1668 mit einer immunstimulativen Sequenz und CpG-1826, welches zwei immunstimulatorische Motive besitzt.

CpG-1668	5'-tcc atg acg ttc ctg atg ct-3'
CpG-1826	5'-tcc atg acg ttc ctg acg tt-3'

2.1.14 Plasmide

pCG		leerer Vektor
pCG-PrP	neu hergestellt	exprimiert murines PrP
pCG-PrP-P30	neu hergestellt	exprimiert murines PrP + T-Helfer-Epitop des Tetanustoxins P30
pAd-CMV-PrP	Flehsig	exprimiert murines PrP

2.1.15 Primer

P30_ccF1	5` CC-TTC-AAC-AAC-TTC-ACC-CTG-AGC-TTC 3`
rev M13b	5` G-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-ATG-ATT-ACG-CC 3`
P1_PrPY224	5` TAT-TAC-GAC-GGG-AGA-AGA-TCC 3`
P30_E21	5` CTC-CAG-GTG-GCT-GGC-GCT-CAC-CTT-G 3`
BS_MCS-Not I	5` G-TGG-CGG-CCG-CTC-TAG-AAC-TAG-TGG 3`
Del-	5` TCC-CCA-GCA-TGT-AGC-CAC-CAA-GG 3`
3`NC	5` CCC-TCC-CCC-AGC-CTA-GAC-CAC-GA 3`
Mut 217	5` CCT-GGG-ACT-CCT-TCT-GGT-ACC-GGG-TGA-CGC 3`
Sig 1	5` TAT-GTG-GAC-TGA-TGT-CGG-CC 3`
P3	5` ATT-CGC-AGC-GCA-TCG-CCT-TCT-ATC-GCC 3`
P10	5` GTA-CCC-ATA-ATC-AGT-GGA-ACA-AGC-CCA-GC 3`

2.1.16 Aminosäuresequenzen

P30 Th-Epitop	FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE
---------------	-----------------------

2.1.17 Tiere

Für die Immunisierungen wurden 10 Wochen alte Mäuse verwendet. Diese Mäuse wurden am Institut für Virologie und Immunbiologie gezüchtet oder von anerkannten Zuchteinrichtungen bestellt.

2.1.17.1 Prion-Protein defiziente *Prnp*^{0/0}-Mäuse

Es wurden PrP-defiziente Mäuse untersucht, deren *Prnp*-Gen durch eine Insertion zerstört wurde (Bueler et al., 1992). Diese Mäuse sollten einen entscheidenden Anhaltspunkt für die Funktion von PrP^C liefern. *Prnp*^{0/0}-Mäuse entwickeln sich normal, sind fertil und besitzen eine Lebenserwartung, die mit wildtypischen Mäusen vergleichbar ist. Es konnten bei diesen Tieren keine Auffälligkeiten in der Physiologie oder im Verhalten festgestellt werden, lediglich eine geringe Störung im Schlaf-Wach-Rhythmus wurde berichtet (Tobler et al., 1997). *Prnp*^{0/0}-Mäuse sind vollständig resistent gegen Prionen. Das Ausschalten der *Prnp*-Gens erfolgte durch Insertion eines Neomycin-resistenten Gens in den offenen Leserahmen (ORF).

2.1.17.2 C57BL/6-Mäuse

C57BL/6 Mäuse sind wildtypische Inzuchttiere, die das zelluläre Prion-Protein (PrP^C) exprimieren. Sie wurden in dieser Arbeit als Wildtypiere für den Toleranzbruch eingesetzt.

2.1.17.3 *Prnp*^{Tga20}-Mäuse

Bei diesen Mäusen handelt es sich um transgene Tiere, die PrP^C stark überexprimieren (etwa 10x) und bei denen das murine *Prnp*-Gen auf einem *Prnp*^{0/0}-Hintergrund wieder eingeführt wurde (Fischer et al., 1996). Durch das Vorhandensein und die Überexpression von PrP^C, sind diese Mäuse sehr empfindlich für Prionen und zeigen eine deutlich verkürzte Inkubationszeit im Vergleich zu Wildtypieren. *Prnp*^{Tga20}-Mäuse werden deshalb für den Bioassay genutzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimentelle Methoden

2.2.1.1 Betäubung der Mäuse mit Ether

Für die Immunisierungen, Inokulationen und die retroorbitale Blutentnahme reichte es aus, die Mäuse für eine relativ kurze Zeit zu narkotisieren. Die Betäubung erfolgte deshalb mit Ether. Hierfür wurden die Tiere in einen Glastopf gesetzt, in dem ein mit Ether getränktes Tuch lag. Sobald die Mäuse eine flache Atmung aufwiesen, erfolgte die Applikation oder Blutentnahme.

2.2.1.2 Injektionen von rekombinantem Prion-Protein

Die Proteinimmunisierung erfolgte subkutan. Hierbei wurden die Mäuse narkotisiert und das Protein-Adjuvants-Gemisch wurde in die Nackenhautfalte appliziert. Das Injektionsvolumen betrug 50 μ l. Die Immunisierung wurde 4mal im Abstand von 4 Wochen wiederholt.

2.2.1.3 Injektionen der unterschiedlichen Plasmid-DNAs

Die Gabe der bakteriellen Plasmidvektoren, die für das rekombinante Protein kodierte oder der leere Vektor, der als Kontrolle diente, erfolgte intradermal (i.d.). Vor der Immunisierung wurde die laterale Flanke mit einem Kurzhaarschneider rasiert. Für die Injektion wurden Tuberkulinspritzen verwendet. Bei der Immunisierung wurde zwischen Daumen und Zeigefinger eine Hautfalte der lateralen Flanke fixiert und die Kanüle nahezu horizontal in die Haut eingeführt. Das injizierte Volumen betrug 50 μ l. Vier Wochen danach wurde die Immunisierung wiederholt. Insgesamt wurden 6 Immunisierungen durchgeführt. Die vierte und fünfte Wiederholungsimmunisierung erfolgte subkutan (s.c.).

2.2.1.4 Blutentnahme und Serumgewinnung

Für die Untersuchung der humoralen Immunantwort wurde den Mäusen 10 Tage nach Immunisierung unter Ethernarkose Blut aus dem retroorbitalen Plexus entnommen und auf Prion-Protein-spezifische Antikörper untersucht. Die dazu

verwendete Kapillare war mit Heparin beschichtet, um eine Hämagglutination zu verhindern. Bei Versuchsende erfolgte die Blutentnahme durch Herzpunktion. Das Blut wurde direkt in Röhrchen (serum separator tubes, Mikrotainer) überführt und zentrifugiert (5 Minuten, 6000upm). Die Röhrchen wurden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.2.1.5 Intraperitoneale RML Inokulation und Bioassay zum Prionennachweis

Die periphere Inokulation (intraperitoneal) wurde mit 100µl (3log LD₅₀) RML in immunisierten C57BL/6-Mäusen durchgeführt.

Die Inokulation zum Nachweis von Infektiosität erfolgte nach Herstellung von Milzhomogenaten (1%) der immunisierten und infizierten Wildtypiere, die anschliessend intracerebral in *Prnp*^{Tga20}-Mäuse injiziert wurden.

2.2.1.6 Herzpunktion und Organentnahme

Für die Herzpunktion wurden die Mäuse euthanasiert. Es erfolgte im weiteren Verlauf die Öffnung des Thorax und eine Punktion der rechten Herzkammer für die Blutentnahme. Nach der Herzpunktion wurde die Milz entfernt und in ein Schälchen mit RPMI Medium auf Eis überführt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Agarose-Gel-Elektrophorese, Gelextraktion

Zur Auftrennung von DNA wurden Agarose-Gele (1–2%) verwendet. In TAE gelöste Agarose wurde in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen wurde das Gel in den dafür vorgesehenen Gelschlitten gegossen. Die DNA wurde in Wasser gelöst und mit Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei ca. 5-10V/cm Gellänge in TAE-Puffer.

Nach dem Lauf wurde das Gel in ein Ethidiumbromidbad überführt, damit das Ethidiumbromid in die DNA interkalieren, und diese somit später unter UV-Licht (366nm) sichtbar gemacht werden kann.

Für Klonierungen wurden die entsprechenden Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem Gel-Extraktions-Kit von Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers eluiert.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmungen von DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren lässt sich photometrisch bei 260nm (Wellenlänge, bei der Licht am stärksten durch DNA absorbiert wird) bestimmen. Hierbei wird die DNA in eine wässrige Lösung gebracht und die Extinktion bestimmt. Eine OD-Einheit entspricht 50mg/ml doppelsträngiger DNA. Die Bestimmung des Reinheitsgrades der DNA ist für weitere Arbeiten sehr wichtig. Da nicht nur DNA bei 260nm Licht absorbiert, sondern auch Phenol und Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten, wird die Probe ebenfalls bei 280nm gemessen. Der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der DNA. Die DNA kann als sauber gewertet werden, wenn dieser Quotient zwischen 1,7 und 2,0 liegt, höhere oder niedrigere Werte sprechen für Verunreinigungen.

2.2.2.3 Plasmidpräparation aus *E. Coli*

Für die Präparation der unterschiedlichen Plasmide wurde der Qiagen "Plasmid Mega Kit" verwendet. Hierbei wurde, wie vom Hersteller angegeben, verfahren. Es wurde eine 500ml Bakterienkultur, die mit dem entsprechenden Plasmid transformiert worden war, über Nacht unter Selektionsdruck durch Ampicillin bei 37°C geschüttelt und die Bakterien am nächsten Morgen abzentrifugiert (15 Min., 4°C, 6000upm). Das Pellet wurde in 50ml Puffer 1 resuspendiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe der gleichen Menge von Puffer 2. Das Gemisch wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Neutralisation erfolgten die Zugabe von 50ml des Puffers 3 und die Inkubation auf Eis für 30 Min.. Danach wurde die Probe für eine Stunde bei 11000upm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde anschließend auf eine äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde dann mit 200ml Waschpuffer gewaschen und die DNA mit 35ml Elutionspuffer eluiert. Es erfolgte die Präzipitation des Eluats mit Isopropanol und die Zentrifugation für eine Stunde bei 4000upm und 4°C. Die gefällte DNA wurde

mit 7ml 70%igen Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nachdem das Pellet getrocknet war, wurde die DNA in doppelt destilliertem Wasser gelöst und die Konzentration spektrometrisch bestimmt.

2.2.2.4 Restriktionsverdau

Der Verdau von doppelsträngiger DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen, die in dem vom Hersteller empfohlenen Puffern sequenzspezifisch schneiden. Bei den Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme, handelt es sich meist um palindromische Sequenzen. Restriktionsenzyme können DNA an den komplementären Strängen um einige Nukleotide versetzt schneiden, so dass 3'- oder 5'-Überhänge entstehen (klebrige Enden), oder sie schneiden die Stränge an der gleichen Stelle, so dass glatte Enden ohne Überhang entstehen (stumpfe Enden). Der Restriktionsverdau wurde zum einen als analytische Kontrolle der DNA auf bekannte Schnittstellen oder präparativ zur Klonierung durchgeführt.

Die Aktivität der meisten Restriktionsenzyme wird an Lambda DNA definiert. 1U Enzym schneidet 1µg Referenz-DNA in 1 Std. (meist bei 37°C) im zugehörigen Puffer vollständig.

Um einen vollständigen Verdau für Klonierungen zu gewährleisten, wurde dieser in der Regel mit einem Überschuss an Restriktionsenzym oder über Nacht durchgeführt.

2.2.2.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Da bei der Ligationsreaktionen die Religation von Vektorfragmenten verhindert werden soll, wird das linearisierte DNA-Fragment an den 5'-Enden mit Alkalischer Kälberdarmphosphatase (CIAP, "calf intestine alkaline phosphatase") dephosphoryliert. Es wurden 10U der CIAP nach beendetem Restriktionsverdau hinzugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Da das Enzym in den meisten gängigen Restriktionspuffern aktiv ist, erfolgte kein Pufferwechsel. Die Reaktion wurde durch EDTA pH 8,0 (Endkonzentration 5mM) und Hitzeinaktivierung (10 Min. bei 75°C) gestoppt.

2.2.2.6 Phosphorylierung von DNA Fragmenten

Für die Klonierung von sehr kurzen Fragmenten wurden synthetische Oligonukleotide mit Polynukleotid-Kinase entsprechend den Herstellerangaben (NEB) phosphoryliert, äquimolar gemischt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert und dann langsam abgekühlt, um die DNA-Doppelstränge auszubilden.

2.2.2.7 Glätten überhängender Enden

Zum Glätten überhängender Enden wurde die T4 DNA-Polymerase genutzt. Dieses Enzym ist in der Lage 5'-Überhänge aufzufüllen und 3'-Überhänge zu glätten, da die T4 DNA-Polymerase über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität verfügt. Für beide Reaktionen werden Nukleotide benötigt. Die DNA wurde mit der T4 DNA-Polymerase, den Nukleotiden und dem dazugehörigen Puffer 5 Min. bei 37°C inkubiert und anschließend erfolgte die Inaktivierung der Polymerase durch 10-minütiges Erhitzen bei 75°C.

2.2.2.8 Ligation

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurde T4 DNA-Ligase verwendet. Das Verhältnis Vektor zu Insert-Fragment betrug in der Regel 1:3. Die Ligation erfolgte in 20µl Ansätzen mit 10U T4-DNA-Ligase und dem dazugehörigen Puffer. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde immer die Religation des präparierten Vektorfragments verglichen.

2.2.2.9 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Für die chemische Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurden diese einer Behandlung mit $\text{CaCl}_2/\text{RbCl}_2$ ausgesetzt, um so die große Effizienz für die Aufnahme von Plasmid-DNA zu erhöhen. Die verwendeten Bakterienstämme wurden aus einem Glycerinstock in 5ml LB Medium überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag erfolgte das Animpfen einer 100ml LB Kultur mit 1ml der Übernachtskultur. Das Wachstum der Kultur wurde photometrisch kontrolliert und bei einer OD_{595} zwischen 0,2 und 0,3 gestoppt. Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Bakterienkultur wurde 5 Min. inkubiert

und anschließend bei 4°C für 10 Min. und 2500upm pelletiert. Das entstandene Pellet wurde in 8ml Transformationspuffer I aufgenommen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 2ml Transformationspuffer II resuspendiert. Es erfolgte nun eine 15-minütige Inkubation auf Eis und die Aliquots dieser Bakterienlösung wurden danach in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2.10 Transformation von Plasmiden in *E. Coli* Bakterien

Das Ziel der Transformation ist es das Plasmid zu vermehren, in dem es durch kompetente Bakterien aufgenommen und repliziert wird. Bei der in dieser Arbeit verwendeten chemischen Transformation, werden die Bakterien durch chemische Behandlung für die Plasmidaufnahme kompetent gemacht, damit diese das Plasmid mittels Hitzeschock aufnehmen. Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und zu einer 100µl Bakteriensuspension wurden 10µl des Ligationsansatzes gegeben und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des Ansatzes für 90 Sek. bei 42°C (Hitzeschock) und für weitere 5 Min. auf Eis. Nach Zugabe von 900 ml LB-Medium wurde die Suspension für 1 Std. bei 37°C geschüttelt. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 6000upm für 10 Min. und das Pellet wurde in 100µl LB Medium resuspendiert und auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

Eine weitere Form der Transformation, ist die Quicktransformation. Diese wurde für die Anzucht präparativer Plasmid-DNA in Bakterien genutzt. Hierbei wurden ebenfalls Bakterien auf Eis aufgetaut und zu einem 50µl Bakteriengemisch wurden 0,5µg Plasmid-DNA zugegeben. Nach einer Inkubation von 5 Min. auf Eis, wurde der gesamte Ansatz auf vorgewärmten Agarplatten ausplattiert.

2.2.2.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden erfolgte mit Hilfe des Applied Biosystems Ampli Taq Big Dye Cycle Sequenzierung Kits. Hierbei werden in einer PCR-Reaktion mit einem Oligo und mit ddNTPs, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, nach der Sanger Sequenziermethode verschieden lange Fragmente

vom Oligoende mit jeweils verschiedenen Endmarkierungen hergestellt. Die Reaktion wird durch die AmpliTaq FS-Polymerase katalysiert.

Die Reinigung der PCR-Reaktion erfolgte mit dem Qiagen Dye Ex Kit über eine chromatographische Säule. Hierbei wurden die nicht-eingebauten, markierten dNTPs, entfernt. Die Proben wurden mit 2 Volumen Hi-Di Formamid versetzt und bis zur Analyse mit dem Kapillarsequenziergerät bei 4°C gelagert.

2.2.2.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient der Amplifikation eines definierten DNA-Abschnittes. Die Spezifität wird durch die Hybridisierung der Primer mit den denaturierten DNA-Strängen erreicht. Bei der zyklischen DNA-Synthese laufen folgende Stufen ab. Zuerst erfolgt ein Schmelzen der DNA durch Temperaturerhöhung, danach hybridisieren die Starter-Oligonukleotide (Primer) an die Zielsequenz für die Synthese der komplementären DNA-Stränge. Für den Start des nächsten Zyklus wird die Temperatur wieder erhöht. Die Menge des gewünschten Produktes steigt während der Reaktion exponentiell an bis ein Plateau erreicht ist. Bei PCR-Reaktionen, in denen nicht die Qualität entscheidend ist, da sie nur zur analytischen Kontrolle dienen, wurde die Taq-Polymerase verwendet. Für Reaktionen bei denen das PCR-Produkt in Klonierungen eingesetzt werden sollte, wurde die Pfu-Polymerase verwendet, da diese über eine Korrekturaktivität verfügt. Die Pfu-Polymerase besitzt eine deutlich höhere Temperaturstabilität als Taq und eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die eine Korrekturaktivität erlaubt. Die entstandenen Amplifikationsprodukte besitzen keine Basenüberhänge, sondern glatte Enden.

PCR Programm

1 Zyklus	95°C	5 Min.	Denaturierung
20-35 Zyklen	95°C	1 Min.	Denaturierung
	48-70 °C	1 Min.	Hybridisierung
	72 °C	1 Min. pro 1000 bp	Extension
1 Zyklus	72 °C	10 Min.	Extension

2.2.2.13 Klonierung von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte zu klonieren, wurden mit Hilfe von Primern Schnittstellen eingebaut, das PCR-Produkt mit den entsprechenden Enzymen verdaut und als Fragment in eine Ligation eingesetzt. Wichtig bei solchen Klonierungen ist ein ausreichender Basenüberhang zwischen Erkennungsstelle des Restriktionsenzym und DNA-Ende.

2.2.3 Zellbiologische und proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Kultivierung von eukaryotischen Zellen erfolgte nach Standardmethoden. Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um Adhäsionskulturen, die in Zellkulturflaschen kultiviert wurden. Die Kultivierung erfolgte in Begasungsbrutschränken bei 37°C und 5% CO₂. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt. Die Zellen wurden in Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit alle 3-4 Tage zwischen 1:5 und 1:10 verdünnt. Die Ablösung erfolgte durch Zugabe einer Trypsin/EDTA Lösung. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen mit sterilem PBS gewaschen und die Zellen anschließend abgelöst. Nach Einstellung der gewünschten Zellzahl wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt.

2.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl mit dem Hämazytometer nach Neubauer

Die Anzahl der Zellen wurde mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, wurde eine Zellprobe mit Trypanblau verdünnt. Dieser Farbstoff wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, während tote Zellen dunkelblau gefärbt werden. Für einige Versuche wurden nur die Lymphozyten gezählt. Diese lassen sich anhand ihrer Morphologie von größeren Zellen wie beispielsweise Monozyten unterscheiden. Die Zellen wurden in allen vier Großquadraten des Hämazytometers ausgezählt und die Mittelwerte gebildet. Die Zellzahl pro ml Suspension kann mit folgender Formel errechnet werden:

$\text{Zellzahl pro ml} = \text{mittlere Zellzahl pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$

2.2.3.3 Einfrieren von Zellen

Für die Langzeitlagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff musste dem Medium ein Gefrierschutzmittel zugesetzt werden, um die Bildung von Eiskristallen zu verhindern, die eine Zerstörung der Zellen verursachen würden. Hierfür wird meist Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet, das jedoch auf stoffwechselaktive Zellen toxisch wirkt. Alle Arbeitsschritte wurden deshalb zügig auf Eis durchgeführt.

Die einzufrierenden Zellen wurden sedimentiert und in kaltem FCS resuspendiert. Die Suspension wurde im Verhältnis 1:2 langsam mit kaltem Einfriermedium gemischt und in einem Volumen von jeweils 1 ml auf Einfrieröhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden in eine Einfrierbox überführt, die für 24 Stunden bei -80°C gelagert wurde. Dabei sorgte die durch Isopropanol gekühlte Einfrierbox für eine schonende Erniedrigung der Temperatur um ca. 1°C pro Minute. Anschließend wurden die Zellen in der Gasphase über flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert.

2.2.3.4 Transiente Transfektion von Eukaryotenzellen durch Calciumphosphat-Präzipitation

Bei der Transfektion wurde Plasmid-DNA in 293T Zellen überführt, um eine transiente Genexpression in den Zielzellen zu erreichen. In dieser Arbeit wurde die Calciumphosphat-Transfektion genutzt, um zu zeigen, dass das vom Plasmid exprimierte Prion-Protein an die Zelloberfläche transportiert wird.

Am Tag vor der Transfektion wurden 2×10^6 Zellen in 6cm Kulturschalen von Nunc plattiert. 30 Min. bis 2 Std. vor der Transfektion wurde das Medium abgenommen und durch neues vorgewärmtes Medium ersetzt. Während dieser Zeit erfolgte die Herstellung des Calciumphosphat-DNA-Präzipitats. $15\mu\text{g}$ des jeweiligen Expressionsplasmides wurden mit Wasser auf ein Endvolumen von $438\mu\text{l}$ gebracht und mit $62\mu\text{l}$ CaCl_2 gemischt. Zu diesem DNA-Plasmid-Calciumchlorid-Gemisch wurden $500\mu\text{l}$ 2x HBS unter permanentem Einblasen von steriler Luft gegeben. Dadurch entsteht ein feines DNA-Calciumphosphat-Präzipitat, welches von den Zielzellen besser aufgenommen werden kann und somit die Transfektionsrate erhöht. Das entstandene Präzipitat wurde anschließend tropfenweise auf die zu transfizierenden Zellen gegeben und für 6-10 Stunden auf den Zellen belassen. Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Zellen mit

frischem vorgewärmten Kulturmedium versorgt. Am nächsten Tag erfolgte für 8-12 Stunden eine Induktion durch Natriumbutyrat, das den CMV-Promotor der Plasmide stimuliert und so die Expressionsrate des Proteins erhöht. Nach dieser Zeit wurden die Zellen erneut mit frischem Medium versorgt und am nächsten Tag für den jeweiligen Verwendungszweck bereitgestellt.

2.2.3.5 Durchflußzytometrische Analyse (FACS)

Bei der FACS-Analyse werden Antigene auf der Oberfläche oder innerhalb der Zelle mit fluoreszenz-markierten Antikörpern nachgewiesen.

Im FACS-Gerät befindet sich eine Trägerflüssigkeit ("sheath fluid"), in die die Probe in Form einer Zellsuspension eingeführt wird. Durch die höhere Strömungsgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit können die Zellen vereinzelt werden und in einer fixen Position am Laserlicht vorbeigeführt werden. Das Argon-Laserlicht führt zu einer Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe, die wiederum Fluoreszenzlicht emittieren. Dieses emittierte Licht kann durch verschiedene Photozellen detektiert werden. Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen handelte es sich um Fluoreszinoisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Cychrome (Cy). Diese Farbstoffe werden von blauem Laserlicht zur Fluoreszenz angeregt, besitzen allerdings unterschiedliche Emissionsspektren, die partiell überlappen. Diese überlappenden Bereiche können elektronisch ausgeblendet werden (Kompensation), um eine scharfe Trennung der einzelnen Farben zu erreichen. Die Auswertung der erfassten Daten erfolgt über einen Computer mit der Software Cell Quest (BD) und kann auf verschiedene Weise dargestellt werden (morphologisch: "Vorwärts-Streulicht" FSC, liefert Informationen über die Größe der Zellen; "Seitwärts-Streulicht" SSC, liefert Informationen über die Granularität der Zellen; oder nach Fluoreszenzparametern).

2.2.3.6 Herstellung von Zelllysaten

Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS einmal gewaschen und anschließend mit Lysispuffer, der Proteinaseinhibitoren enthielt, behandelt. Um die Zellen abzulösen wurde ein Zellschaber benutzt, die Lysate in Reaktionsgefäße überführt und bei

14000upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein anderes Gefäß überführt, mit 2x Protein-Probenpuffer versetzt und für 5 Min. bei 95°C gekocht. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.2.3.7 Proteinbestimmung nach Bradford

Der quantitative Nachweis gelöster Proteine erfolgte photometrisch mit Hilfe des Bradfordreagenz der Firma Biorad. Als Standard und zur Erstellung einer Eichkurve wurde BSA in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Die zu bestimmenden Proteine wurden in zwei verschiedenen Verdünnungen gemessen und anhand der Eichkurve konnte die genaue Konzentration bestimmt werden.

2.2.3.8 SDS-PAGE Elektrophorese

Nach Laemmli wurden denaturierte Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes über SDS-Gele aufgetrennt. Verwendet wurden hierfür Glycin-Gele der Firma Biozym. Vor dem Laden wurden die Taschen sorgfältig gespült, während die Proben im Auftragspuffer aufgekocht wurden (10 Min., 95°C). Nach der Elektrophorese bei 40mA wurde das Gel auf eine PVDF Membran geblottet.

2.2.3.9 Präzipitation von PrP^{Sc} aus der Milz

Die Präzipitation von PrP^{Sc} erfolgte in Anlehnung an das publizierte Protokoll von Safar et al. (1998). Die Milzen der infizierten Tiere wurden entnommen und in PBS homogenisiert. Es folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration und 200µg Totalprotein wurden mit 4%igem Sarkosyl versetzt im Volumenverhältnis 1:1. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 37°C wurden die Proben mit Benzonase versetzt, um RNA/DNA zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden die Proben mit Proteinase K (PK) verdaut, um spezifisch PrP^{Sc} zu präzipitieren. Nach dem PK-Verdau sind die Milzhomogenate mit Natrium-Phosphotungstate versetzt (NaPTA) worden. NaPTA bildet Komplexe mit Aggregaten und Polymeren von PrP^{Sc} und PrP²⁷⁻³⁰, aber nicht mit PrP^C. Nach der Zentrifugation bei 14000upm für 30 Minuten befinden sich zu 99% Prionen im Pellet und nur zu 1% andere Proteine. Das Pellet wurde in 20µl 0,1%igem Sarkosyl resuspendiert und mit

Protein-Lade-Puffer versetzt. Nach einer Inkubation bei 95°C für 10 Minuten konnten die Proben im Westernblot analysiert werden.

2.2.3.10 Westernblot, Immunodetektion

Um Proteine spezifisch mit Antikörpern nachweisen zu können, wurden die Gele zunächst auf eine PVDF Membran, die vorher durch Methanol aktiviert wurde, geblottet (1,5 Std., 350mA). Nach dem Blotten wurde die Membran zunächst für 1 Std. mit 5% Milchpulver in TBST geblockt, damit unspezifischen Bindungen abgesättigt werden konnten. Alle Inkubationen erfolgten auf einem Schüttler oder in einem 15ml Falconröhrchen auf einem Rollinkubator. Die Membran wurde dann über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper (Serum: 1:1000; monoklonaler Antikörper gegen PrP 6H4: 1:10000) in TBST inkubiert. Nach gründlichem Waschen in TBST (3mal je 10 Min.) wurde der primäre Antikörper mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpers (1 Std. bei Raumtemperatur; Verdünnung: 1:10000) markiert. Der ungebundene Zweitantikörper wurde gründlich mit TBST abgewaschen (5mal 10 Min.), bevor der Blot in ECL-Reagenz entsprechend den Herstellerangabe (Pierce, Rockford) entwickelt wurde.

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 Präparation von Lymphozyten aus der Milz

Die Milzen der immunisierten Tiere wurden isoliert und jeweils in 5ml eiskaltem RPMI Medium aufgenommen. Die Organe wurden anschließen durch ein 70µm Nylonsieb gerieben, mittels einer Pipette resuspendiert und erneut durch ein Nylonsieb gefiltert. Danach wurde die Zellsuspension bei 1500upm abzentrifugiert.

2.2.4.2 Lyse von Erythrozyten mit Ammoniumchloridpuffer

Da Erythrozyten ein großer Bestandteil der Milz sind und sowohl bei der Bestimmung der absoluten Zellzahl als auch bei der Ausführung durchflusszytometrischer Analysen stören, erfolgte eine Erythrozytenlyse mit 0,16M Ammoniumchlorid. Für die Lyse wurde das nach Zentrifugation entstandene Pellet in 5ml Ammoniumchlorid resuspendiert und für 5 Min. inkubiert.

Nach dieser Inkubation wurden 5ml RPMI dazugegeben, und die Zellen bei 1500upm erneut zentrifugiert.

2.2.4.3 Radioaktiver Proliferationsassay

Die Proliferation von Lymphozyten kann *in vitro* anhand des Einbaus von ³H-markiertem Thymidin in sich replizierende DNA von kultivierten Zellen gemessen werden. Durch Thymidininkorporation ist also die quantitative Bestimmung der DNA-Synthese, die direkt proportional zur Teilungsrate ist, möglich.

Für diese Arbeit wurde die spezifische Proliferation der Lymphozyten aus den Milzen der immunisierten Mäusen untersucht. Hierfür wurden 3×10^5 Lymphozyten pro Well in einer 96-Rundbodenplatte ausgesät und mit dem Antigen (z.B. rekombinantes Maus Prion-Protein) stimuliert. Nach einer Inkubation von 48 Std. wurden 0,5µCi ³H-Thymidin pro Well hinzugefügt, so dass die Aufnahme des Nukleotids während nochmaliger Inkubation für 16 Stunden erfolgen konnte. Anschließend wurden die Zellen durch einen Harvester auf Filterpapier transferiert. Nach dem Trocknen des Filterpapiers erfolgte die Auswertung mittels Scintillationszählers, der die inkorporierte Radioaktivität bestimmte und die Ereignisse in cpm (counts per minute) angab. Jede Bestimmung wurde im Vierfachansatz durchgeführt.

2.2.4.4 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Für diese Methode wurden Platten mit anti-CD3 über Nacht beladen und am nächsten Tag mit PBS gewaschen. Die Lymphozyten der immunisierten Mäuse wurden auf die Platte gebracht und durch Kostimulation mit CD28 werden die T-Zellen aktiviert, und die Freisetzung von Zytokinen in der Zelle erfolgte. Damit die Zytokine nicht aus der Zelle ausgeschleust werden konnten, wurde Brefeldin A verwendet, dass den intrazellulären Transport blockiert und so eine Akkumulation der meisten Zytokine im rauen endoplasmatischen Retikulum oder Golgi-Komplex stattfindet. Die Zellen wurden für 5 Std. stimuliert und anschließend für die FACS-Analyse in entsprechenden Röhrchen geerntet. Um nicht-spezifische Färbungen zu vermeiden, wurde zusätzlich eine Blockierung von Immunglobulin-Rezeptoren

(Fc-Rezeptoren) durchgeführt. Danach erfolgte die Färbung der Oberflächenmarker CD8 oder CD4. Die Zellen wurden gewaschen, zentrifugiert und anschließend fixiert und permeabilisiert. Nach Permeabilisierung erfolgte die Färbung für die unterschiedlichen Zytokine. Für die Th1-Antwort wurden IL-2, TNF α und IFN γ ; und für die Th2-Antwort IL-4 und IL-10 untersucht. Die Zellen wurden erneut gewaschen und anschließend im FACS ausgewertet.

2.2.4.5 ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay)

Für die Bestimmung der humoralen Immunantwort wurde der ELISA benutzt. Hierfür wurden Flachbodenplatten mit rekombinanten Maus Prion-Protein (rek. mPrP) über Nacht beschichtet (50ng Protein in 100 μ l PBS pro Well) und am nächsten Morgen blockiert (200 μ l/Well 5% Milchpulver; 0,1% Tween in PBS), um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die Seren der immunisierten Tiere wurden in unterschiedlichen Verdünnungen auf spezifische Ig gesamt Antikörper oder auf Subtypen von IgG untersucht (IgG1 für Th2-Antwort und IgG2a für Th1-Antwort). Nach der Inkubation mit den Seren wurde die Platte gewaschen und mit dem jeweiligen Detektionsantikörper gegen Gesamtimmunglobuline (Ig), IgG1 oder IgG2a (100 μ l; 1:10000), die Peroxidase-gekoppelt sind, für weitere 2 Std. inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde TMB als Peroxidase-Substrat verwendet. Die Farbreaktion wurde nach 5-30 Min. mit 1M H₂SO₄ (50 μ l) abgestoppt und die Farbintensität photometrisch bei 450nm bestimmt. Es wurden immer Seren nicht immunisierter Mäuse als Negativkontrolle und ein monoklonaler Antikörper gegen das Prion-Protein als Positivkontrolle mitgeführt.

2.2.4.6 Bestimmung der Zytokine im Überstand

Für die Bestimmung der Zytokine im Überstand wurden wie für den Proliferationsassay Lymphozyten der immunisierten Mäuse in 96-Well-Platten ausgesät und mit rekombinantem murinem Prion-Protein (rek. mPrP) in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Nach 24 bzw. 48 Std. erfolgte die Abnahme des Überstandes, welcher mit Hilfe des Cytokine-Bead-Arrays (CBA Flex Set Systems; BD Biosciences) untersucht wurde. Bei diesem Kit können 5 Zytokine pro Ansatz gleichzeitig untersucht werden. Bei den Zytokinen handelte es

sich um IL-2, IL-5, IL-4, IFN γ und TNF α . Die Antikörper gegen die Zytokine wurden in Form von Beads zu 50 μ l des Überstandes gegeben. Die Beads für die Zytokine besitzen unterschiedliche Fluoreszenzenintensitäten, die im Durchflusszytometer identifiziert und gut voneinander getrennt werden können. Die Beads sind mit anti-Zytokin-Antikörpern beschichtet und binden so an die freien Zytokine im Überstand. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe der Detektionsantikörper, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) konjugiert sind. Die Antikörper binden ebenfalls an die Zytokine und machen diese im Durchflußzytometer detektierbar. Die Menge eines gebundenen Zytokins korreliert mit der Fluoreszenzintensität für PE. Es wurde ein Standard mit bekannter Zytokinkonzentration mitgeführt.

2.2.5 Immunohistochemie

Die Gewebe der mit RML inokulierten Tiere wurden nach Beendigung des Experiments entnommen, in 4% Paraformaldehyd aufgenommen und für die Immunohistochemie vorbereitet. Nach Fixierung erfolgte eine Inaktivierung der pathogenen Form des Prion-Proteins mit 99%iger Ameisensäure und die Gewebe wurden anschliessend zugeschnitten und in Kapseln überführt. Nach der Entwässerung der Proben, wurden Paraffinblöcke gegossen und die Schnitte an einem Mikrotom (Leica) in einer Dicke von 3-4 μ m pro Schnitt hergestellt. Nachdem die Präparate über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet wurden, erfolgte die Hämalaun-Eosin-Färbung oder die GFAP-Immunhistochemie.

2.2.5.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

1. Entparaffinieren

2 x 10 Min. Xylol

2 x 5 Min. 100% Ethanol

2 x 5 Min. 96% Ethanol

2 x 5 Min. 70% Ethanol

in A. dest. spülen

2.Färben

15 Min. Hämalaun

10 Min. unter fließendem Leitungswasser wässern

in A. dest. spülen

5 Min. Eosin

3. Entwässern

2 x kurz in 96% Ethanol

2 x 2 Min. in 100% Ethanol

2 x 10 Min. Xylol

Danach wurden die Präparate eingedeckt in Eukitt (Entellan) und im Durchlichtmikroskop ausgewertet und fotografiert.

2.2.5.2 GFAP-Immunhistochemie

Auch bei dieser Färbung wurden die Schnitte erst entparaffiniert. Um die Bindungsstellen für das gliale saure Faserprotein (GFAP) freizusetzen, wurden die Schnitte mit Citratpuffer behandelt und für 5 Min. in der Mikrowelle bei 530W gekocht. Danach wurden die Schnitte in TBS für 10 Min. abgekühlt und anschließend mit A. dest. gewaschen. Desweiteren musste die endogene Peroxidase mit H_2O_2 inaktiviert und die Schnitte mit Ziegenserum blockiert werden. Der erste Antikörper (anti-GFAP) wurde über Nacht in einer Verdünnung von 1:300 in Ziegenserum in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte in TBS gewaschen und mit dem biotinylierten sekundären Antikörper behandelt. Nach einem weiteren Waschschrift in TBS, erfolgte die Behandlung mit dem Streptavidin-HRP-konjugierten Antikörper. Die Schnitte wurden mit dem Substrat AEC entwickelt und anschließend mit Hämalaun gegengefärbt. Nach dem Wässern der Präparate unter fließendem Leitungswasser und anschließendem Spülen mit A. dest., wurden die Schnitte mit Eukitt und einem Deckglas abgedeckt und lichtmikroskopisch untersucht.

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, die humorale und zelluläre Immunantwort nach Protein- oder DNA-Immunisierung gegen das Prion-Protein in Mäusen zu analysieren. Da es sich beim Prion-Protein um ein körpereigenes Protein handelt, galt es zu untersuchen, ob es möglich ist, die Toleranz bei einer Immunisierung zu brechen. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde dieser Teil der Arbeit in drei Abschnitte gegliedert.

Im ersten Abschnitt werden die Ergebnisse der Proteinimmunisierung von *Prnp*^{0/0}- und C57BL/6-Mäusen dargestellt. Hierbei ging es um den Einfluss von Adjuvantien auf die zelluläre und humorale Immunantwort, sowie um die Etablierung der für den Nachweis einer Immunantwort erforderlichen Methoden.

Der zweite Abschnitt befaßt sich mit den Ergebnissen der DNA-Immunisierung der Mäuse. Hierbei ging es um den Einfluss eines T-Helfer-Epitopes des Tetanustoxins auf die Immunantwort und einen möglichen induzierten Toleranzbruch gegen das körpereigene Prion-Protein.

Im dritten Abschnitt wird die Kombination von DNA- und Proteinimmunisierung auf die zelluläre und humorale Immunantwort gegen das Prion-Protein in *Prnp*^{0/0}- und C57BL/6-Mäuse und deren Einfluss auf die Krankheitsausbildung der Mäuse *in vivo* beschrieben.

3.1 Immunisierung mit rekombinantem Maus-Prion-Protein

Für die Immunisierung wurden C57BL/6- und *Prnp*^{0/0}-Mäuse viermal mit rekombinantem Maus Prion-Protein (rek. mPrP) subkutan injiziert. Die Tiere erhielten 10µg Protein gemischt mit zwei verschiedenen Adjuvantien. Bei den Adjuvantien handelte es sich um inkomplettes Freundsches Adjuvants, welches im Verhältnis 1:2 zum Protein eingesetzt wurde, und CpG-1668, welches in einer Konzentration von 10µg eingesetzt wurde. Die dazugehörigen Kontrollen erhielten das jeweilige Adjuvants in PBS. Das Immunisierungsschema ist in Abbildung 4 dargestellt.

Ergebnisse

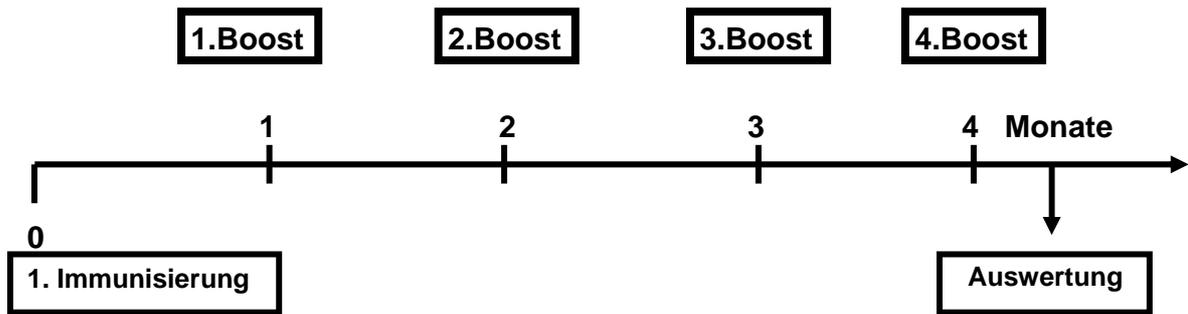


Abbildung 4: Immunisierungsschema für die Proteinimmunisierung

Den Mäusen wurde 10 Tage nach jeder Immunisierung retroorbital Blut für die Antikörperbestimmung entnommen. Nach dem letzten Boost wurden die Tiere getötet, die Milzen entnommen und immunologische Untersuchungen durchgeführt.

3.1.1 Untersuchung der induzierten Antikörper in den Seren der proteinimmunisierten Mäuse

Um die humorale Immunantwort zu untersuchen, wurde den Mäusen nach jeder Immunisierung Blut entnommen. Im Serum sollten spezifische Antikörper gegen das Prion-Protein mittels ELISA nachgewiesen werden.

Die Seren der Mäuse wurden auf Platten, die mit rekombinantem Maus-Prion-Protein beschichtet waren, getestet. Als Positivkontrolle diente der monoklonale Antikörper 6H4, der gegen die Helix-1-Region des Prion-Proteins gerichtet ist. Als Negativkontrollen wurden die Seren der Tiere genutzt, die nur Adjuvants ohne das Protein erhielten. In den *Prnp^{0/0}*-Mäusen wurden schon nach der ersten Immunisierung Antikörper gegen das Prion-Protein nachgewiesen. Die Antikörpertiter erhöhten sich nach jeder weiteren Immunisierung (Daten nicht gezeigt). Es konnten keine Unterschiede für die verschiedenen Adjuvantien im Hinblick auf Gesamtimmunglobuline (Ig gesamt) in *Prnp^{0/0}*-Mäusen festgestellt werden (Abbildung 5).

Nach Immunisierung von C57BL/6-Mäusen mit rek. mPrP konnten nur schwache Antikörpertiter detektiert werden (Abbildung 5).

Ergebnisse

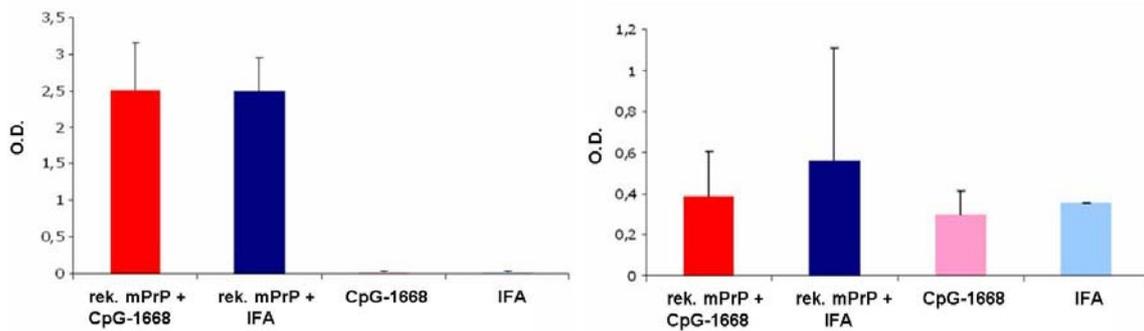


Abbildung 5: Anti-PrP^C Antikörper in *Prnp*^{0/0}- und C57BL/6-Mäusen nach Proteinimmunisierung

Darstellung der Mittelwerte der verschiedenen Immunisierungsgruppen der *Prnp*^{0/0}-Mäuse (links; rek. mPrP+IFA (n=8) oder rek. mPrP+CpG-1668 (n=8); IFA oder CpG-1668 (n=6)) nach der 5. Immunisierung. Die Seren wurden 1:5000 verdünnt. Darstellung der Mittelwerte der verschiedenen Immunisierungsgruppen der C57BL/6-Mäuse (rechts; rek. mPrP+IFA oder rek. mPrP+CpG-1668 (n=8); IFA oder CpG-1668 allein (n=7)). Die Seren wurden 1:40 verdünnt. Anti-Maus Gesamt Ig wurde für die Detektion genutzt.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die verwendeten Adjuvantien einen Einfluss auf die Th1/Th2 Polarisierung der Immunantwort haben. Es ist bekannt, dass CpG-ODN die Immunantwort in Richtung Th1 verschieben. Deshalb wurden die positiven Seren der immunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse auf die Subtypen IgG1 (Th2-Antwort) und IgG2a (Th1-Antwort) untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass nach Proteinimmunisierung mit CpG-1668 sowohl IgG1 als auch IgG2a Antikörper im gleichen Verhältnis im Serum der immunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse nachweisbar waren. Wenn allerdings IFA als Adjuvans genutzt wurde, kam es zu einer verstärkten IgG1 Antwort (Abbildung 6).

Bei Wildtyptieren wurde die Untersuchung auf IgG1/IgG2a nicht durchgeführt, weil die Antikörpertiter zu gering waren, um eine Ig-Subtypenanalyse durchzuführen.

Ergebnisse

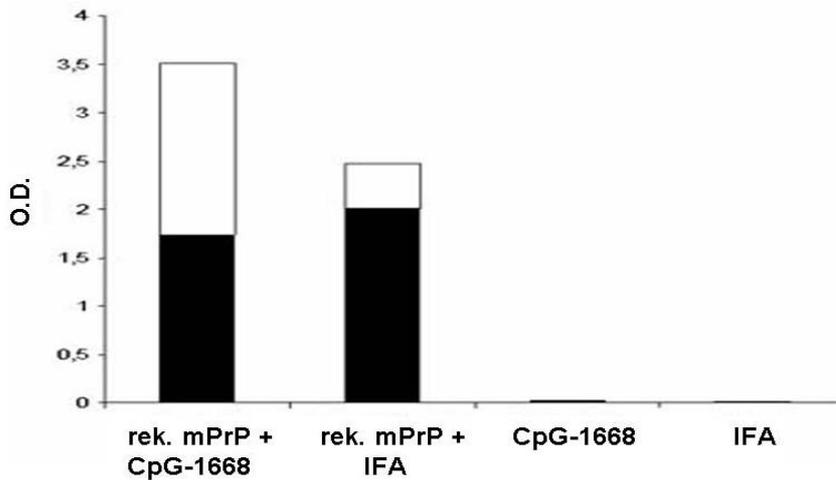


Abbildung 6: Anti-PrP^C Immunglobulinsubtypen in *Prnp*^{0/0}- Mäusen nach Proteinimmunisierung

Darstellung der Mittelwerte der verschiedenen Immunisierungsgruppen (rek. mPrP+IFA oder rek. mPrP+CpG-1668 n=8; IFA oder CpG-1668 n=6) nach der 5. Immunisierung. Die Seren wurden 1:5000 verdünnt. Für die Detektion wurde anti-Maus IgG1 (schwarzer Balken) und anti-Maus IgG2a (weißer Balken) verwendet.

3.1.2 FACS-Analyse der Seren von proteinimmunisierten Mäusen

Es konnte im ELISA gezeigt werden, dass es möglich war, Antikörper gegen das Prion-Protein in *Prnp*^{0/0}-Mäusen durch Proteinimmunisierung zu induzieren. Da beim ELISA rekombinantes Maus-Prion-Protein genutzt wird, muss im weiteren Verlauf untersucht werden, ob die Bindungseigenschaften der induzierten Antikörper für natives PrP vergleichbar sind. Deshalb sollte durch die FACS-Analyse gezeigt werden, ob die im Serum vorhandenen Antikörper die zelluläre Form des Prion-Proteins auf der Oberfläche von N2a-Zellen erkennen. Durch diese Untersuchung können auch strukturspezifische Antikörper detektiert werden. Die Analyse erfolgte mit dem A3-Klon der N2a Zellen, da dieser PrP^C überexprimiert. Für dieses Experiment wurden die Seren von *Prnp*^{0/0}-Mäuse in einer Verdünnung von 1:100 und die Seren von C57BL/6-Mäusen in einer Verdünnung von 1:50 auf die N2a Zellen gegeben. Die Detektion erfolgte mit einem FITC-gekoppelten anti-Maus-IgG Antikörper. Als Positivkontrolle wurde der monoklonale 6H4-Antikörper und als Negativkontrolle die Seren der nur mit Adjuvants immunisierten Tiere genutzt. Es zeigte sich, dass die Antikörper in den Seren der PrP-defizienten Tiere, das zelluläre Prion-Protein auf den Zellen erkannt und gebunden haben (Abbildung 7). Die Seren der C57BL/6-Mäuse, die im ELISA negativ für spezifische Antikörper gegen rek. Maus Prion-Protein getestet wurden,

Ergebnisse

waren auch im FACS negativ. Nur zwei Wildtyptiere aus der Gruppe mit IFA als Adjuvants, zeigten eine schwache Bindung (Abbildung 8). Diese Tiere zeigten auch im ELISA einen schwachen Antikörpertiter.

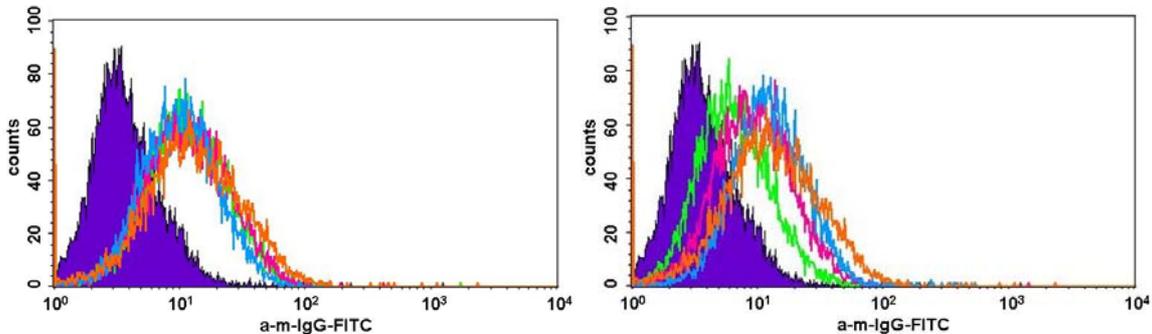


Abbildung 7: FACS-Analyse der Seren von *Prnp*^{0/0}-Mäusen nach Proteinimmunisierung auf N2a-Zellen

Die Histogramme in grün, blau und pink stehen für Seren einzelner *Prnp*^{0/0}-Mäuse, die mit rek. mPrP+IFA immunisiert wurden (links). Die Histogramme in grün, blau und pink stehen für Seren einzelner *Prnp*^{0/0}-Mäuse, die mit rek. mPrP+CpG-1668 immunisiert wurden (rechts). Als Positivkontrolle diente der 6H4-Antikörper (orangenes Histogramm; links und rechts). Das violett-gefüllte Histogramm ist die Negativkontrolle; Serum einer nur mit IFA immunisierten *Prnp*^{0/0}-Maus (links) oder Serum einer nur mit CpG-1668 immunisierten *Prnp*^{0/0}-Maus (rechts).

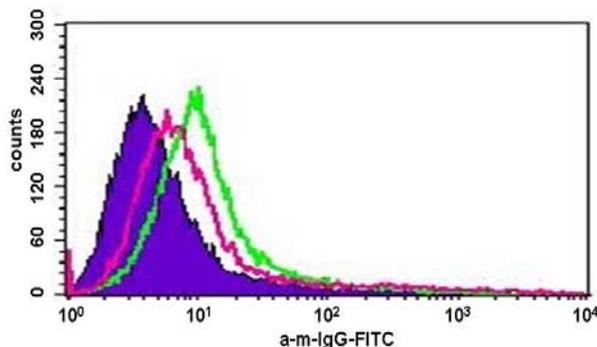


Abbildung 8: FACS-Analyse der Seren von Wildtyp-Mäusen nach Proteinimmunisierung auf N2a-Zellen

Das grüne und pinke Histogramm zeigt eine schwache positive Bindung der Antikörper aus rek. mPrP+IFA immunisierten C57BL/6-Mäusen an N2a-Zellen. Das Histogramm mit der violett-gefüllten Fläche steht für N2a-Zellen, die mit dem Serum einer mit IFA immunisierten C57BL/6-Maus inkubiert wurden, dies entspricht der Negativkontrolle.

3.1.3 Westernblot-Analyse der Seren von proteinimmunisierten Mäusen

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Antikörper in Seren von immunisierten Tieren die zelluläre Form des Prion-Proteins auf N2a-Zellen binden können. Im Folgenden soll nun gezeigt werden, ob diese Antikörper

Ergebnisse

auch in der Lage sind die pathogene Form des Prion-Proteins (PrP^{Sc}) im Westernblot zu erkennen. Hierfür wurden Gehirnhomogenate verschiedener Tiere lysiert. Es handelte sich dabei um Hirnhomogenate von *Prnp*^{0/0}-, die kein PrP^C besitzen, C57BL/6-, die die zelluläre Form des Prion-Proteins exprimieren, und von Scrapie erkrankten terminalen C57BL/6-Mäusen, die sowohl die zelluläre, als auch die pathogene Form des Prion-Proteins tragen. Das Gehirnhomogenat der an Scrapie erkrankten Maus wurde mit Proteinase K verdaut, um PrP^C abzubauen und so PrP^{Sc} spezifisch nachweisen zu können. Die Antikörper der Seren der immunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse waren in der Lage, sowohl an die zelluläre, als auch an die pathogene Form des Prion-Proteins zu binden (Abbildung 9). Die Seren der C57BL/6-Mäuse konnten dagegen weder PrP^C noch PrP^{Sc} binden (Daten nicht gezeigt).

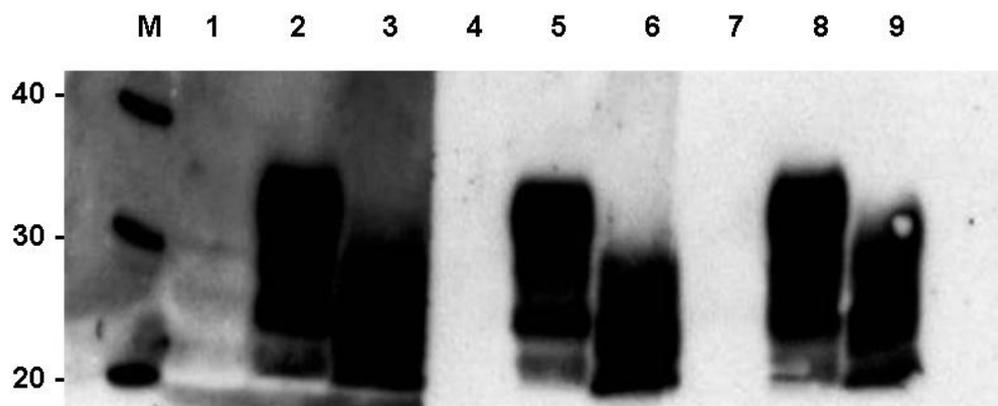


Abbildung 9: Westernblot-Analyse der Seren der proteinimmunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse

Die Gehirnhomogenate wurden in folgender Reihenfolge aufgetragen: *Prnp*^{0/0}- (1, 4, 7), C57BL/6- (2, 5, 8) und Scrapie-infiziertes C57BL/6-Gehirn (3, 6, 9). Der monoklonale 6H4 Antikörper wurde als Positivkontrolle genutzt. 6H4 (Spur 1-3); Serum einer *Prnp*^{0/0}-Maus immunisiert mit rek. mPrP+IFA (Spur 4-6); Serum einer *Prnp*^{0/0}-Maus immunisiert mit rek. mPrP+CpG-1668 (Spur 7-9)

3.1.4 Inhibition der PrP^{Sc} Akkumulation *in vitro* mit Seren der proteinimmunisierten Mäuse

Die Antikörper, die durch die Proteinimmunisierung in *Prnp*^{0/0}-Mäusen induziert wurden, waren in der Lage PrP^{Sc} und PrP^C zu binden. Um herauszufinden, ob die Antikörper die pathogene Form des Prion-Proteins nicht nur erkennen, sondern auch in der Lage sind die Akkumulation von PrP^{Sc} in Zellkultur zu inhibieren,

Ergebnisse

wurden PrP^{Sc} tragende N2a Zellen (ScN2a) mit den Seren der immunisierten Tiere über fünf Tage behandelt. An jedem zweiten Tag wurde das Medium gewechselt und mit Serum der *Prnp*^{0/0}-Tiere 1:100 versetzt. Am 5. Tag wurden die Zellen geerntet und mittels Westernblot ausgewertet. Alle getesteten Seren der *Prnp*^{0/0}-Mäuse waren in der Lage das PrP^{Sc}-Signal der Zellen zu verringern. In einigen Fällen konnte nach Behandlung der ScN2a-Zellen mit den Seren der proteinimmunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse kein PrP^{Sc} detektiert werden. (Abbildung 10).

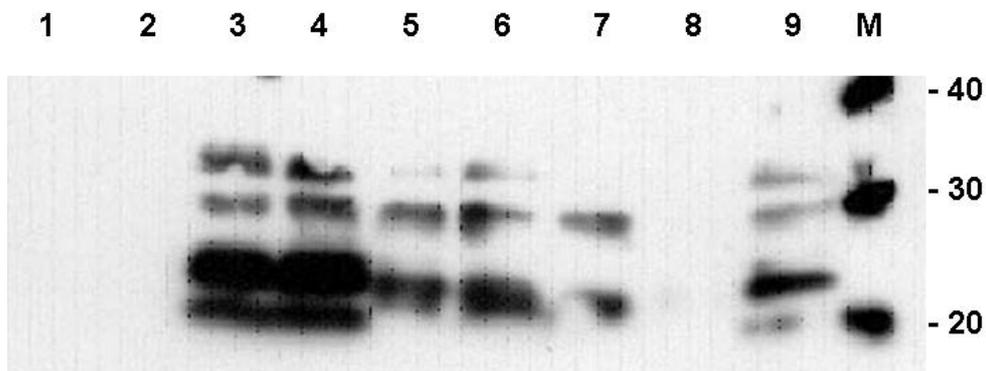


Abbildung 10: Western Blot der Zelllysate nach Behandlung der ScN2a mit Seren von *Prnp*^{0/0}-Mäusen

Die Seren wurden 1:100 mit Medium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Jede Spur steht für das Serum einer Maus. Negativ-Kontrollen waren Seren der Mäuse, die nur CpG-1668 oder nur IFA bekommen haben. Es wurden immer 150µg mit PK verdautes Totalprotein pro Spur aufgetragen. 1, 2 und 5 Seren von *Prnp*^{0/0}-Mäusen immunisiert mit rek. mPrP+CpG-1668; 6-9 Seren von *Prnp*^{0/0}-Mäusen immunisiert mit rek. mPrP+IFA; 3 Serum einer Kontrollmaus (nur IFA); 4 Serum einer Kontrollmaus (nur CpG-1668)

Der gleiche Versuch wurde ebenfalls mit Seren der C57BL/6-Mäuse, die mit rek. mPrP und CpG-1668 immunisiert worden waren, durchgeführt. Mit diesen Seren, die in einer Verdünnung von 1:50 verwendet wurden, konnte keine Verminderung des PrP^{Sc} Signals erzielt werden (Abbildung 11). Die Behandlung der ScN2a-Zellen mit den Seren der C57BL/6-Mäuse, die das rek. mPrP mit IFA erhalten hatten, zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die PrP^{Sc}-Akkumulation (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

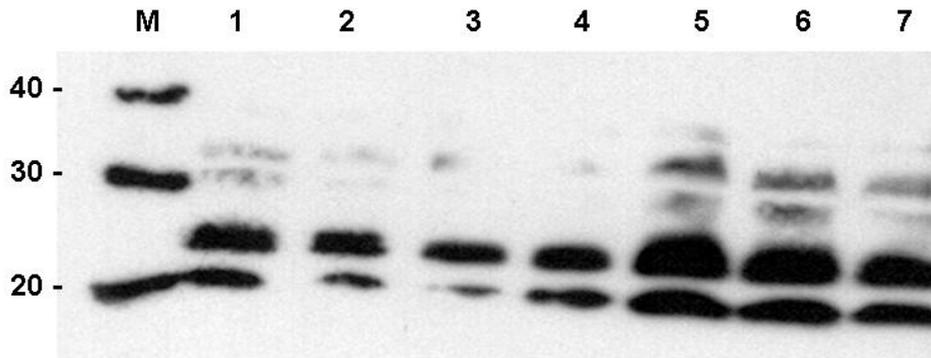


Abbildung 11: Westernblot der Zelllysate von ScN2a nach Behandlung mit Seren von C57BL/6-Mäusen

Die Seren wurden 1:50 mit Medium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Jede Spur steht für das Serum einer Maus. Es wurden immer 150µg mit PK verdautes Totalprotein pro Spur aufgetragen. 1-6 Seren von C57BL/6-Mäusen, die mit rek. mPrP+CpG-1668 immunisiert wurden; 7 Serum einer C57BL/6-Kontrollmaus die nur CpG-1668 erhielt. Negativkontrolle war das Serum einer Maus, die nur CpG-1668 bekommen hat.

3.1.5 Untersuchung der intrazellulären Zytokinantwort nach Proteinimmunisierung

Neben der humoralen sollte auch die zelluläre Immunantwort der proteinimmunisierten Mäuse untersucht werden. Diese wurde zuerst durch eine intrazelluläre Zytokinfärbung analysiert. Hierbei sollte gezeigt werden, ob durch die Immunisierung mit rek. mPrP eine T-Zellantwort induziert werden kann, und ob diese von den Adjuvantien beeinflusst wird. Für die Unterscheidung der T-Zellsubpopulationen Th1 und Th2 anhand ihres Zytokinmusters, wurden $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ (Th1) und IL-4 und IL-5 (Th2) als Markerzytokine verwendet. Die Analyse der Zytokine erfolgte nur für CD4^+ -Zellen, da bei einer Proteinimmunisierung keine CD8^+ -Zellen aktiviert werden. Alle angegebenen Werte der zytokinproduzierenden T-Zellen (in Prozent dargestellt) wurden aus Milzzellen bestimmt, die direkt *ex vivo* mit anti-CD3/CD28 restimuliert worden waren. Die Restimulation war nötig, da T-Zellen *ex vivo* zu wenig Zytokine produzieren, um eine zuverlässige Aussage über ihre Polarisierung machen zu können. Es konnte weder in den *Prnp*^{0/0}- noch in den C57BL/6-Mäusen IL-4- oder IL-5-positive Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). In den *Prnp*^{0/0}-Mäusen konnten $\text{TNF}\alpha$ -positive Zellen nachgewiesen werden. Es gab allerdings keine Unterschiede zwischen proteinimmunisierten Mäusen und den Kontrolltieren, die nur eines der beiden Adjuvantien bekommen haben (Abbildung 12). Bei den

Ergebnisse

proteinimmunisierten *Prnp^{0/0}*-Mäusen, die CpG-1668 als Adjuvants erhalten haben, konnte eine Erhöhung der CD4⁺-Zellen die für IFN γ positiv waren festgestellt werden, allerdings war diese nicht signifikant im Vergleich zu den nur mit CpG-1668 immunisierten Mäusen. Die Mäuse, die das rek. mPrP mit inkomplettem Freundschens Adjuvants erhielten, zeigten keine Veränderungen in ihrer Zytokinantwort verglichen mit der Kontrollgruppe, die nur mit IFA immunisiert worden war.

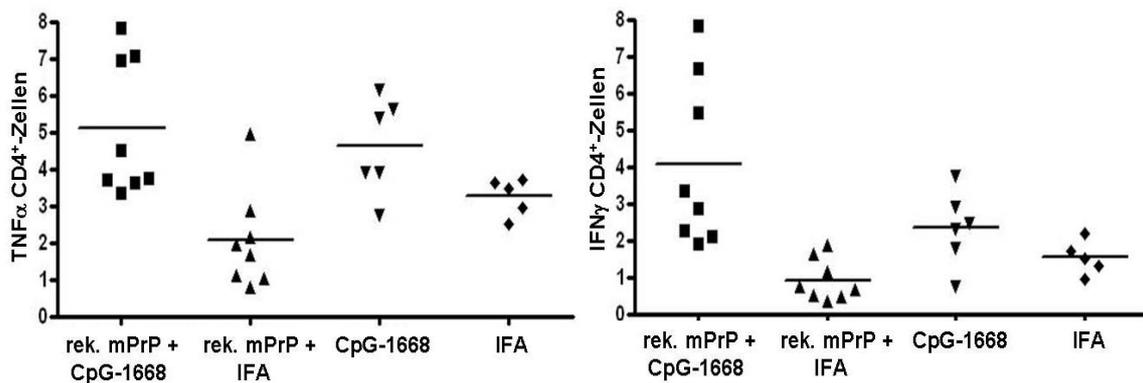


Abbildung 12: Intrazelluläre Zytokinfärbung für TNF α und IFN γ in CD4⁺-Zellen der *Prnp^{0/0}*-Mäuse

Die linke Abbildung zeigt die für TNF α positiven CD4⁺-Zellen (%) der unterschiedlichen proteinimmunisierten *Prnp^{0/0}*-Mäuse. In der rechten Abbildung sind die für IFN γ positiven CD4⁺-Zellen der *Prnp^{0/0}*-Mäuse dargestellt. Die Mittelwerte sind durch einen Querbalken dargestellt. (rek. mPrP+CpG-1668 n=8; rek. mPrP+IFA n=8; CpG n=5 und IFA n=5)

Der gleiche Ansatz wurde ebenfalls mit den Milzzellen der proteinimmunisierten C57BL/6-Mäuse durchgeführt. In diesen Gruppen konnten keine Unterschiede zwischen den proteinimmunisierten Mäusen und denen, die nur eines der beiden Adjuvantien erhielten, gefunden werden (Abbildung 13). Es konnten ebenfalls keine CD4⁺-Zellen nachgewiesen werden, die für Zytokine der Th2-Antwort (IL-5 und IL-4) positiv waren (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

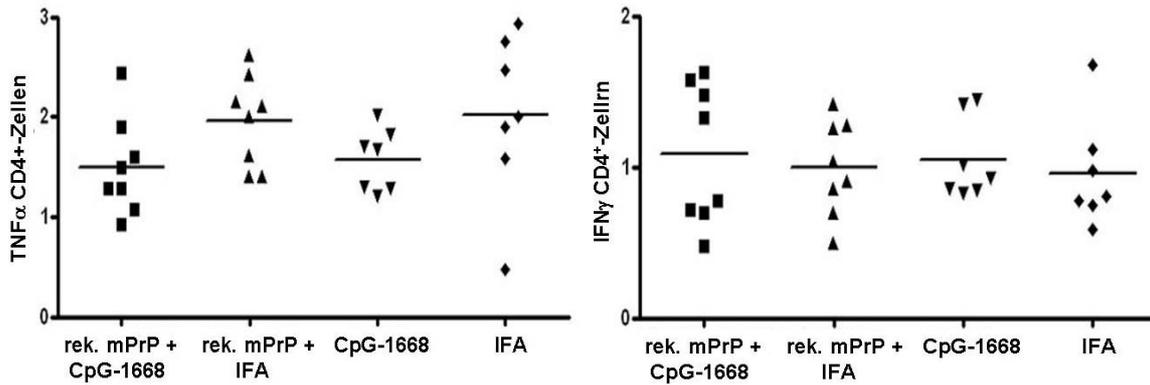


Abbildung 13: Intrazelluläre Zytokinfärbung für TNF α und IFN γ in CD4 $^{+}$ -Zellen der C57BL/6-Mäuse

Die linke Abbildung zeigt die für TNF α positiven CD4 $^{+}$ -Zellen (%) der unterschiedlichen proteinimmunisierten C57BL/6-Mäuse. In der rechten Abbildung sind die für IFN γ positiven CD4 $^{+}$ -Zellen der C57BL/6-Mäuse dargestellt. Die Mittelwerte sind durch einen Querbalken dargestellt.

3.1.6 Untersuchung der PrP-spezifischen Proliferation der CD4 $^{+}$ -Zellen der proteinimmunisierten Mäuse *in vitro*

Für die Untersuchung der zellulären Immunantwort durch Antigen-spezifische Proliferation mit rek. mPrP wurde der Proliferationstest genutzt. Die spezifische Stimulation mit rek. mPrP erfolgte ebenfalls mit den Milzzellen der immunisierten Mäuse *in vitro*. Die Stimulation erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen des rekombinanten Maus-Prion-Proteins. Als Positivkontrolle wurden die Milzzellen mit Concavalin A behandelt, das die Zellen unspezifisch stimuliert und zur Proliferation anregt. Für die Negativkontrollen wurden sowohl Zellen der Mäuse genutzt, die nur das Adjuvants erhielten, als auch unstimulierte Zellen eingesetzt. Die Bestimmung der Proliferation erfolgte durch die Einlagerung von ^3H -Thymidin in die DNA der sich teilenden Zellen. Die Ergebnisse sind als Stimulationsindex angegeben. Stimulationsindizes über 2 wurden als positiv bewertet. Der Proliferationstest ergab, dass Milzzellen der *Prnp*^{0/0}-Mäuse, die mit rek. mPrP und CpG-1668 immunisiert worden waren, nach spezifischer Stimulation eine starke Proliferation aufwiesen. Milzzellen von *Prnp*^{0/0}-Mäuse, die mit rek. mPrP und IFA immunisiert wurden, zeigten dagegen im Vergleich eine schwächere PrP-spezifische Proliferation (Abbildung 14). Der gleiche Versuch wurde auch mit den Zellen der C57BL/6- immunisierten Mäuse durchgeführt. Hier konnte keine spezifische Proliferation nach Stimulation mit rekombinanten Maus-Prion-Protein erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Rekombinantes Maus-Prion-Protein konnte

Ergebnisse

also nur in *Prnp*^{0/0}-Mäusen Antigen-spezifische T-Zellen induzieren. Die Induktion von T-Zellen wurde durch das Adjuvants CpG-1668 verstärkt.

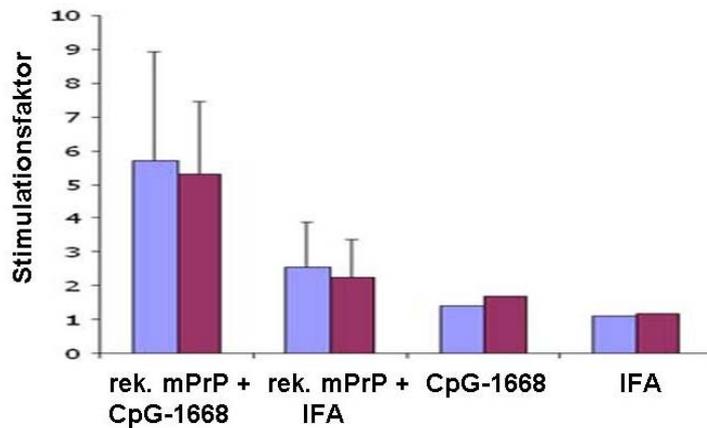


Abbildung 14: Proliferationstest nach Antigen-spezifischer Stimulation der Milzzellen von proteinimmunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse

In dieser Abbildung sind die Mittelwerte der Stimulationsfaktoren für die einzelnen Gruppen mit deren Standardabweichung dargestellt. Die blauen Balken stehen für die Zellen, die mit 2,5 µg/ml rek. mPrP stimuliert wurden und die roten Balken stehen für die Zellen, die mit 5 µg/ml Antigen stimuliert wurden. (PrP+CpG-1668 n=8; PrP+IFA n=8; CpG und IFA n=1)

3.1.7 Analyse der Zytokine im Überstand nach Antigen-spezifischer Stimulation

Eine weitere Untersuchung der zellulären Immunantwort ist die Messung der Zytokine im Überstand nach spezifischer Stimulation der Milzzellen von immunisierten Mäusen. Milzzellen der immunisierten Tiere wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Prion-Proteins stimuliert. Für die Analyse der Zytokine im Überstand wurde das CBA Flex Set System genutzt. Bei den untersuchten Zytokinen handelte es sich um IL-2, IL-4, IL-5, TNF α und IFN γ . Die Ergebnisse zeigten, dass es bei den Milzzellen von *Prnp*^{0/0}-Mäuse, die mit rek. mPrP und CpG-1668 als Adjuvants immunisiert worden waren, zu einer hohen Ausschüttung an Th1-Typ Zytokinen in den Überstand kam (Abbildung 15). Die Milzzellen von *Prnp*^{0/0}-Mäusen, die rek. mPrP und IFA erhielten, zeigten dagegen eine Ausschüttung von TNF α (Abbildung 15). Es konnten keine Zytokine der Th2-Antwort nachgewiesen werden. Da nach spezifischer Stimulation mit rek. mPrP keine Proliferation der Milzzellen von C57BL/6-Mäusen induziert werden konnte, wurde auf die Untersuchung der Zytokine bei diesen Tieren verzichtet.

Ergebnisse

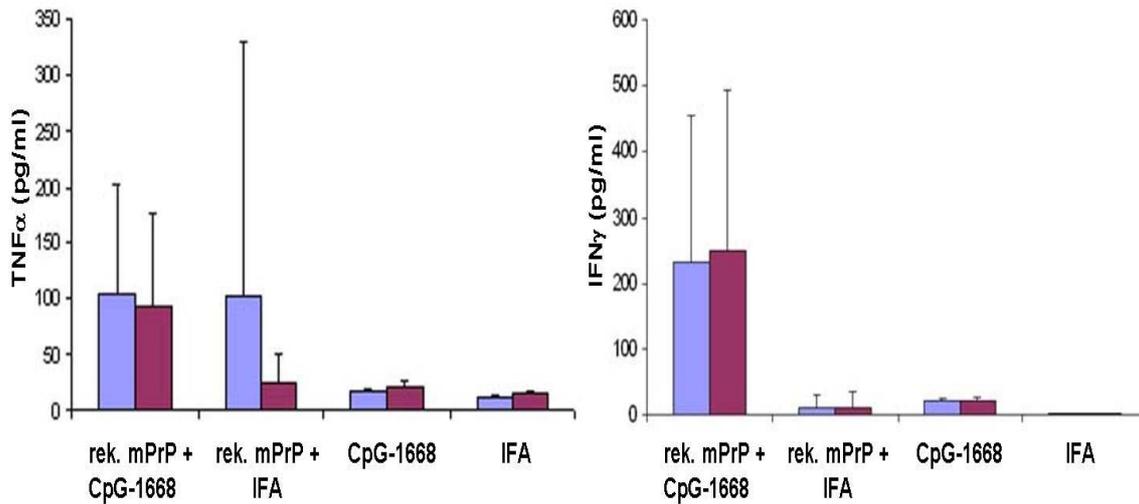


Abbildung 15: Zytokine im Überstand nach *in vitro* Stimulation von Milzzellen proteinimmunisierter *Prnp*^{0/0}- Mäuse

In dieser Abbildung sind die Mittelwerte der Zytokinkonzentrationen der proteinimmunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse für IFN γ (links) und TNF α (rechts) und deren Standardabweichung dargestellt. Die blauen Balken stehen für die Überstände der Zellen, die mit 2,5 μ g/ml rek. mPrP stimuliert wurden und die roten Balken stehen für die Überstände der Zellen, die mit 5 μ g/ml Antigen stimuliert wurden. (rek. mPrP+CpG-1668 n=8; rek. mPrP+IFA n=8; CpG-1668 oder IFA n=2)

3.1.8 Proteinimmunisierung in *Prnp*^{0/0}- und C57BL/6-Mäusen mit CpG-1826 ODN als Adjuvants

In den vorangegangenen Versuchen, konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit immunstimulatorischen Oligonukleotiden als Adjuvants zu einer besseren zellulären Immunantwort gegen das PrP-Antigen führte. Aus diesem Grund wurde eine neue Proteinimmunisierung mit CpG-1826 als Adjuvants durchgeführt. Bei diesen Oligonukleotiden sind zwei stimulatorische Motive vorhanden (-tcc atg **acg** ttc ctg **acg** tt-), im Gegensatz zu CpG-1668, das nur über ein immunstimulatorisches Motiv verfügen (-tcc atg **acg** ttc ctg atg ct-). Die Immunisierung erfolgte in *Prnp*^{0/0}-und C57BL/6-Mäusen nach dem gleichen Schema wie in Abbildung 4 beschrieben. Es erfolgte die Analyse der zellulären und humoralen Immunantwort nach der 4. Wiederholungsimmunisierung. Die Immunisierung wurde mit 10 μ g Prion-Protein und 10 μ g CpG-1826 in 50 μ l PBS subkutan (s.c) durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde den Tieren nur das CpG-Adjuvants in der gleichen Konzentration (10 μ g) s.c. appliziert.

3.1.8.1 Untersuchung der PrP-spezifischen Antikörper nach Proteinimmunisierung mit CpG-1826

Für die Untersuchung der humoralen Immunantwort wurden die Seren der immunisierten Tiere auf vorhandene Antikörper gegen das Prion-Protein getestet. Als Kontrollen dienten die Seren der Mäuse, die nur das Adjuvants erhalten haben und der monoklonale 6H4-Antikörper. Die Ergebnisse zeigten, dass in *Prnp^{0/0}*-Mäusen spezifische Antikörper gegen das Prion-Protein induziert werden konnten (Abbildung 16). In den Seren der immunisierten C57BL/6-Mäuse konnten keine PrP-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 16). Es konnten keine Unterschiede in der Induktion spezifischer Antikörper gegen das Maus Prion-Protein durch die Immunisierung mit rek. mPrP und CpG-1826 als Adjuvants oder rek. mPrP und CpG-1668 nachgewiesen werden.

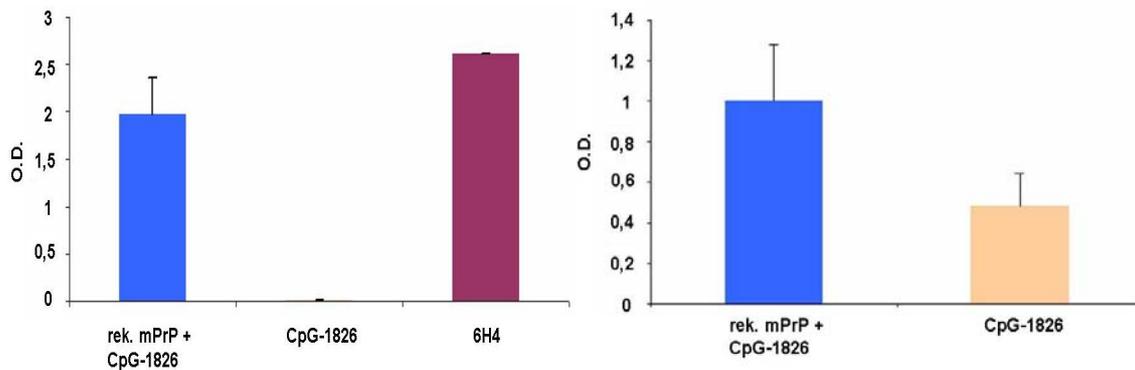


Abbildung 16: ELISA für Ig gegen das Prion-Protein in *Prnp^{0/0}*- und C57BL/6-Mäuse nach Proteinimmunisierung mit CpG-1826

Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung der verschiedenen Immunisierungsgruppen der *Prnp^{0/0}*- (links) und C57BL/6-Mäuse (rechts). Als Positivkontrolle diente der 6H4 Antikörper. Die Seren der *Prnp^{0/0}*-Mäuse wurden 1:5000 und die Seren der C57BL/6-Mäuse wurden 1:40 verdünnt. (*Prnp^{0/0}*-Mäuse: rek. mPrP+CpG-1826 n=7, CpG-1826 n=4; C57BL/6: rek. mPrP+CpG-1826 n=7, CpG-1826 n=6)

Die Analyse der IgG-Subtypen zeigte, dass sowohl IgG1 als auch IgG2a Antikörper gegen das Prion-Protein gebildet wurden, allerdings dominierte die IgG1-Antwort (Abbildung 17). Als Positivkontrolle dient der 6H4 Antikörper, bei dem es sich um einen monoklonalen IgG1 Antikörper handelt. Als Negativkontrolle wurden die Seren der Tiere genutzt, die nur das Adjuvants CpG-1826 erhielten.

Ergebnisse

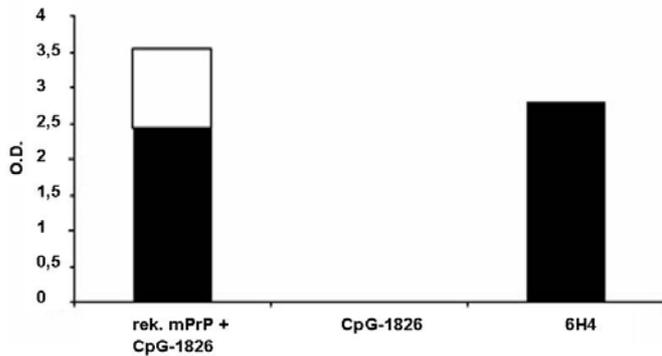


Abbildung 17: Antikörper-Subtypen IgG1 und IgG2a in *Prnp*^{0/0}-Mäusen nach Proteinimmunisierung mit CpG-1826

Darstellung der Mittelwerte der verschiedenen Immunisierungsgruppen (rek. mPrP+CpG-1826 n=7; CpG-1826 allein n=5). Die Seren wurden 1:5000 verdünnt. Für die Detektion wurde anti-Maus IgG1 (schwarzer Balken) und anti-Maus IgG2a (weißer Balken) verwendet. Als Positivkontrolle diente der 6H4 Antikörper.

3.1.8.2 FACS-Analyse der Seren nach Immunisierung mit rek. mPrP und CpG-1826 als Adjuvants

Im ELISA konnte gezeigt werden, dass es nach Proteinimmunisierung mit CpG-1826 als Adjuvants zu einer Produktion von Antikörpern in *Prnp*^{0/0}-Mäusen kam, die spezifisch gegen das rekombinante Maus-Prion-Protein (rek. mPrP) gerichtet waren. Durch die FACS-Analyse auf N2a-Zellen sollte nun untersucht werden, ob diese Antikörper auch in der Lage sind die zelluläre Form des Prion-Proteins, wie sie *in vivo* vorkommt, zu binden. Es konnte gezeigt werden, dass die Antikörper in den Seren der *Prnp*^{0/0}-Mäuse das Prion-Protein auf den N2a-Zellen spezifisch erkannten und daran banden (Abbildung 18). Es konnte keine Antikörperbindung mit den Seren der C57BL/6-Mäuse im FACS nachgewiesen werden.

Ergebnisse

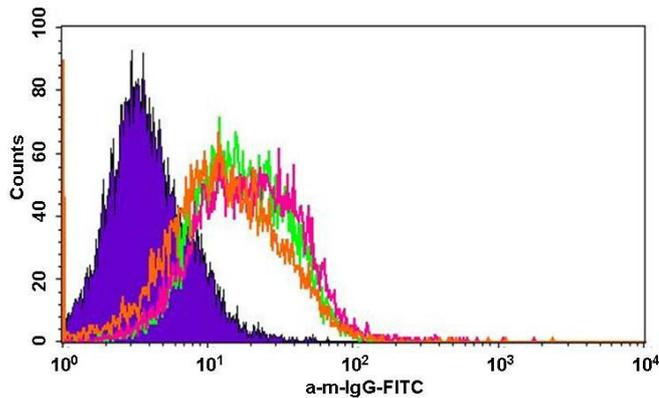


Abbildung 18: FACS-Analyse von N2a-Zellen mit Seren von proteinimmunisierten Mäusen mit CpG-1826 als Adjuvants

Die Histogramme in grün und pink stehen für Seren der *Prnp^{0/0}*-Mäuse, die mit rek. mPrP+CpG-1826 immunisiert wurden. Als Positivkontrolle diente der 6H4-Antikörper (orange). Das violett-gefüllte Histogramm ist die Negativkontrolle; Serum einer nur mit CpG-1826 immunisierten *Prnp^{0/0}*Maus.

3.1.8.3 Intrazelluläre Zytokinfärbung der CD4⁺-Zellen nach Immunisierung mit rek. mPrP und CpG-1826 als Adjuvants

Für die Analyse der zellulären Immunantwort, wurden die Milzzellen der immunisierten Tiere genutzt. Die Aktivierung der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Nach der Inkubation fand die Färbung mit dem Oberflächenantikörper CD4 und die intrazelluläre Zytokinfärbung statt. Bei den untersuchten Zytokinen handelte es sich um TNF α , IFN γ , IL-5 und IL-4. In den *Prnp^{0/0}*-Tieren konnte eine signifikant erhöhte Zytokinantwort für TNF α und IFN γ nach Immunisierung mit dem Prion-Protein plus CpG-1826 im Vergleich zu den Kontrolltieren, die nur das Adjuvants erhielten, festgestellt werden (Abbildung 19). Es konnten keine Zytokine, die für eine Th2-Immunantwort charakteristisch sind (IL-4 und IL-5), nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die Verwendung von CpG-1826 als Adjuvants, im Vergleich zu CpG-1668, die zelluläre Immunantwort verstärkt werden kann.

Ergebnisse

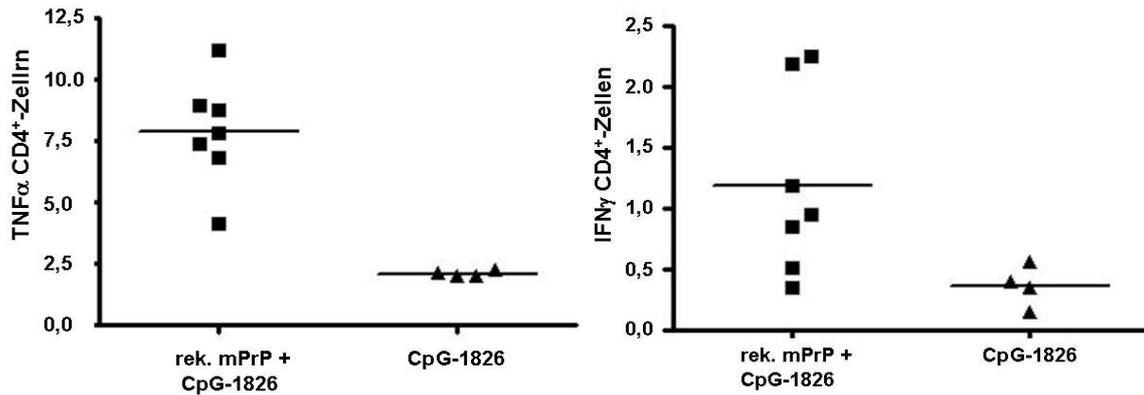


Abbildung 19: Intrazelluläre Zytokinfärbung von Milzzellen der *Prnp*^{0/0}-Mäuse nach Immunisierung mit rek. mPrP und CpG-1826

Die linke Abbildung zeigt die für TNF α positiven CD4⁺-Zellen (%) der unterschiedlichen proteinimmunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse. In der rechten Abbildung sind die für IFN γ positiven CD4⁺-Zellen der *Prnp*^{0/0}-Mäuse gezeigt. Die Mittelwerte sind durch einen Querbalken dargestellt. Die Unterschiede in den beiden Gruppen waren statistisch signifikant für TNF α $p=0,0095$ (Mann-Whitney-Test)

Es wurden ebenfalls die immunisierten C57BL/6-Tiere auf ihre zelluläre Immunantwort untersucht. Die Ergebnisse zeigten keine Unterschiede in der Zytokinproduktion von Milzzellen aus Mäusen der Kontrollgruppe, die nur CpG-1826 erhielten, und der Gruppe, die das rek. mPrP mit CpG-1826 bekamen. Allerdings gab es in der proteinimmunisierten Gruppe ein einzelnes Tier, das eine deutlich erhöhte Zytokinantwort für TNF α und IFN γ zeigte (Abbildung 20).

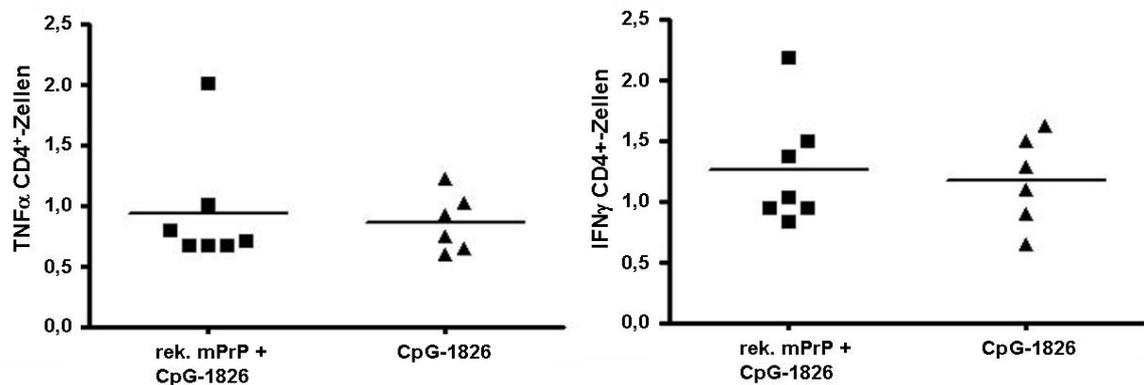


Abbildung 20: Intrazelluläre Zytokinfärbung von Milzzellen der C57BL/6-Mäuse nach Immunisierung mit rek. mPrP und CpG-1826

Die linke Abbildung zeigt die für TNF α positiven CD4⁺-Zellen (%) der unterschiedlichen proteinimmunisierten C57BL/6-Mäuse. In der rechten Abbildung wurden die für IFN γ positiven CD4⁺-Zellen der C57BL/6-Mäuse dargestellt. Die Mittelwerte sind durch einen Querbalken dargestellt.

3.1.9 Untersuchung der Proliferation der CD4⁺-Zellen der protein-immunisierten Mäuse mit CpG-1826 als Adjuvants *in vitro*

Im nächsten Experiment wurden die Milzzellen der proteinimmunisierten Mäuse kultiviert und *in vitro* spezifisch mit rekombinanten Prion-Protein stimuliert. Wenn durch die Immunisierung T-Zellen induziert wurden, die spezifisch das Maus-Prion-Protein erkennen, kam es nach Stimulation dieser Zellen *in vitro* zu einer Proliferation. Die Ergebnisse zeigten eine spezifische zelluläre Immunantwort (T-Zell-Proliferation) der mit rek. mPrP immunisierten Tiere. Die Stimulationsindizes waren drei- bis viermal so hoch, wie die der Kontrolltiere, die nur das Adjuvants erhielten (Abbildung 21). Die Milzzellen der *Prnp*^{0/0}-Mäuse, die mit rek. mPrP und CpG-1826 immunisiert wurden, zeigten nach Antigen-spezifischer Stimulation *in vitro* geringere Stimulationsindizes als die der mit rek. mPrP und CpG-1668 immunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse (Abbildung 14).

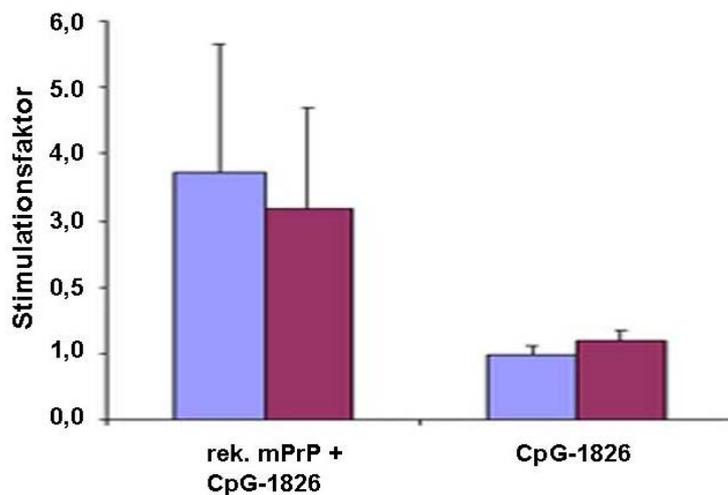


Abbildung 21: Proliferationstest mit Milzzellen der mit rek. mPrP und CpG-1826 immunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse

In dieser Abbildung sind die Mittelwerte der Stimulationsindizes für die einzelnen Gruppen mit deren Standardabweichung dargestellt. Die blauen Balken stehen für die Zellen, die mit 2,5µg/ml rek. mPrP stimuliert wurden und die roten Balken stehen für die Zellen, die mit 5µg/ml Antigen stimuliert wurden. (rek. mPrP+CpG-1826 n=7; CpG-1826 n=2)

3.2 DNA-Immunisierung

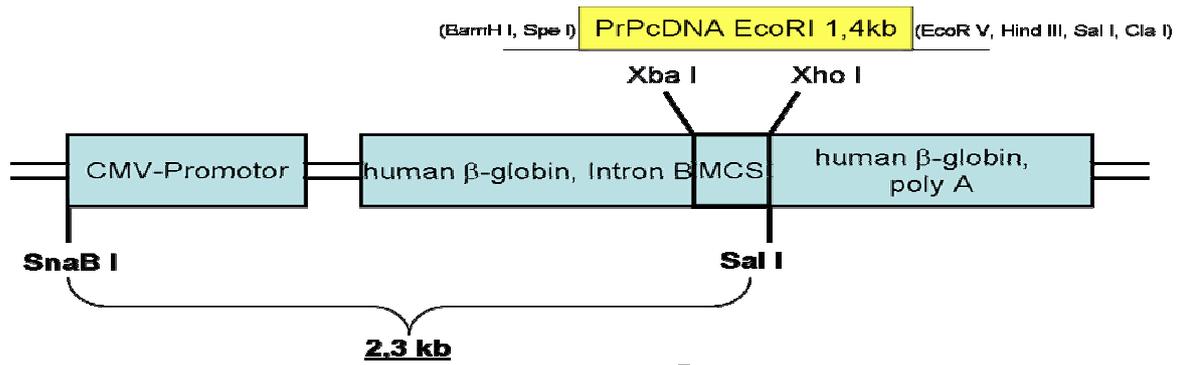
Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Herstellung einer DNA-Vakzine gegen die zelluläre Form des Prion-Proteins (PrP^C). Als Grundlage der DNA-Vakzine diente der eukaryotische Expressionsvektor pCG, in welchen der kodierende Bereich des Maus-PrP kloniert wurde (pCG-PrP). Zusätzlich wurde das T-Helfer (Th)-Epitop des Tetanustoxins (P30) in den kodierenden Bereich des Maus-PrP kloniert (pCG-PrP-P30).

Mit beiden Expressionsvektoren pCG-PrP und pCG-PrP-P30 sollten in *Prnp*^{0/0}- und C57BL/6-Mäusen Immunisierungen durchgeführt werden, um eine humorale und zelluläre Immunantwort gegen das Prion-Protein zu induzieren. Das Th-Epitop, P30, sollte dabei die Immunantwort gegen das Prion-Protein verstärken und möglicherweise in C57BL/6-Mäusen einen Toleranzbruch gegen PrP^C induzieren. Der leere pCG-Vektor diente in allen Experimenten als Negativkontrolle.

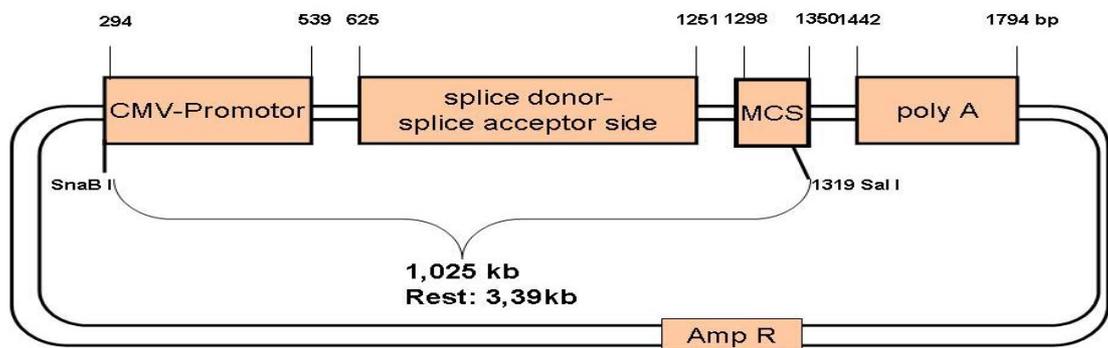
3.2.1 Klonierung der DNA-Vakzine-Vektoren

Für die Herstellung des pCG-PrP-Vektor wurde die Expressionskassette des pAd-CMV-PrP-Vektors, welche den kodierenden Bereich des Maus-PrPs unter der Kontrolle des CMV-Promotors enthält, in den Vektor pCG kloniert. Die Abbildung 22 zeigt die Expressionskassette des pAd-CMV-PrP Plasmids und das Klonierungsschema.

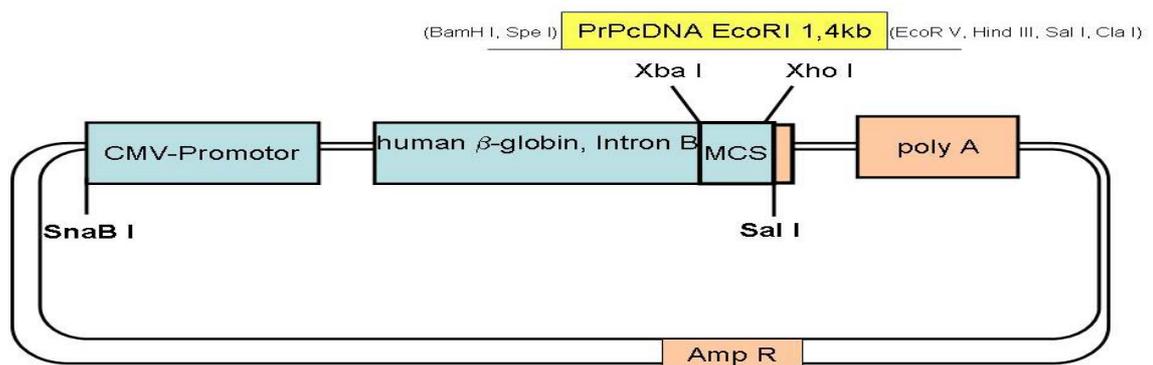
Ergebnisse



pAd-CMV-PrP



pCG-Vektor



pCG-PrP

Abbildung 22: Herstellung des pCG-PrP-Vektors

Die Expressionskassette des pAd-CMV-PrP Plasmids, welche das Maus-PrP unter der Kontrolle des CMV-Promotors enthält, wurde in den pCG-Vektor kloniert. Dazu wurden beide Plasmide mit SnaB I und Sal I geschnitten und das 2,3kb Fragment aus dem pAd-CMV-PrP Plasmid mit dem 3,9kb Fragment des pCG-Vektors ligiert.

Ergebnisse

Die Herstellung des pCG-PrP-P30 Vektors wurde in zwei Klonierungsschritten durchgeführt. Hierbei wurde das P30-Th-Epitop, bestehend aus einer kodierenden Sequenz von 21 Aminosäuren, zwischen die Codons 223 und 224 der kodierenden Sequenz des PrPs kloniert. Im ersten Schritt erfolgte die Insertion des P30-Epitopes an das Kodon 223 der N-terminalen PrP Sequenz, wobei das Plasmid pBS-PrP-P30-C-term hergestellt wurde (Abbildung 23). Im zweiten Schritt wurde die C-terminale PrP Sequenz mit dem Kodon 224-254 an die kodierende Sequenz von PrP-P30 des Plasmids pBS-PrP-P30-C-term kloniert und der pCG-PrP-P30 Vektor generiert (Abbildung 24).

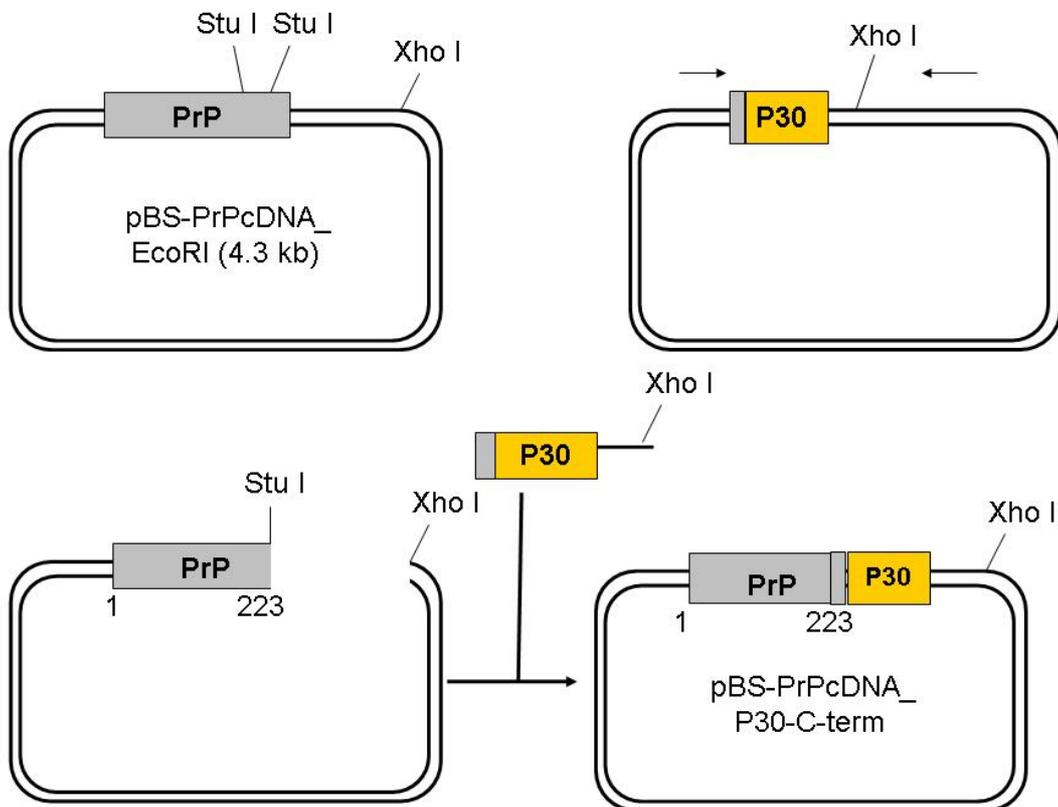


Abbildung 23: Klonierung des pCG-PrP-P30-Vektors (1. Schritt)

Die Sequenz des P30-Th-Epitopes wurde als Linker in die Eco RV-Schnittstelle des Plasmid pBS kloniert und mit PCR aus dem pBS-P30-Vektor amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit Xho I verdaut und mit dem 3,7kb-Stu I/Xho I-Fragment des pBS-PrPcDNA_EcoRI-Vektors ligiert. Der pBS-PrPcDNA_P30-C-term-Vektor enthält die Sequenz 1-223 und das P30-Th-Epitop.

Ergebnisse

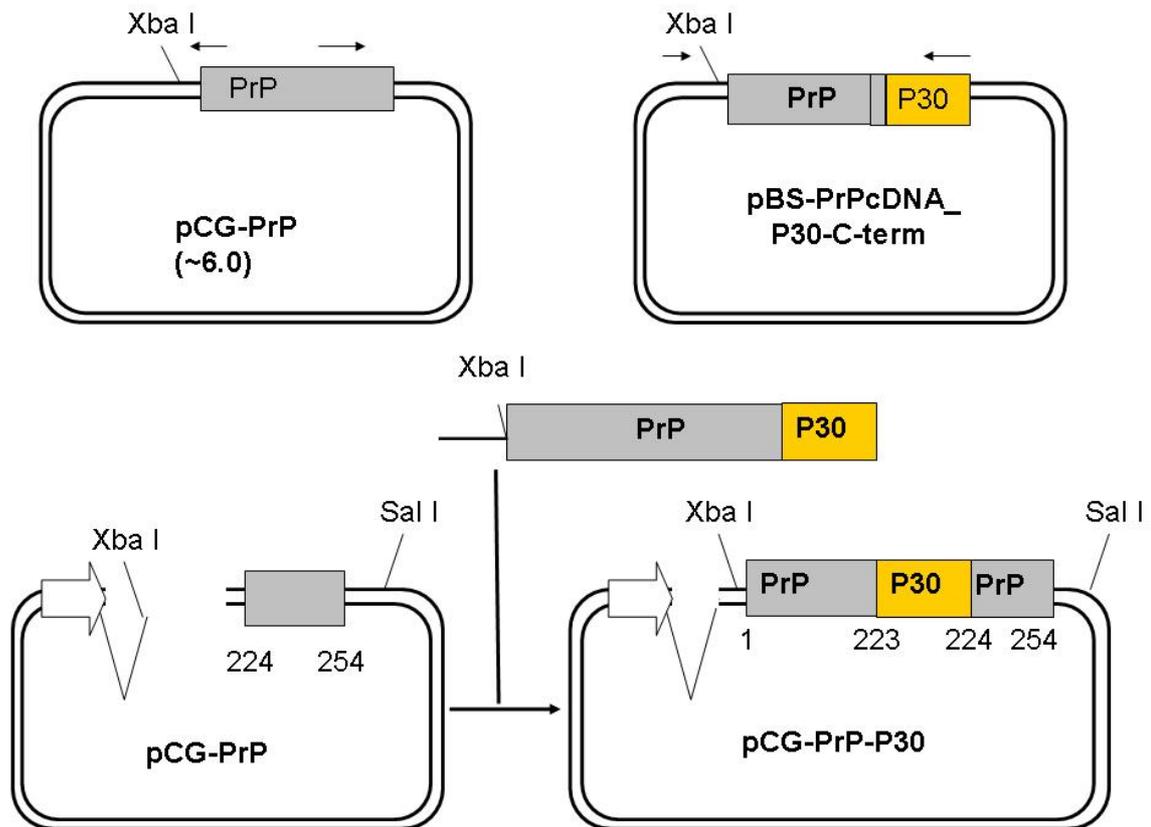


Abbildung 24: Klonierung des pCG-PrP-P30-Vektors (2. Schritt)

Ein 900kb-Fragment, das die Sequenz von PrP-P30 enthält, wurde mit PCR und der DNA pBS-PrPcDNA_P30-C-term erzeugt. Das Produkt wurde mit T4 Kinase behandelt und mit Xba I verdaut. Ebenfalls mittels PCR wurde ein 6kb-Fragment des pCG-PrP-Vektors amplifiziert, mit T4 Kinase behandelt und mit Xba I geschnitten. Nach Ligation beider PCR-Fragmente entstand der Vektor pCG-PrP-P30.

3.2.2 Überprüfung der Konstrukte

Für eine erfolgreiche DNA-Immunisierung *in vivo* ist die korrekte Klonierung der DNA-Vakzine-Vektoren essentiell. Die Vektoren wurden deshalb mit unterschiedlichen Methoden analysiert und überprüft.

3.2.2.1 Sequenzanalyse

Die Expressionsvektoren pCG-PrP und pCG-PrP-P30 wurden einer Sequenzanalyse unterzogen, um die korrekte Klonierung zu überprüfen. Hierbei wurden vom Vektor ausgehend die insertierten Gene überprüft. Die Sequenzierung des einklonierten Gens zeigte, dass sowohl der pCG-PrP als auch der pCG-PrP-P30 in der richtigen Orientierung kloniert wurden, und dass die

Ergebnisse

korrekte Sequenz vom Start- bis zum Stop-Kodon der insertierten Gene vorhanden war.

3.2.2.2 Proteinexpression *in vitro*

Ein weiterer Schritt zur Kontrolle der Vektoren war die funktionelle Überprüfung der Expressionsvektoren. Der Nachweis von Proteinexpression wurde mittels FACS- und Westernblot-Analyse geführt.

Für die Kontrolle der Konstrukte wurde eine transiente Transfektion in 293T-Zellen durchgeführt. Bei den Transfektionsansätzen wurden Einzeltransfektionen mit den Vektoren pCG-PrP, pCG-PrP-P30 und dem leeren pCG-Vektor gewählt.

Expressionskontrolle der Konstrukte durch FACS-Analyse

Die transfizierten Zellen wurden geerntet und mit dem 6H4 Antikörper inkubiert, von dem bekannt ist, dass er PrP^C auf der Oberfläche von 293T-Zellen binden kann. Die Auswertung im Durchflußzytometer zeigte, dass die zelluläre Form des Prion-Proteins auf der Oberfläche der 293T-Zellen sowohl nach Transfektion mit dem pCG-PrP- als auch mit pCG-PrP-P30-Vektor exprimiert wird (Abbildung 25).

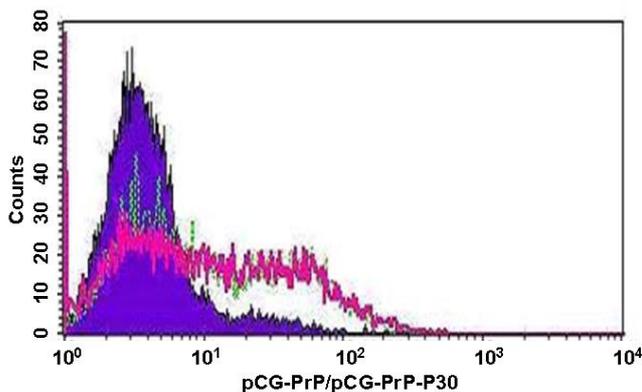


Abbildung 25: Expressionskontrolle der DNA-Konstrukte mittels FACS-Analyse

Beim violett-gefüllten Histogramm handelt es sich um Zellen, die mit dem leeren pCG-Vektor transfiziert wurden. Die grüne Linie stellt Zellen dar, die mit pCG-PrP, und die pinke Linie zeigt Zellen, die mit pCG-PrP-P30 transfiziert wurden.

Expressionkontrolle der Konstrukte mittels Westernblot

Für die Westernblot-Analyse wurden die transfizierten 293T-Zellen lysiert. Auch hier wurde der monoklonale 6H4 Antikörper für die Detektion von PrP genutzt. Dabei konnte auch im Westernblot die Expression von PrP^C nachgewiesen

Ergebnisse

werden. Durch das Einfügen des Th-Epitopes, P30 (21 Aminosäuren), entstand ein Fusionsprotein (PrP-P30), dessen Molekulargewicht größer war, als das des Prion-Proteins allein. Es konnte also gezeigt werden, dass das Einfügen des P30-Epitopes die Expression von PrP nicht beeinflusst (Abbildung 26).

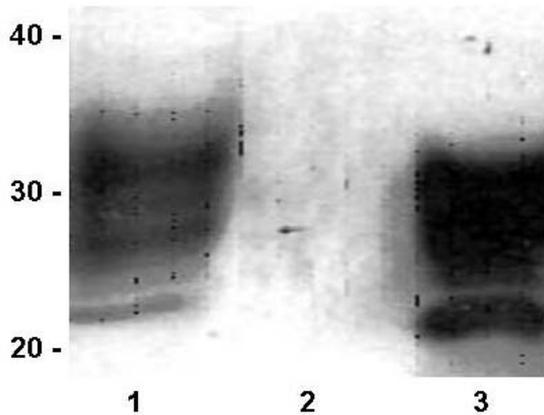


Abbildung 26: Westernblot-Analyse der Konstrukte

Die Detektion erfolgte mit dem 6H4 Antikörper. (1=pCG-PrP-P30; 2=pCG; 3=pCG-PrP)

3.2.3 Immunisierungsschema für die DNA-Immunisierung

Nachdem bestätigt wurde, dass die Vektoren das gewünschte Antigen exprimieren, erfolgte die Immunisierung von *Prnp*^{0/0}- und C57BL/6-Mäusen. Die Tiere wurden für die ersten 4 Immunisierungen intradermal (i.d.) mit der jeweiligen Plasmid-DNA immunisiert. Die 5. und 6. Immunisierung erfolgte subkutan (s.c.). Als Negativkontrolle diente der leere pCG-Vektor. Das Applikationsvolumen betrug 100µg DNA in 50µl PBS. Die Auswertung der zellulären und humoralen Immunantwort erfolgte eine Woche nach der sechsten Immunisierung (Abbildung 27).

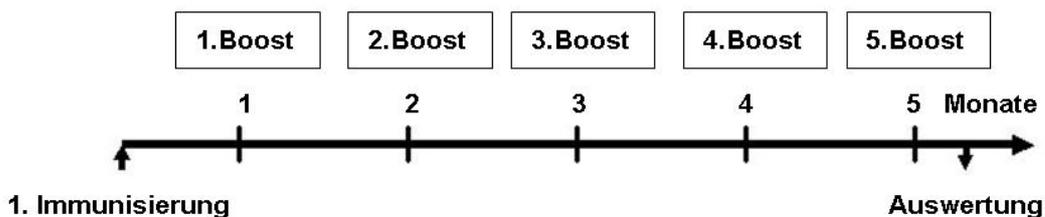


Abbildung 27: Immunisierungsschema bei der DNA-Immunisierung

Die Immunisierungen wurden im Abstand von 4 Wochen durchgeführt. Eine Woche nach der letzten Immunisierung erfolgte die Analyse der induzierten Immunantwort.

3.2.4 Untersuchung der induzierten Antikörper in den Seren der DNA-immunisierten Mäuse

Zum Nachweis der humoralen Immunantwort wurden die Seren der DNA-immunisierten Mäuse auf PrP-spezifische Antikörper im ELISA untersucht. Als Positivkontrolle diente wieder der monoklonale 6H4 Antikörper. Das Serum der Tiere, die nur den leeren pCG-Vektor erhielten, diente als Negativkontrolle.

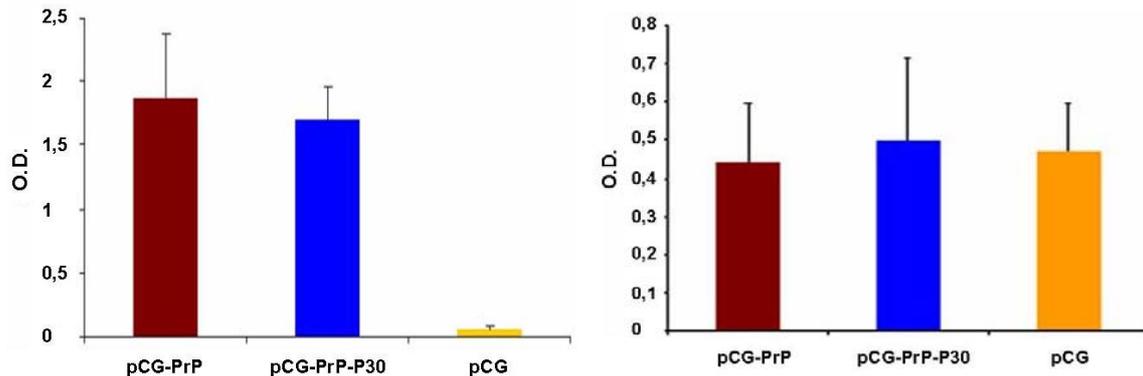


Abbildung 28: Anti-PrP^C Antikörper in *Prnp*^{0/0}- und C57BL/6-Mäusen nach DNA-Immunisierung

Darstellung der Mittelwerte der verschiedenen Immunisierungsgruppen, *Prnp*^{0/0}-Mäuse (links) und C57BL/6-Mäuse (rechts), und deren Standardabweichung. Die Seren der *Prnp*^{0/0}-Mäuse wurden 1:250 verdünnt, die Seren der C57BL/6-Mäuse wurden in einer Verdünnung von 1:40 eingesetzt. (*Prnp*^{0/0}-Mäuse: pCG-PrP n=9; pCG-PrP-P30 n=9; pCG n=5; C57BL/6-Mäuse: pCG-PrP n=10; pCG-PrP-P30 n=10; pCG n=5)

Es konnte gezeigt werden, dass beide PrP-exprimierenden Vektoren in der Lage waren eine Antikörperantwort gegen das Prion-Protein in *Prnp*^{0/0}-Mäusen zu induzieren (Abbildung 28), die zwischen pCG-PrP und pCG-PrP-P30 vergleichbar war. Es wurden ebenfalls die Antikörper in den Seren der C57BL/6 Tiere untersucht. Die Analyse ergab, dass in Einzeltieren eine schwache Antikörperantwort nachgewiesen werden konnte (Abbildung 28). Es konnten allerdings keine Unterschiede in der Antikörperantwort zwischen den beiden PrP-exprimierenden Vektoren festgestellt werden.

Im nächsten Schritt wurden die PrP-positiven Seren der *Prnp*^{0/0}-Mäuse auf IgG1 und IgG2a untersucht. Hierbei sollte festgestellt werden, ob die beiden Vektoren eine unterschiedliche Antikörperantwort induzieren, die auf das zusätzliche Einfügen des Th-Epitopes P30 zurückzuführen wäre. Die Ergebnisse zeigten allerdings, dass beide Plasmide in der Lage waren sowohl PrP-spezifische IgG1- als auch IgG2a-Antikörper zu induzieren. Die IgG1-Antwort war bei beiden

Ergebnisse

DNA-Vakzinen ausgeprägter (Abbildung 29). Das zusätzliche Einfügen des Th-Epitopes P30 hatte keinen Einfluss auf die Antikörperantwort. Die Untersuchung auf IgG1 und IgG2a wurde bei den C57BL/6-Mäusen nicht durchgeführt, da nach Messung der Gesamtimmunglobuline nur vereinzelt eine schwache Antikörperantwort gegen das Prion-Protein nachgewiesen werden konnte.

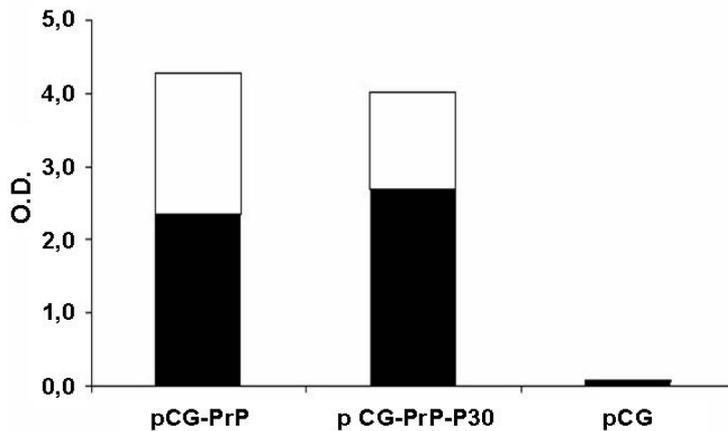


Abbildung 29: Anti-PrP^C Immunglobulinsubtypen in *Prnp*^{0/0}- Mäusen nach DNA-Immunisierung

Darstellung der Mittelwerte der verschiedenen Immunisierungsgruppen (pCG-PrP n=5; pCG-PrP-P30 n=9; pCG n=5). Die Seren wurden 1:250 verdünnt. Für die Detektion wurde anti-Maus IgG1 (schwarzer Balken) und anti-Maus IgG2a (weißer Balken) verwendet.

3.2.5 FACS-Analyse der Seren von DNA-immunisierten Tieren

Im ELISA konnte gezeigt werden, dass die Vektoren in der Lage waren eine Antikörperantwort in den *Prnp*^{0/0}-Tieren zu induzieren. Es sollte nun gezeigt werden, ob die Seren auch die zelluläre Form des Prion-Proteins auf der Zelloberfläche des A3-Klons erkennen. Hierfür wurden die Seren mit den Zellen inkubiert und die Bindung mit einem anti-Maus-IgG-FITC gekoppelten Antikörper detektiert und im FACS dargestellt. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die im ELISA positiv getesteten Seren ebenfalls in der Lage waren, natives PrP^C zu erkennen, und zu binden (Abbildung 30).

Ergebnisse

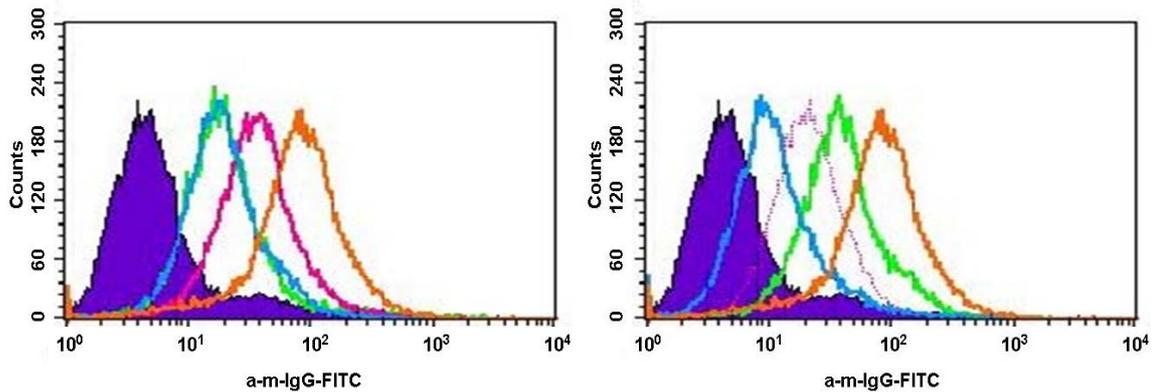


Abbildung 30: FACS-Analyse der Seren der DNA-immunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse auf N2a-Zellen

50µl der Seren wurde unverdünnt auf die Zellen gegeben. Die Abbildung auf der linken Seite zeigt Seren von pCG-PrP immunisierten Tieren (grün, türkis, pink), die Abbildung auf der rechten Seite zeigt Seren der Mäuse, die mit dem pCG-PrP-P30-Vektor immunisiert wurden (türkis, grün, hellviolett). Als Negativkontrolle diente das Serum eines Tieres, dass mit dem leeren Vektor pCG immunisiert wurde (violett-gefülltes Histogramm). Für die Positivkontrolle wurde der 6H4 Antikörper eingesetzt (orange).

Die Seren der immunisierten C57BL/6-Mäuse wurden ebenfalls im FACS auf PrP-bindende Antikörper hin untersucht. Es konnte sowohl in der Gruppe der pCG-PrP immunisierten C57BL/6-Mäuse als auch in der Gruppe, die mit pCG-PrP-P30 immunisiert wurde, jeweils ein Tier gefunden werden, das eine schwache Antikörperbindung an die zelluläre Form des Prion-Proteins aufwies (Abbildung 31). Bei allen anderen Tieren dieser Gruppen konnte keine Antikörperbindung an das native Prion-Protein nachgewiesen werden.

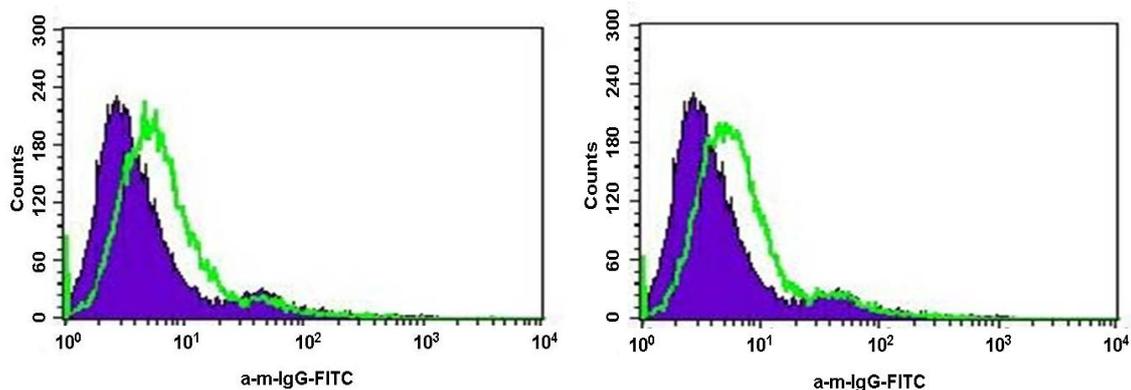


Abbildung 31: FACS-Analyse der Seren der DNA-immunisierten C57BL/6-Mäuse auf N2a-Zellen

50µl der Seren wurde unverdünnt auf die Zellen gegeben. Die Abbildung auf der linken Seite zeigt Seren von pCG-PrP immunisierten Tieren (grün), die Abbildung auf der rechten Seite zeigt Seren der Mäuse, die mit dem pCG-PrP-P30-Vektor immunisiert wurden (grün). Als Negativkontrolle diente das Serum eines Tieres, dass mit dem leeren Vektor pCG immunisiert wurde (violett-gefülltes Histogramm).

3.2.6 Westernblot-Analyse mit Seren der DNA-immunisierten Mäuse

Die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente haben verdeutlicht, dass die durch DNA-Immunsierung induzierten Antikörper in der Lage waren, die zelluläre Form des Prion-Proteins auf der Oberfläche zu binden. Im nächsten Schritt sollte analysiert werden, ob diese Antikörper auch die pathogene Form des Prion-Proteins binden. Für diesen Ansatz wurden verschiedene Gehirnhomogenate, die unter 3.1.3 beschrieben wurden, im Westernblot getestet. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl *Prnp*^{0/0}-Tiere, die mit dem pCG-PrP-Vektor immunisiert worden waren, als auch die pCG-PrP-P30 immunisierten Tiere, PrP^{Sc} erkennen und binden konnten (Abbildung 32). Der gleiche Versuch wurde auch mit den Seren der C57BL/6-Tiere durchgeführt. Bei diesen Seren konnte allerdings keine Antikörperbindung an PrP^{Sc} detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

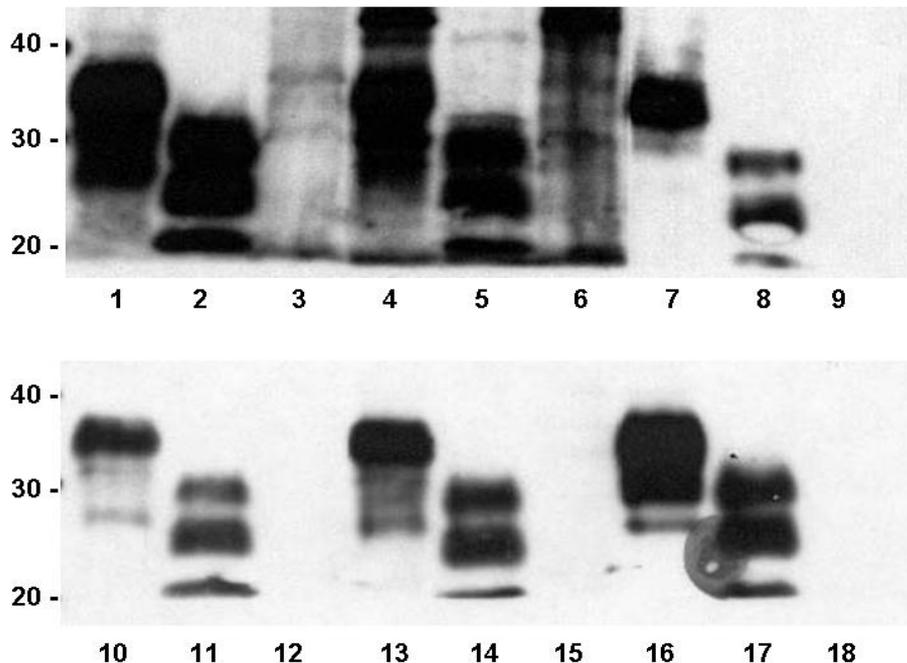


Abbildung 32: Westernblot-Analyse der DNA-immunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse

Die Gehirnhomogenate wurden in folgender Reihenfolge aufgetragen: C57BL/6- (1, 4, 7, 10, 13, 16) und Scrapie-infiziertes C57BL/6- (2, 5, 8, 11, 14, 17), *Prnp*^{0/0}-Gehirn (3, 6, 9, 12, 15, 18). Die Seren wurden in einer 1:1000 Verdünnung auf die Membran gegeben. Als Positivkontrolle diente der monoklonale 6H4 Antikörper (Spur 7-9). Spur 1-6: Seren der Tiere, die mit pCG-PrP immunisiert wurden; Spur 10-18: Seren der Tiere, die mit pCG-PrP-P30 immunisiert wurden.

3.2.7 Inhibition der PrP^{Sc} Akkumulation *in vitro* mit Seren der DNA-immunisierten Mäuse

Die Antikörper, die durch die DNA-Immunsierung induziert wurden, waren in der Lage PrP^{Sc} zu binden. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Seren der *Prnp*^{0/0}- oder C57BL/6-Mäuse die PrP^{Sc}-Akkumulation *in vitro* hemmen können. Für dieses Experiment wurden ScN2a Zellen mit den Seren der unterschiedlich immunisierten Mäuse über fünf Tage behandelt, anschließend lysiert und im Westernblot ausgewertet. Es konnte gezeigt werden, dass alle, der im ELISA positiv getesteten Seren der *Prnp*^{0/0}-Tiere, das PrP^{Sc}-Signal verringern konnten. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Seren der mit pCG-PrP oder pCG-PrP-P30 immunisierten Tiere festgestellt werden. Der Westernblot zeigt, dass durch die Behandlung der ScN2a-Zellen mit den Seren der immunisierten Tiere, auch eine Verminderung des PrP^C-Signal eintrat (Abbildung 33).

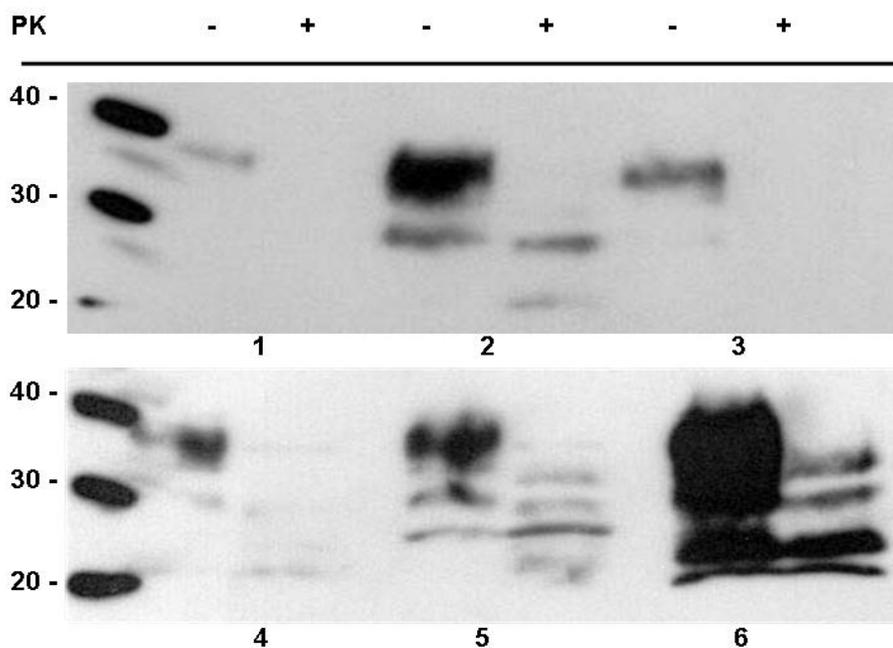


Abbildung 33: Westernblot der Zellysate der ScN2a-Zellen nach Behandlung mit den Seren der DNA-immunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse

ScN2a-Zellen, die mit Seren der Tiere behandelt wurden, die den pCG-PrP-Vektor erhielten (Spur 1-3); Zellen, die mit Serum der Tiere behandelt wurden, die den pCG-PrP-P30-Vektor erhielten (Spur 4-5) Negativkontrolle=pCG, Zellen wurden mit Serum eines Tieres behandelt, das den leeren Vektor bekommen hat (Spur 6); M=Marker; PK=Proteinase K; unverdaut (-)=PrP^C; verdaut (+)=PrP^{Sc}

Die Behandlung der ScN2a-Zellen mit den Seren der C57BL/6-Mäuse zeigte dagegen keinen Einfluss auf die PrP^{Sc}-Akkumulation (Abbildung 34).

Ergebnisse

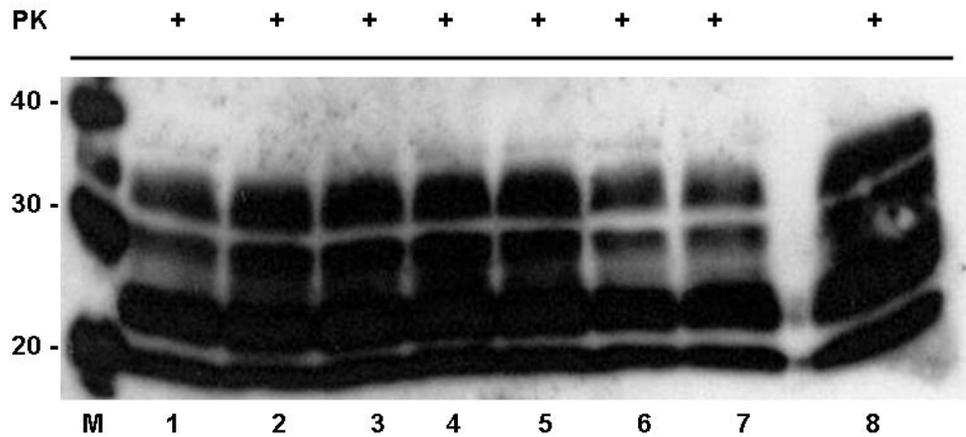


Abbildung 34: Westernblot der Zellysate der ScN2a-Zellen nach Behandlung mit den Seren der DNA-immunisierten C57BL/6-Mäuse

Es wurden nur die mit Proteinase K verdauten Zellysate aufgetragen (=PrP^{Sc}). Spur 1-3: Zellen mit Seren der pCG-PrP immunisierten Mäuse behandelt; Spur 4-7: Zellen mit Seren der pCG-PrP-P30 immunisierten Mäuse behandelt; Spur 8: Negativkontrolle, Zellen mit Serum von pCG immunisierter Maus; M=Marker

3.2.8 Untersuchung der intrazellulären Zytokinantwort nach DNA-Immunisierung

Für die Untersuchung der zellulären Immunantwort nach Immunisierung mit den unterschiedlichen Vektoren, wurde unter anderem die intrazelluläre Zytokinfärbung in T-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Milzen der immunisierten Mäuse entnommen und die Zellen separiert. Für die Unterscheidung der T-Zellsubpopulationen, Th1 und Th2, anhand ihres Zytokinmusters, wurden IFN γ und TNF α (Th1) und IL-5 und IL-4 (Th2) als Markerzytokine verwendet. Da durch die DNA-Immunisierung sowohl eine MHC-Klasse-I-, zytotoxische T-Zellen (CD8⁺-Zellen), als auch eine MHC-Klasse-II-Antwort, T-Helfer-Zellen (CD4⁺-Zellen) induziert wird, wurde die Immunantwort ebenfalls auf Unterschiede für CD4⁺- und CD8⁺-Zellen hin untersucht. Dieser Versuch wurde für die *Prnp*^{0/0}- und C57BL/6-Mäuse durchgeführt. Es konnte eine TNF α - und IFN γ -Antwort für CD4⁺-Zellen nach DNA-Immunisierung mit dem pCG-PrP-Vektor nachgewiesen werden, die sich allerdings nicht von der Zytokinantwort, die durch den leeren Vektor induziert wurde, unterschied. Vergleichbare Ergebnisse konnte für die TNF α - und IFN γ -Antwort der CD4⁺-Zellen der *Prnp*^{0/0}-Mäuse, die mit dem pCG-PrP-P30-Vektor immunisiert worden waren, gezeigt werden. Die intrazelluläre Zytokinfärbung der CD8⁺-Zellen der *Prnp*^{0/0}-Mäuse, die den pCG-PrP-Vektor erhielten, ergab

Ergebnisse

ebenfalls eine $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{IFN}\gamma$ -Antwort. Diese Zytokinantwort war allerdings vergleichbar zur CD8^+ -Antwort der mit dem pCG-PrP-P30 oder dem Kontrollvektor immunisierten $\text{Prnp}^{0/0}$ -Mäuse (Abbildung 35). Es konnte weder für die CD4^+ - noch für die CD8^+ -Zellen der unterschiedlich DNA-immunisierten $\text{Prnp}^{0/0}$ -Mäuse die Zytokine IL-5 und IL-4 nachgewiesen werden.

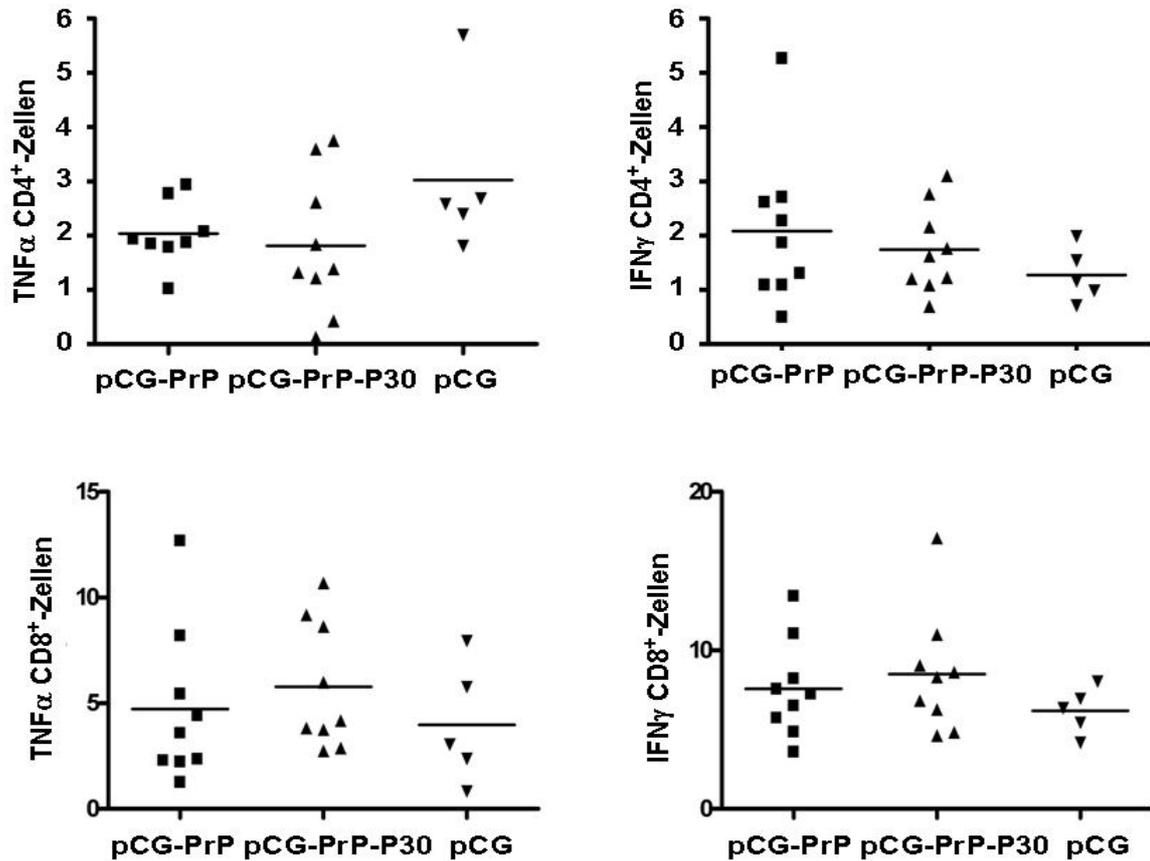


Abbildung 35: Intrazelluläre Zytokinantwort in $\text{Prnp}^{0/0}$ -Mäusen nach DNA-Immunsisierung

Die oberen Diagramme zeigen die Zytokinantwort für CD4^+ -Zellen; $\text{TNF}\alpha$ (links) und $\text{IFN}\gamma$ (rechts). In den unteren beiden Diagrammen ist die Zytokinantwort für CD8^+ -Zellen dargestellt; $\text{TNF}\alpha$ (links) und $\text{IFN}\gamma$ (rechts). Als Negativkontrollen wurden Tiere genutzt, die nur den leeren Vektor erhielten. (pCG-PrP n=9; pCG-PrP-P30 n=9; pCG n=5)

Die Ergebnisse der intrazellulären Zytokinantwort für C57BL/6-Mäuse, die mit dem pCG-PrP-Vektor immunisiert wurden, zeigen eine $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{IFN}\gamma$ -Antwort in den CD4^+ - und CD8^+ -Zellen. Diese Zytokinantwort ist für die CD8^+ -Zellen signifikant (Mann-Whitney-Test) unterschiedlich zur Zytokinantwort der Kontrolltiere ($\text{TNF}\alpha$ p=0,047 und $\text{IFN}\gamma$ p=0,0193). In den CD4^+ -Zellen konnte eine starke $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{IFN}\gamma$ -Antwort gezeigt werden, diese war jedoch nicht signifikant verschieden

Ergebnisse

zur induzierten Immunantwort in den Kontrolltieren (Abbildung 36). Die Immunisierung mit pCG-PrP führte zu keiner Induktion der Zytokine IL-4 und IL-5. Durch die Immunisierung mit dem pCG-PrP-P30-Vektor in C57BL/6-Mäuse konnte nur eine schwache zelluläre Immunantwort in den CD4⁺- und CD8⁺-Zellen induziert werden. Die Zytokinantwort für TNF α und IFN γ war vergleichbar mit der der Kontrolltiere, die nur den leeren Vektor erhalten haben (Abbildung 36). Es konnten keine Zytokine der Th2-Antwort (IL-4 und IL-5) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es konnte also gezeigt werden, dass die intrazelluläre Zytokinantwort nicht durch das Einfügen des Th-Epitopes P30 erhöht wird.

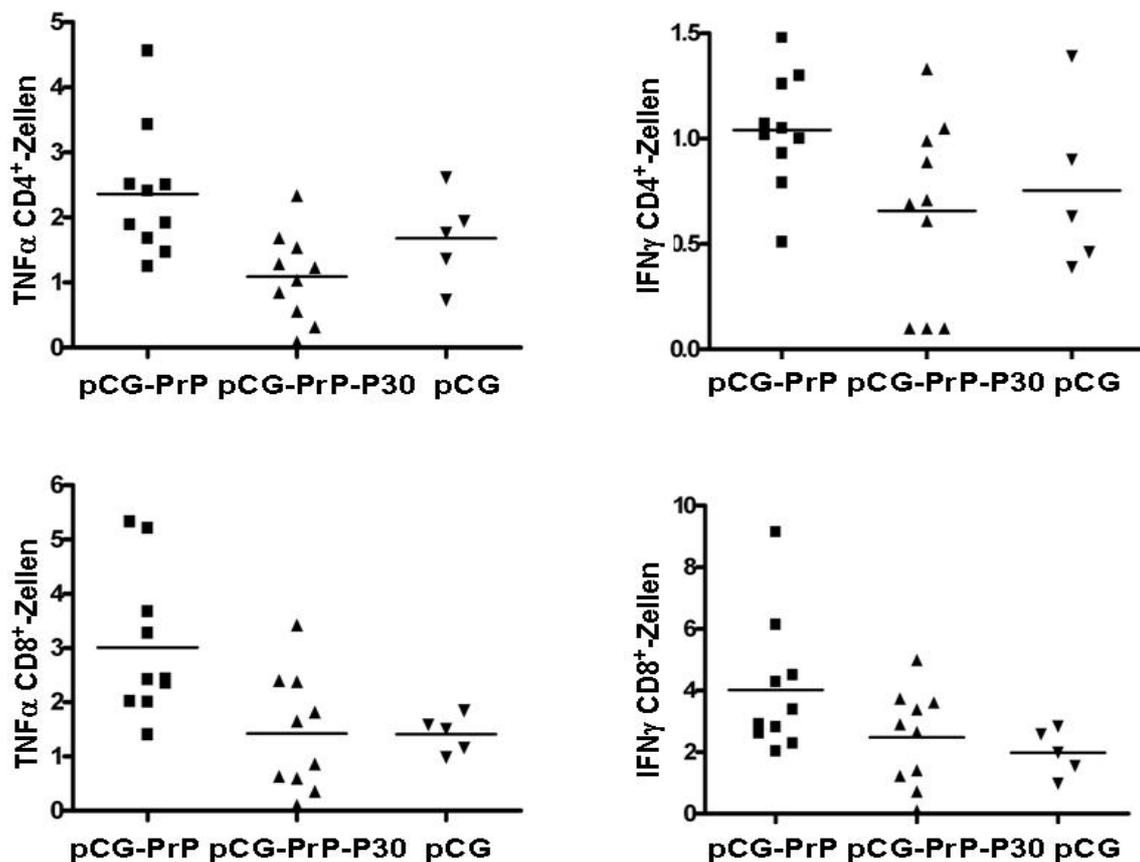


Abbildung 36: Intrazelluläre Zytokinantwort in C57BL/6-Mäusen nach DNA-Immunisierung

Die oberen Diagramme zeigen die Zytokinantwort für CD4⁺-Zellen; TNF α (links) und IFN γ (rechts). In den unteren beiden Diagrammen ist die Zytokinantwort für CD8⁺-Zellen dargestellt; TNF α (links) und IFN γ (rechts). Als Negativkontrollen wurden Tiere genutzt, die nur den leeren Vektor erhielten (pCG-PrP n=10; pCG-PrP-P30 n=10; pCG n=5). Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen pCG-PrP und pCG immunisierten C57BL/6-Mäusen für TNF α ⁺CD8⁺-Zellen (p=0,0047) und IFN γ ⁺CD8⁺-Zellen (p=0,0193) (Mann-Whitney-Test).

3.2.9 Untersuchung der PrP-spezifischen Proliferation der CD4⁺-Zellen der DNA-immunisierten Mäuse *in vitro*

Für die weitere Analyse der zellulären Immunantwort, wurde der Proliferationstest durchgeführt. Hierbei wurden die Milzzellen der DNA-immunisierten Mäuse spezifisch mit rekombinantem Prion-Protein stimuliert. Da für das Prion-Protein noch keine spezifischen T-Zell-Epitope bekannt sind, war eine Stimulation mit Peptiden, wie es nach DNA-Immunsierung üblich ist, um CD8⁺-Zellen zu stimulieren, nicht möglich. Das heißt, es wurden in diesem Test durch die Stimulation mit rek. mPrP nur die spezifischen CD4⁺-Zellen zur Proliferation angeregt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Milzzellen der *Prnp*^{0/0}-Mäuse, die mit pCG-PrP-P30 immunisiert wurden, nach spezifischer Stimulation eine stärkere Proliferation aufwiesen, als die Zellen der *Prnp*^{0/0}-Mäuse, die mit pCG-PrP oder dem leeren pCG-Vektor immunisiert worden waren. Die Milzzellen der mit pCG-PrP immunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse zeigte nur eine schwache Proliferation im Vergleich zu den Milzzellen der pCG-Kontrollgruppe (Abbildung 37). Es konnte keine PrP-spezifische Proliferation in den Milzzellen der immunisierten C57BL/6-Mäuse nachgewiesen werden.

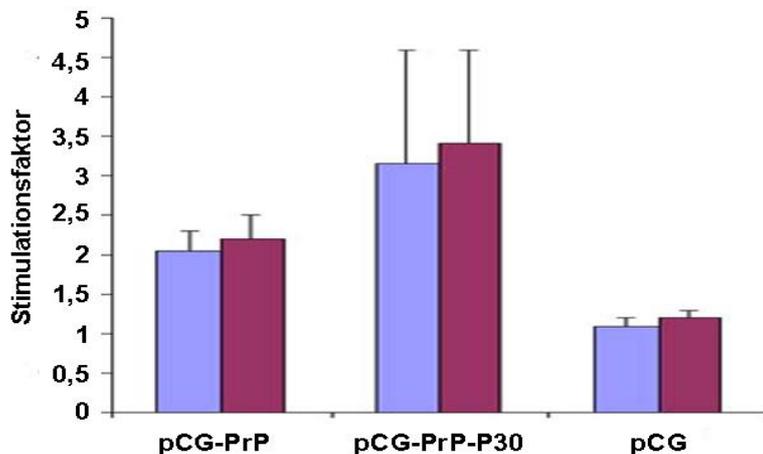


Abbildung 37: Proliferationsassay der *Prnp*^{0/0}-Tiere nach DNA-Immunsierung

In dieser Abbildung sind die Mittelwerte der Stimulationsfaktoren für die einzelnen Gruppen mit deren Standardabweichung dargestellt. Die blauen Balken stehen für die Zellen, die mit 2,5µg/ml rek. mPrP stimuliert wurden und die roten Balken stehen für die Zellen, die mit 5µg/ml Antigen stimuliert wurden (pCG-PrP n=9; pCG-PrP-P30 n=9; pCG n=2)

3.2.10 Zytokine im Zellkulturüberstand von PrP-stimulierten Milzzellen immunisierter *Prnp*^{0/0}-Mäuse

Eine weitere Methode zur Untersuchung der zellulären Immunantwort, ist die Messung der Zytokine im Überstand nach spezifischer Stimulation der Milzzellen der immunisierten Mäuse mit rek. mPrP. Bei diesem Versuch erfolgte die Analyse der sich im Überstand befindenden Zytokine 48 Std. nach Stimulation mit Hilfe des CBA-Kits. Hierfür wurden IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ und TNF α untersucht. Die Messung ergab, dass bei spezifischer Restimulation der Milzzellen der pCG-PrP immunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse mit rek. mPrP sowohl TNF α als auch IFN γ im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden konnte. Bei den Milzzellen der *Prnp*^{0/0}-Mäuse, die mit dem pCG-PrP-P30-Vektor immunisiert und *in vitro* restimuliert wurden kam es zu einer Ausschüttung von IFN γ in den Zellkulturüberstand. Es konnte keine Zytokine im Überstand der restimulierten Milzzellen von Mäusen detektiert werden, die mit dem leeren Vektor immunisiert wurden (Abbildung 38). Desweiteren konnte in keinem der Zellkulturüberstände IL-2, IL4 oder IL-10 nachgewiesen werden.

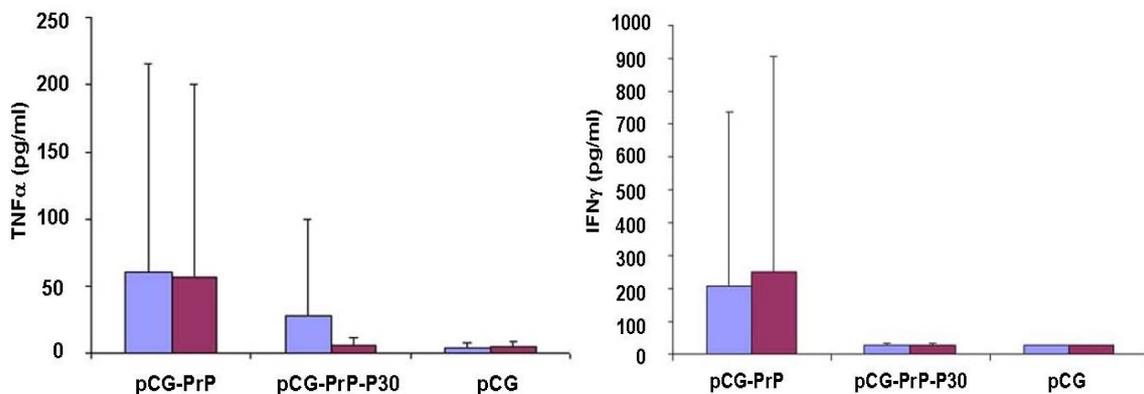


Abbildung 38: Zytokine im Überstand von *in vitro* stimulierten Milzzellen DNA-immunisierter *Prnp*^{0/0}-Mäuse

In dieser Abbildung sind die Mittelwerte der Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen für IFN γ (links) und TNF α (rechts) und deren Standardabweichung dargestellt. Die blauen Balken stehen für die Überstände der Zellen, die mit 2,5 µg/ml rek. mPrP stimuliert wurden und die roten Balken stehen für die Überstände der Zellen, die mit 5 µg/ml Antigen stimuliert wurden (pCG-PrP n=9; pCG-PrP-P30 n=9; pCG n=2).

3.3 Kombination von DNA- und Proteinimmunisierung

Da es durch die vorangegangenen Immunisierungen nicht möglich war, die Toleranz in C57BL/6-Mäusen gegen das Prion-Protein zu brechen, wurden DNA- und Proteinimmunisierung kombiniert, um so eine spezifische Immunantwort zu induzieren. Für dieses Immunisierungsprotokoll wurden *Prnp*^{0/0}- und C57BL/6-Mäuse über 5 Monate mit den verschiedenen DNA-Vektoren immunisiert, und anschließend erhielten die Tiere zwei Immunisierungen mit dem rekombinanten Maus-Prion-Protein und CpG-1668 als Adjuvants (Abbildung 39). Die Kontrolltiere erhielten den leeren Vektor pCG und später nur das Adjuvants CpG-1668. Es wurden wieder der pCG-PrP und der pCG-PrP-P30-Vektor für die DNA-Immunisierung genutzt.

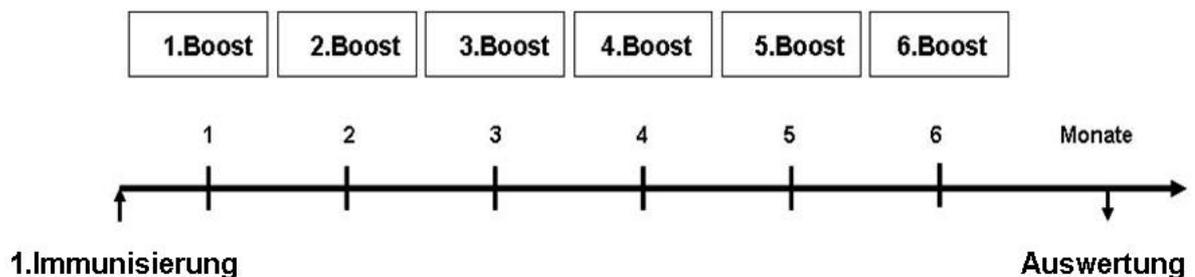


Abbildung 39: Immunisierungsschema DNA-Impfstoff + Protein in *Prnp*^{0/0}- und C57BL/6-Mäusen

Die Immunisierungen erfolgten im Abstand von 4 Wochen. Eine Woche nach der letzten Immunisierung erfolgte die Untersuchung der immunisierten Mäuse auf ihre humorale und zelluläre Immunantwort gegen das Prion-Protein.

Die DNA wurde, wie auch in den vorangegangenen Experimenten, in einer Konzentration von 100µg in 50µl PBS verabreicht. Die ersten drei DNA-Immunisierungen wurden intradermal, und die 4. und 5. Immunisierung wurde subkutan durchgeführt. Die letzten beiden Immunisierungen erfolgten mit Protein (rek. mPrP) und Adjuvants (CpG-1668) subkutan.

3.3.1 Untersuchung der induzierten Antikörper nach Kombinationsimmunisierung mit DNA und Protein

Die immunisierten *Prnp*^{0/0}- und C57BL/6-Mäuse wurden sieben Tage nach der letzten Immunisierung getötet, und Blut für die Untersuchung der humoralen

Ergebnisse

Immunantwort abgenommen. Es erfolgte eine Analyse der Seren auf spezifische Antikörper gegen das rekombinante Maus-Prion-Protein (rek. mPrP) im ELISA. Die Ergebnisse zeigen, dass in fast allen *Prnp*^{0/0}-Tieren eine Antikörperantwort nach DNA-Immunsisierung kombiniert mit Proteinimmunsisierung induziert werden konnte. Es gab nur in der Gruppe der *Prnp*^{0/0}-Tiere, die mit pCG-PrP immunisiert wurden Seren, in denen keine Antikörper nachgewiesen werden konnten (Abbildung 40). Die induzierten Antikörpertiter gegen das PrP in *Prnp*^{0/0}-Mäuse, die mit dem pCG-PrP-Vektor und Protein immunisiert worden waren, waren vergleichbar mit den Antikörpertitern, die in der Gruppe der *Prnp*^{0/0}-Mäuse, die mit dem pCG-PrP-P30-Vektor und Protein nachgewiesen werden konnten.

Es wurden ebenfalls die Seren der immunisierten C57BL/6-Mäuse untersucht. Es konnten jedoch keine spezifischen Antikörper gegen das rek. mPrP detektiert werden (Abbildung 40).

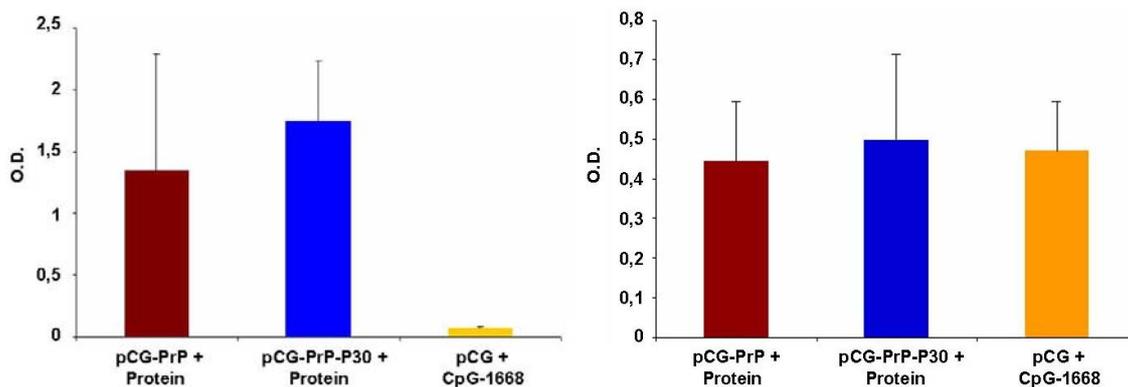


Abbildung 40: Anti-PrP^C Antikörper in *Prnp*^{0/0}- und C57BL/6-Mäusen nach kombinierter DNA- und Proteinimmunsisierung

Darstellung der Mittelwerte der verschiedenen Immunisierungsgruppen, *Prnp*^{0/0}-Mäuse (links) und C57BL/6-Mäuse (rechts), und deren Standardabweichung. Die Seren der *Prnp*^{0/0}-Mäuse wurden 1:1000 verdünnt, die Seren der C57BL/6-Mäuse wurden in einer Verdünnung von 1:40 eingesetzt. (*Prnp*^{0/0}-Mäuse: pCG-PrP+Protein n=6; pCG-PrP-P30+Protein n=5; pCG+CpG-1668 n=4; C57BL/6-Mäuse: pCG-PrP+Protein n=10; pCG-PrP-P30+Protein n=10; pCG+CpG-1668 n=10)

Die im ELISA für Gesamt-Immunglobuline positiv getesteten Seren der *Prnp*^{0/0}-Mäuse wurden im nächsten Schritt auf die Subtypen IgG1 und IgG2a untersucht, um einen Einfluss der Kombination von DNA und Protein auf die Polarisierung der Th-Antwort nachzuweisen. Die Resultate zeigten sowohl in der Gruppe der Mäuse, die den pCG-PrP-Vektor und Protein bekommen hatte, als auch in der Gruppe der Mäuse, die den pCG-PrP-P30-Vektor und Protein eine

Ergebnisse

Induktion von PrP-spezifischen IgG1- und IgG2a-Antikörpern. Die IgG1-Antikörperantwort war dominierend. Als Negativkontrolle diente die Gruppe der Mäuse, die den leeren Vektor und nur das Adjuvants erhielten. Diese Tiere zeigten wie erwartet keine Antikörperantwort gegen das Prion-Protein (Abbildung 41).

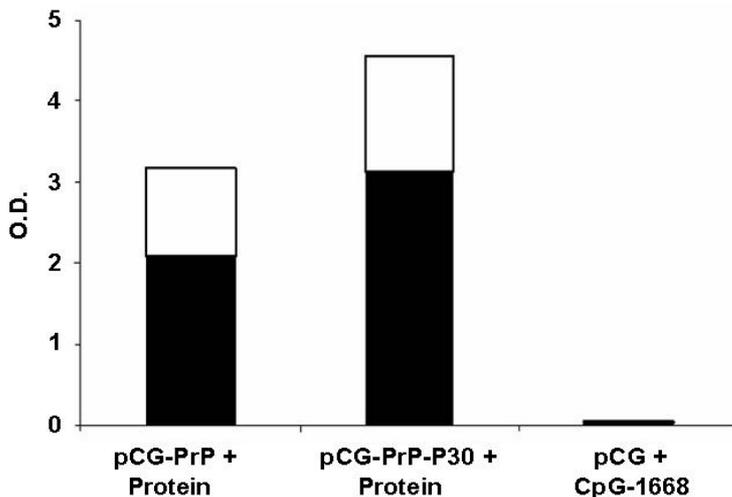


Abbildung 41: Anti-PrP^C Immunglobulinsubtypen in *Prnp*^{0/0}-Mäusen nach Immunisierung mit DNA + Protein in *Prnp*^{0/0}-Mäuse

Darstellung der Mittelwerte der verschiedenen Immunisierungsgruppen (pCG-PrP+Protein n=3; pCG-PrP-P30+Protein n=5; pCG n=5). Die Seren wurden 1:1000 verdünnt. Für die Detektion wurde anti-Maus IgG1 (schwarzer Balken) und anti-Maus IgG2a (weißer Balken) verwendet.

3.3.2 FACS-Analyse der Seren nach Kombinationsimmunisierung mit DNA und Protein

Im ELISA konnte gezeigt werden, dass in *Prnp*^{0/0}-Mäusen eine spezifische Antikörperantwort gegen das Prion-Protein induziert wurde, wohingegen keine Antikörper in den Seren der immunisierten C57BL/6-Mäuse nachgewiesen werden konnten. Durch die FACS-Analyse sollte untersucht werden, ob in den im ELISA negativ getesteten Seren der C57BL/6- oder *Prnp*^{0/0}-Mäuse, aus der Gruppe der pCG-PrP und proteinimmunisierten Mäuse, strukturabhängige Antikörper vorhanden sind, die nur an die zelluläre Form des Prion-Proteins binden. Dafür wurden die Seren mit den PrP^C-überexprimierenden N2a-Zellen inkubiert und im Durchflußzytometer analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass nur die Seren, die auch im ELISA auf spezifische Antikörper gegen das Prion-Protein positiv getestet wurden, das Prion-Protein auf N2a-Zellen erkennen und binden (Abbildung 42).

Ergebnisse

Mit den negativen Seren der C57BL/6- und *Prnp^{0/0}*-Mäuse konnte dagegen keine Antikörperbindung im FACS detektiert werden (Abbildung 42).

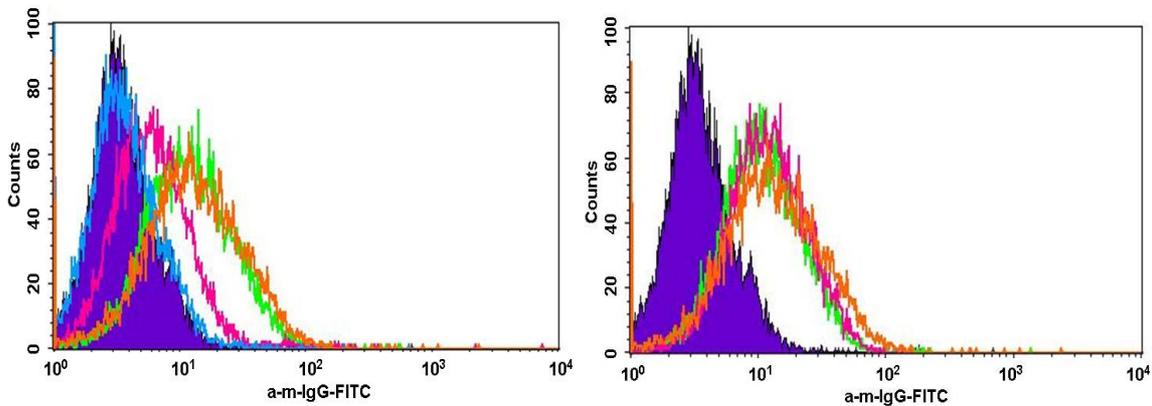


Abbildung 42: FACS-Analyse der Seren der *Prnp^{0/0}*-Mäuse nach Kombinationsimmunisierung mit DNA und Protein

50µl der Seren wurde auf die Zellen gegeben. Die Abbildung auf der linken Seite zeigt Seren von pCG-PrP+Protein immunisierten Tieren (grün, blau, pink), die Abbildung auf der rechten Seite zeigt Seren von pCG-PrP-P30+Protein immunisierten Tieren (pink, grün). Negativkontrolle: Serum eines Tieres, das mit dem leeren Vektor pCG+CpG-1668 immunisiert wurde (violett-gefülltes Histogramm) Positivkontrolle: 6H4-Antikörper (orange)

3.3.3 Untersuchung der intrazellulären Zytokinantwort nach Kombination von DNA- und Proteinimmunisierung

Bei den Mäusen, die sowohl mit DNA als auch mit Protein immunisiert wurden, erfolgte die Untersuchung der zellulären Immunantwort mit Hilfe der intrazellulären Zytokinfärbung. Als Markerzytokine wurden $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ (Th1) und IL-4 und IL-5 (Th2) verwendet. Die Milzzellen der immunisierten Mäuse wurden *ex vivo* durch eine anti-CD3/CD28 Behandlung stimuliert, um die durch die Immunisierung stimulierten T-Zellen zu aktivieren, und eine Zytokinproduktion in den Zellen zu induzieren. Es konnte durch die intrazelluläre Zytokinfärbung der T-Zellen der *Prnp^{0/0}*-Mäuse, die mit pCG-PrP und Protein immunisiert worden waren, eine hohe $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{IFN}\gamma$ -Antwort nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterschieden sich nicht von denen der *Prnp^{0/0}*-Mäuse, die mit pCG-PrP-P30 und Protein oder dem leeren Vektor und Adjuvants immunisiert worden waren. Die Zytokinantwort für $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ war insgesamt stärker in den CD8^+ -Zellen, als in den CD4^+ -Zellen, allerdings gab es keine Unterschiede zwischen den verschiedenen immunisierten Mäusen. Es konnte weder IL-5 noch IL-10 in den CD4^+ - bzw. CD8^+ -Zellen der immunisierten *Prnp^{0/0}*-Mäuse gemessen werden (Abbildung 43).

Ergebnisse

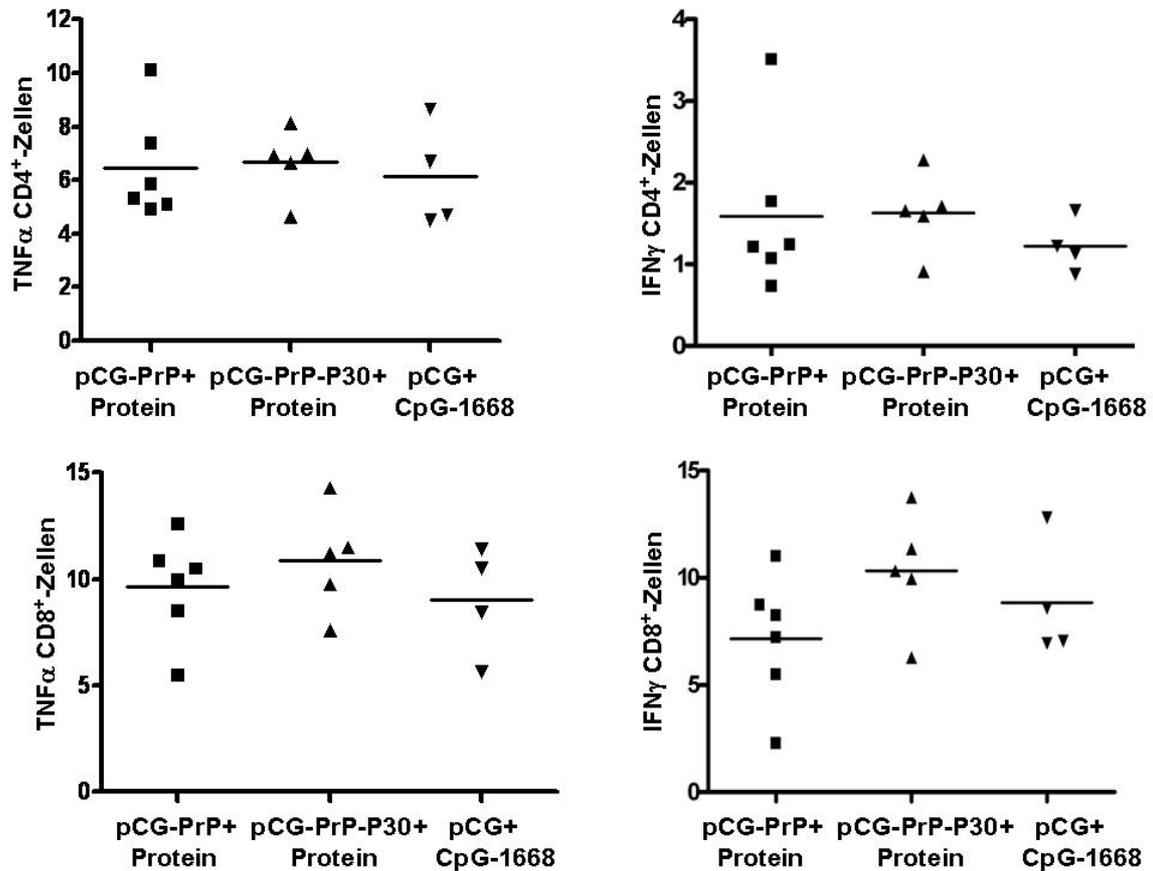


Abbildung 43: Intrazelluläre Zytokinantwort nach DNA- und Proteinimmunisierung in Milzzellen von *Prnp*^{0/0}-Mäusen

Die oberen Diagramme zeigen die Zytokinantwort für CD4⁺-Zellen; TNF α (links) und IFN γ (rechts). In den unteren beiden Diagrammen ist die Zytokinantwort für CD8⁺-Zellen dargestellt; TNF α (links) und IFN γ (rechts). Als Negativkontrollen wurden Tiere genutzt, die nur den leeren Vektor mit dem Adjuvants erhielten (pCG-PrP+Protein n=6; pCG-PrP-P30+Protein n=5; pCG+CpG-1668 n=4).

Die Untersuchung der intrazellulären Zytokinantwort der C57BL/6-Mäuse ergab, dass nach Immunisierung mit pCG-PrP und Protein eine starke TNF α -Antwort für CD4⁺- und CD8⁺-Zellen induziert wurde. Diese Ergebnisse konnten auch für die Milzzellen der pCG-PrP-P30 und Protein immunisierten Mäuse gezeigt werden. Die induzierte Zytokinantwort unterschied sich nicht von der der Kontrollgruppe, die nur den leeren Vektor und das Adjuvants erhalten hatte. Die durch die Immunisierung von DNA und Protein induzierte IFN γ -Antwort für CD4⁺- und CD8⁺-Zellen war schwächer als die TNF α -Antwort, unterschied sich jedoch nicht zwischen den unterschiedlich immunisierten C57BL/6-Mäusen (Abbildung 44).

Ergebnisse

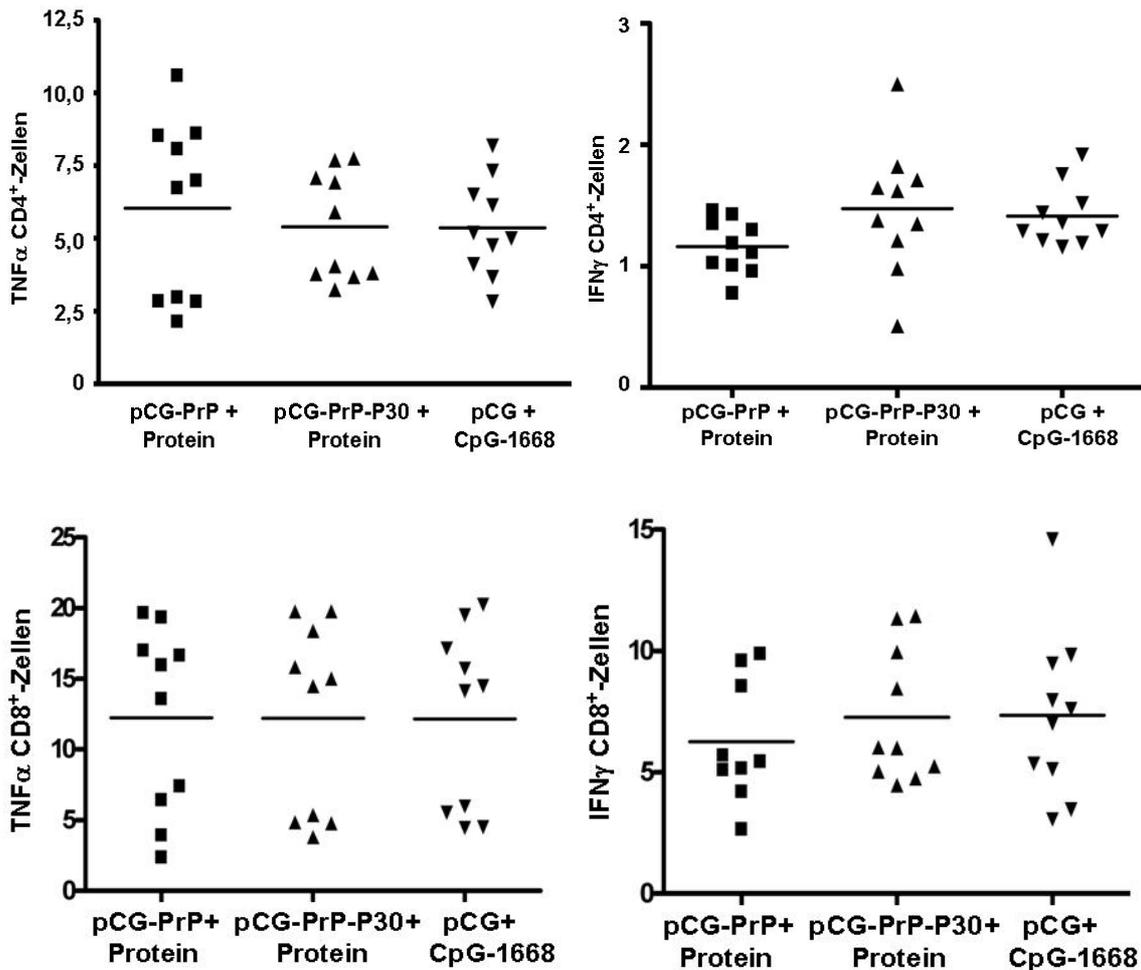


Abbildung 44: Intrazelluläre Zytokinfärbung nach Immunisierung mit DNA + Protein in C57BL/6-Mäusen

Die oberen Diagramme zeigen die Zytokinantwort für CD4⁺-Zellen; TNF α (links) und IFN γ (rechts). In den unteren beiden Diagrammen ist die Zytokinantwort für CD8⁺-Zellen dargestellt; TNF α (links) und IFN γ (rechts). Als Negativkontrollen wurden Tiere genutzt, die nur den leeren Vektor mit dem Adjuvants erhielten (pCG-PrP+Protein n=10; pCG-PrP-P30+Protein n=10; pCG+CpG-1668 n=10)

3.3.4 Inokulationen der C57BL/6-Mäuse mit Maus-Prionen

Für die Untersuchung der Fragestellung, ob die Immunisierung einen Einfluss auf die Entwicklung von Scrapie im Mausmodell hat, wurden die mit DNA und Protein immunisierten Tiere eine Woche nach der letzten Immunisierung mit 3 log LD₅₀ infektiösen Einheiten des "Rocky Mountain Laboratory"-Scrapie Stammes (RML) intraperitoneal (i.p.) infiziert. Als Kontrollen dienten Mäuse, die nur den leeren Vektor erhielten oder C57BL/6-Tiere, die nicht immunisiert wurden. Die Inokulation von nicht behandelten C57BL/6-Mäusen sollte zeigen, ob der Vektor allein schon zu einer Verlängerung der Inkubationszeit von Scrapie führen kann.

3.3.5 Untersuchung der induzierten Antikörper in den Seren der DNA-/proteinimmunisierten Mäuse nach Inokulation

Nachdem die Tiere erkrankt sind und im terminalen Stadium getötet wurden, erfolgte die Blutentnahme. Die Seren der inokulierten Tiere wurden auf Antikörper gegen das Maus-Prion-Protein untersucht. Hierbei sollte kontrolliert werden, ob sich die durch die Immunisierung induzierte humorale Immunantwort nach Inokulation veränderte. Es konnte keine spezifische Antikörperantwort gegen das Prion-Protein in den immunisierten und nicht immunisierten Gruppen nachgewiesen werden (Abbildung 45).

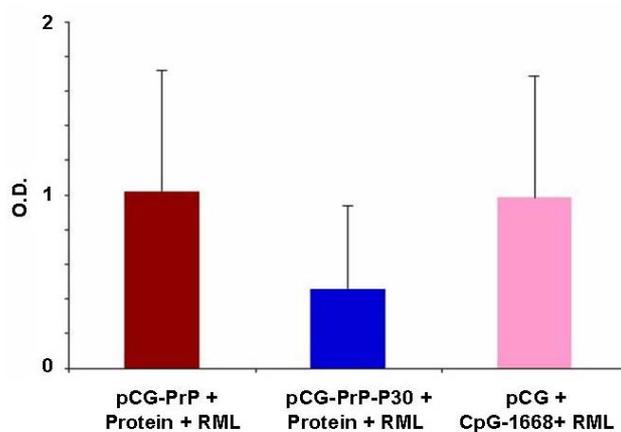


Abbildung 45: Anti-PrP^c Antikörper in C57BL/6-Mäusen nach kombinierter DNA- und Proteinimmunisierung und Inokulation mit RML

Die immunisierten Tiere wurden mit RML inokuliert und die Seren im terminalen Stadium gewonnen. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung gegen das Prion-Protein in terminalen C57BL/6-Mäusen; (pCG-PrP+Protein+RML n=5; pCG-PrP-P30+Protein+RML n=5; pCG+CpG-1668+RML n=7)

Die Seren der im terminalen Stadium getöteten immunisierten und nicht immunisierten C57BL/6-Mäuse wurden ebenfalls im FACS auf mögliche Antikörperbindung hin untersucht. Es konnten keine spezifischen Antikörper gegen die zelluläre Form des Prion-Proteins auf den N2a-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 46).

Ergebnisse

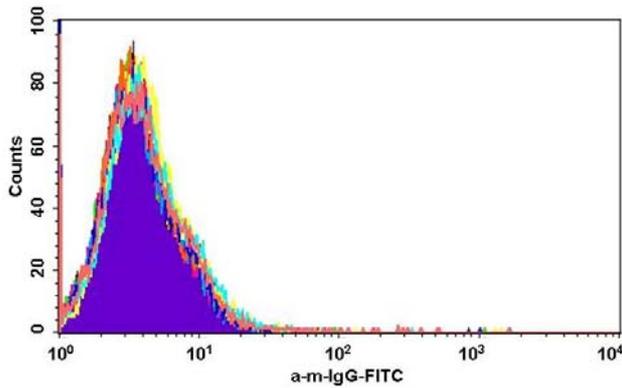


Abbildung 46: FACS-Analyse der Seren der terminal erkrankten C57BL/6-Mäuse

Die immunisierten Tiere wurden mit RML inokuliert und die Seren im terminalen Stadium gewonnen. 50µl der Seren wurde unverdünnt auf die Zellen gegeben. Die Abbildung zeigt Seren von pCG-PrP+Protein immunisierten und mit RML inokulierten Tieren (grün, pink), Seren der Mäuse, die mit dem pCG-PrP-P30-Vektor+Protein immunisiert und mit RML inokuliert wurden (blau, orange), Seren der Mäuse, die mit dem leeren Vektor+CpG-1668 immunisiert und mit RML inokuliert wurden (gelb, türkis). Als Negativkontrolle diente das Serum eines Tieres, das nicht immunisiert, aber mit RML inokuliert wurde (violett-gefülltes Histogramm).

3.3.6 Bestimmung der Infektiositätstiter der inokulierten C57BL/6-Mäuse

Für die Bestimmung der Infektiositätstiter, die sich 45 Tage nach Inokulation in den Milzen der immunisierten und nicht immunisierten Mäusen befand, wurde der Bioassay genutzt (Fischer et al., 1996). Für diese Analyse wurde ein 1%iges Milzhomogenat hergestellt und in Tg20-Mäuse, die PrP^C überexprimieren, intracerebral appliziert. Die Tg20-Mäuse haben eine verkürzte Inkubationszeit nach Inokulation, wodurch man innerhalb kurzer Zeit erste Aussagen über die vorhandene Infektiosität in den Milzhomogenaten treffen kann. Die Ergebnisse zeigten keine Unterschiede in der Inkubationszeit zwischen Tg20-Tieren, die das Milzhomogenat von pCG-PrP-, pCG-PrP-P30-, pCG- oder nicht immunisierten Mäusen erhielten. Das heißt, dass sich in allen Tieren, unabhängig von der Immunisierung, zum Zeitpunkt 45 Tage nach Inokulation die gleiche Menge an Maus-Prionen in der Milz befand (Daten nicht gezeigt).

3.3.7 Überlebensanalyse

Die Mäuse aus den unterschiedlichen Kombinationsimmunisierungen wurden nach Inokulation auf die Entwicklung und mögliche Unterschiede in der

Ergebnisse

Krankheitsentstehung untersucht. Die immunisierten und nicht immunisierten Mäuse wurden ab Tag 150 nach Infektion regelmäßig auf Krankheitssymptome untersucht. Im terminalen Stadium der Erkrankung erfolgte der Abbruch des Experiments. Die Mäuse wurden getötet und die Organe (Hirn und Milz) entnommen. Die Inkubationszeit bis zum terminalen Stadium ist in Abbildung 47 dargestellt. Es konnten keine Unterschiede im Krankheitsverlauf zwischen den verschiedenen inokulierten Gruppen festgestellt werden. Für die C57BL/6-Mäuse, die mit pCG-PrP und Protein immunisiert wurden ergab sich eine Inkubationszeit von 245 ± 18 Tagen. Mäuse, die den pCG-PrP-P30-Vektor und Protein erhalten haben, zeigten eine Inkubationszeit von 238 ± 13 Tagen und das Kontrolltiere, das mit dem leeren Vektor und dem Adjuvants immunisiert wurden zeigte eine Inkubationszeit von 238 Tagen. Bei den C57BL/6-Mäusen, die nicht immunisiert wurde konnte eine Inkubationszeit von 237 ± 10 gezeigt werden. Das bedeutet, dass die Immunisierung keinen Einfluss auf die Inkubationszeit hatte.

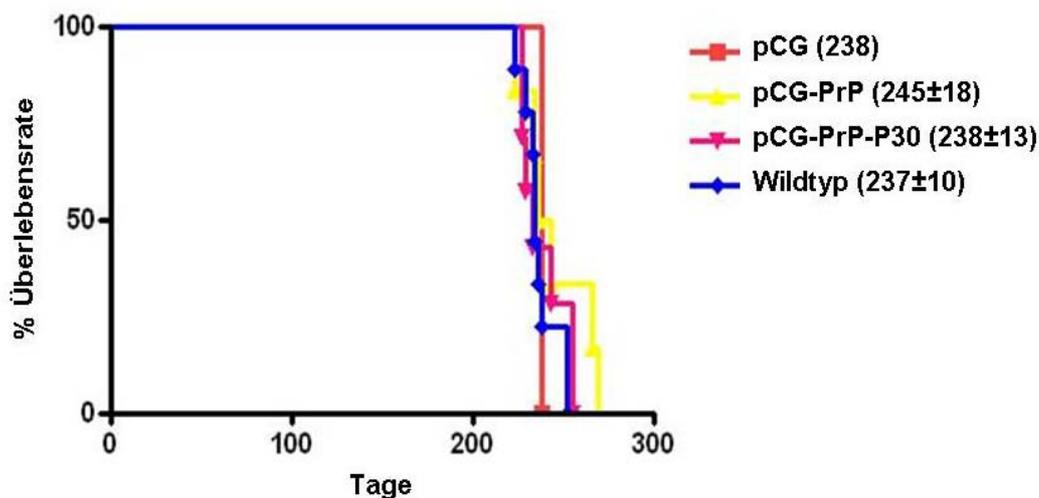


Abbildung 47: Überlebenskurve der inokulierten C57BL/6-Mäuse

Die prozentuale Überlebensrate wurde in einer Kaplan-Meier's-Kurve dargestellt. pCG+CpG-1668 (238 Tage n=1), pCG-PrP+Protein (245 ± 18 Tage n=6), pCG-PrP-P30+Protein (238 ± 13 Tage n=7), Wildtypiere (wt) (237 ± 10 Tage n=9)

3.3.8 Untersuchung der Organe der terminal erkrankten Mäuse auf PrP^{Sc}

Von den entnommenen Organen wurden 10%ige Homogenate hergestellt. Die Gehirne wurden in PBS mit Proteaseinhibitoren homogenisiert und ein Teil mit Proteinase K behandelt, um die zelluläre Form des Prion-Proteins von der pathogenen Form unterscheiden zu können. Die Analyse erfolgte mit dem

Ergebnisse

monoklonalen Antikörper 6H4. Es konnte in allen erkrankten Tieren PrP^{Sc} im Gehirn nachgewiesen werden (Abbildung 48).

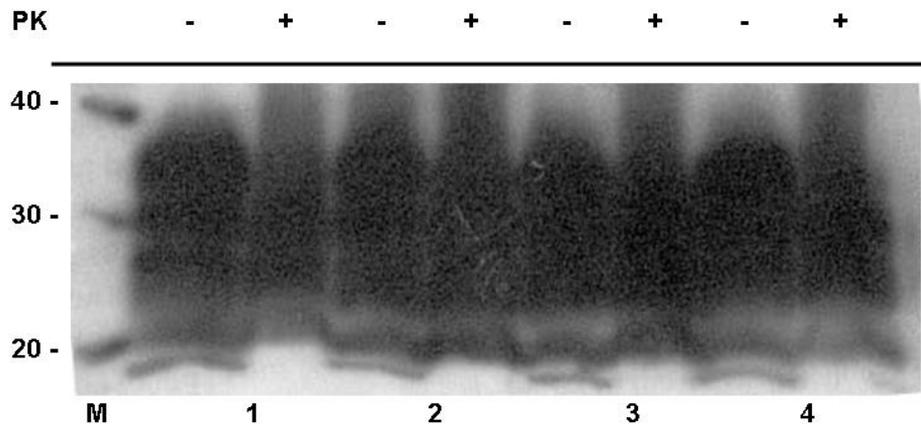


Abbildung 48: Westernblot der Hirnhomogenate

Im Westernblot sind Gehirnhomogenate von immunisierten/nicht immunisierten und mit RML inokulierten Mäusen unverdaut (-) und verdaut (+) aufgetragen. Der Verdau erfolgte mit Proteinase K (PK). (C57BL/6+RML, 1; pCG+CpG-1668+RML, 2; pCG-PrP+Protein+RML, 3; pCG-PrP-P30+Protein+RML 4; M=Marker)

Um die Milzproben im Westernblot zu analysieren, wurde eine Anreicherung von PrP^{Sc} durch Phosphotungstate durchgeführt. Bei dieser Methode bildet, bei neutralen pH und in Anwesenheit von Mg²⁺, Phosphotungstate (NaPTA) Komplexe mit den Oligomeren und Polymeren der infektiösen Form des PrP^{Sc}, aber nicht mit PrP^C. Durch diesen Test ist es möglich geringe Mengen an PrP^{Sc} in der Milz nachzuweisen. In den untersuchten Milzen der terminal erkrankten Tiere konnte PrP^{Sc} detektiert werden (Abbildung 49).

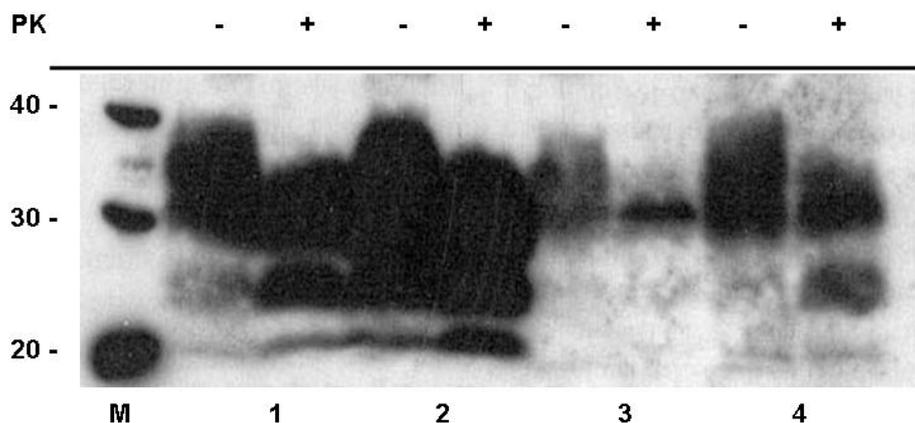


Abbildung 49: Westernblot der Milzhomogenate

Im Westernblot sind Milzhomogenate von immunisierten/nicht immunisierten und mit RML inokulierten Mäusen unverdaut (-) und verdaut (+) aufgetragen. Der Verdau erfolgte mit Proteinase K (PK). (C57BL/6+RML, 1; pCG+CpG-1668+RML, 2; pCG-PrP+Protein+ RML, 3; pCG-PrP-P30+Protein+RML 4; M=Marker)

3.3.9 Histologie von Gehirn und Milz der inokulierten C57BL/6-Mäuse

Die Gewebe der immunisierten und inokulierten Tiere wurde histologisch untersucht, um Veränderungen, die für Scrapie charakteristisch sind wie Astrozytose und spongiforme Veränderungen (Mikrovakuolen) im Gehirn, nachweisen zu können. Hierbei wurden von den Geweben Paraffinschnitte angefertigt und mit Hämalaun/Eosin (HE) gefärbt und eine immunohistochemische Färbung mit einem gliazellspezifischen Antikörper (GFAP) angefertigt. Es zeigte sich, dass in allen Gruppen histopathologische Merkmale für Scrapie im Gehirn nachzuweisen waren. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den immunisierten und nicht immunisierten C57BL/6-Mäusen gefunden werden (Abbildung 50).

Im nächsten Schritt sollte anhand von Milzschnitten untersucht werden, ob morphologische Veränderungen nach einer Immunisierung mit DNA und Protein zu finden sind. In den HE-Färbungen zeigte sich, dass die Immunisierung zu keiner Veränderung der Morphologie in der Milz führte (Abbildung 50).

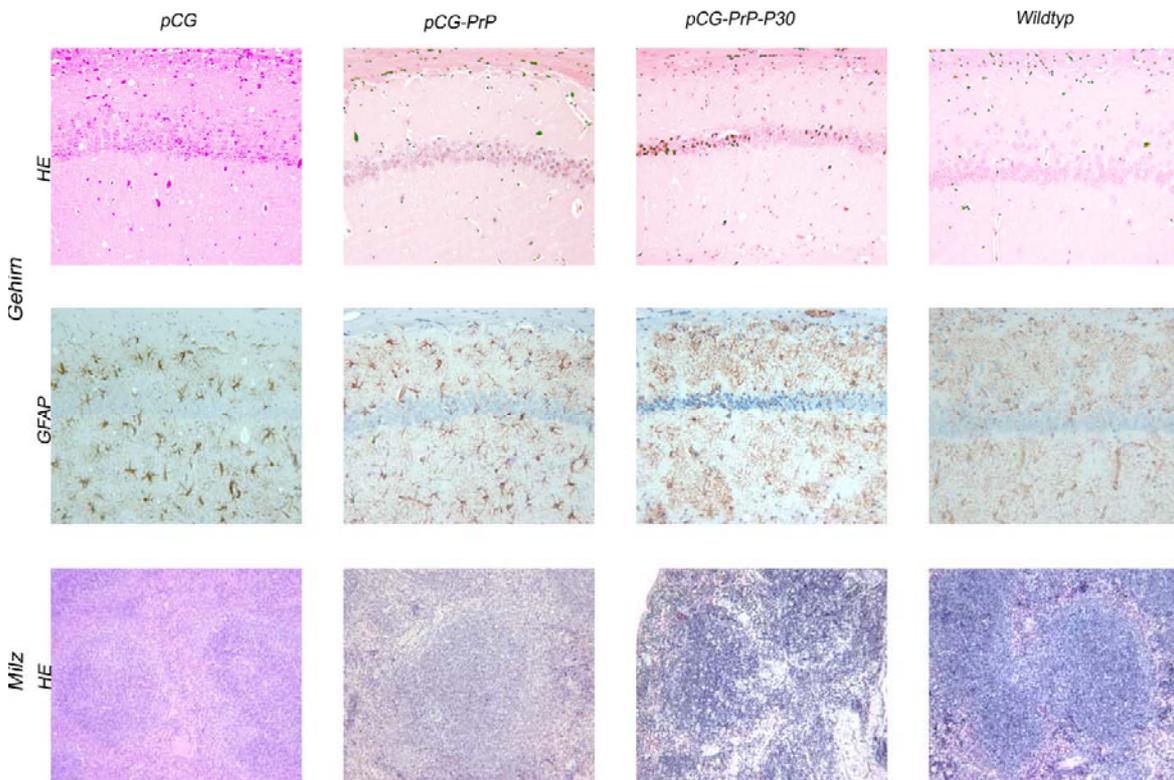


Abbildung 50: Histologie von Gehirn- und Milzschnitten

Dargestellt ist ein Ausschnitt des hippocampalen Neuronenbandes im Gehirn mit typischen spongiformen Veränderungen (HE-Färbung, obere Reihe). In der mittleren Reihe ist die begleitende reaktive Gliose im Neuronenband dargestellt. Die untere Reihe zeigt die weiße und rote Pulpa der Milz mit einer unveränderten Histarchitektur.

Ergebnisse

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die Immunisierung mit rek. mPrP und unterschiedlichen Adjuvantien bzw. durch die DNA-Immunisierung mit PrP-exprimierenden Vektoren eine spezifische Immunantwort gegen das Prion-Protein in *Prnp*^{0/0}-Mäusen induziert werden konnte. Es war jedoch mit keiner der durchgeführten Immunisierungsstrategien möglich die Toleranz gegen das PrP^C in C57BL/6-Mäusen zu brechen, um so die Entstehung von Scrapie zu verhindern.

4 Diskussion

Prionenerkrankungen oder übertragbare spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind im Gegensatz zu anderen Erkrankungen, die mit einer Proteinaggregation einhergehen, wie z.B. der Alzheimer Erkrankung, übertragbar. Das Auftreten der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) in Rindern (Wells et al., 1987), das vermutlich durch die Aufnahme von Prionen über die Nahrungskette erfolgte (Weissmann und Aguzzi, 1997), hat in den letzten Jahren das wissenschaftliche und gesellschaftliche Interesse geweckt, da experimentelle Ergebnisse die Hypothese zulassen, dass die Übertragung von bovinen Prionen auf den Menschen zur Entstehung der Varianten der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (vCJD) führt (Collinge et al., 1996; Will et al., 1996; Bruce et al., 1997; Hill et al., 1997). Aktuelle Erkenntnisse zeigten außerdem, dass Prionenerkrankungen auch durch den Blutprodukte übertragen werden können (Hunter et al., 2002; Llewelyn et al., 2004; Peden et al., 2004).

Obwohl das Immunsystem an der Neuroinvasion von Prionen beteiligt ist, konnte nach Infektion keine humorale oder zelluläre Immunantwort gegen das Prion-Protein (PrP^C) bei Menschen und Tieren gefunden werden. Das Fehlen einer detektierbaren Immunantwort bei TSEs ist auf eine immunologische Toleranz zurückzuführen, da es sich beim Prion-Protein um ein körpereigenes ubiquitär exprimiertes Protein handelt (Porter et al., 1973; Kingsbury et al., 1981, Bueler et al., 1993). Es ist daher wichtig Immunisierungsstrategien zu entwickeln, mit denen es möglich ist, die immunologische Toleranz zu brechen, um so Menschen und Tiere vor der Entstehung von tödlich verlaufenden TSEs zu schützen. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung einer aktiven Immunisierungsstrategie gegen das Prion-Protein. Es sollte untersucht werden, ob es möglich ist eine humorale und zelluläre Immunantwort gegen das PrP^C zu induzieren und ob diese einen Effekt auf die Entstehung und Inkubationszeit von Prionenerkrankungen haben.

4.1 Proteinimmunisierung mit rekombinantem PrP

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Immunantwort gegen das Prion-Protein nach Immunisierung mit rekombinantem Maus-PrP (rek. mPrP) untersucht. Die

Diskussion

erfolgreiche Immunisierung mit rekombinanten Proteinen ist abhängig von der Wahl des Adjuvants (Freund, 1956; Warren et al., 1986; Gupta et al., 1993; Bomford, 1998). Durch die Adjuvantien kann die Immunantwort nicht nur verstärkt werden, sondern sie beeinflussen auch den Typ der induzierten Immunantwort (Th1 oder Th2) (Mosmann und Coffman, 1989; Comoy et al., 1997). Für die Immunisierung gegen das Prion-Protein (PrP) mit rekombinantem Maus-PrP (rek. mPrP) ist es wichtig ein starkes immunstimulatives Adjuvants zu benutzen, um so eventuell die immunologische Toleranz brechen zu können. Wie Immunisierungen gegen das Oberflächenantigen von Hepatitis B (HBsAg) gezeigt haben, wurde durch die Verwendung von CpG-ODN oder inkomplettem Freundschens Adjuvants (IFA) die Immunantwort gegen das HBsAg signifikant verstärkt (McCluskie et al., 1998; Millan et al., 1998; Weeratna et al., 2001). Desweiteren führte die Verwendung von CpG-ODN oder IFA zu weniger Schädigungen des Gewebes als zum Beispiel Komplettes Freundsches Adjuvants oder Titermax Gold[®] (Broderson, 1989; Toth et al., 1989; Wiedemann et al., 1991; Leenaars et al., 1998; Weeretna et al., 2000). Deshalb wurden in dieser Arbeit IFA, CpG-1668 oder CpG-1826 als Adjuvantien verwendet. Wie in den Abbildungen 5 und 16 gezeigt, konnte nach Proteinimmunisierung in *Prnp*^{0/0}-Mäusen eine starke Antikörperantwort gegen das Prion-Protein induziert werden, die sich zwischen den mit rek. mPrP+CpG1668, rek. mPrP+CpG-1826 und rek. mPrP+IFA immunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäusen nicht unterschied. Um zu untersuchen, ob durch den immunstimulativen Effekt der Adjuvantien die Toleranz gegen das zelluläre PrP gebrochen werden kann (Koller et al., 2002), wurden Wildtyp-Mäuse, die PrP besitzen, mit rek. mPrP und den verschiedenen Adjuvantien immunisiert. Es konnte aber nur in einzelnen Tieren eine schwache Antikörperantwort nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass die Proteinimmunisierung mit Adjuvantien nicht ausreicht, um eine starke Antikörperantwort gegen das körpereigene Prion-Protein zu induzieren.

Um zu untersuchen, ob durch die bei der Proteinimmunisierung benutzten Adjuvantien IFA, CpG-1668 und CpG-1826 eine Th1- oder Th2-Immunantwort gegen das Prion-Protein verstärkt wurde, wurden die Seren der immunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse auf PrP-spezifische IgG1- (Th2) und IgG2a-Antikörper (Th1) untersucht. Die Immunisierung mit rek. mPrP und IFA führte wie beschrieben zu einer dominierenden IgG1-Antwort (Abbildung 6). Durch die Verwendung von CpG-1668 mit rek. mPrP kam es zu einer IgG1- und IgG2a-spezifischen

Diskussion

Immunantwort im Verhältnis 1:1 (Abbildung 6). Die Proteinimmunisierung mit CpG-1826 als Adjuvants induzierte eine IgG1/IgG2a-Antwort im Verhältnis 2:1 (Abbildung 17). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu veröffentlichten Arbeiten. In diesen Arbeiten wurde beschrieben, dass durch die Verwendung von CpG-ODN eine Th1-Immunantwort induziert wird, welche charakterisiert ist durch eine hohe IgG2a-Antikörperantwort und die Sekretion von Th1-Zytokinen wie IFN γ und TNF α (Klinman et al., 1996; Raz, 1996; Chu et al., 1997). Im Gegensatz dazu führt die Antigen-Immunsierung mit IFA zu einer Th2-Antwort, die durch eine IgG1-Antikörperantwort und die Sekretion von Th2-Zytokinen wie IL-4 charakterisiert ist (Forsthuber et al., 1996; Yip et al., 1999; Heeger et al., 2000). Dieser Widerspruch könnte sich durch die Abhängigkeit der Polarisierung der Immunantwort zwischen Th1 und Th2 von der Art des Antigens erklären (Wierenga et al., 1990; Grzych et al., 1991; Parronchi et al., 1991; Mahanty et al., 1993). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass z.B. Antigene von Parasiten zu einer Th2-Antwort führen. Die Ergebnisse der Antikörperantwort in dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass die Immunisierung mit rek. mPrP zu einer Induktion der Th2-Antwort führte, da eine dominierende PrP-spezifische IgG1-Antikörperantwort nachgewiesen werden konnte.

Für die Untersuchung der induzierten Antikörper nach Proteinimmunisierung auf ihre Effektivität PrP^C und/oder PrP^{Sc} zu binden, und so zu einer Reduktion von PrP^{Sc} zu führen, wurden die Seren der immunisierten Tiere auf PrP^{Sc}-exprimierenden N2a-Zellen getestet. Die PrP-Antikörper in den Seren der immunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse waren in der Lage den PrP^{Sc}-Gehalt in den Scrapie infizierten Zellen zu reduzieren. Diese Untersuchungsergebnisse entsprechen bereits publizierten Daten, in denen ebenfalls gezeigt werden konnte, dass die Behandlung von ScN2a-Zellen mit PrP-spezifischen Antikörpern zu einer Reduktion von PrP^{Sc} führte (Enari et al., 2001; Beringue et al., 2004; Feraudet et al., 2004; Kim et al., 2004; Miyamoto et al., 2005). Die Autoantikörper in den Seren der immunisierten C57BL/6-Mäuse waren nicht in der Lage den PrP^{Sc}-Gehalt in den Scrapie infizierten Zellen zu reduzieren. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von der Arbeit von Gilch et al. (2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass anti-PrP Autoantikörper, die durch die Immunisierung mit PrP-Dimeren in Wildtypmäusen (C57BL/6-Mäusen) induziert wurden, in der Lage sind den PrP^{Sc}-Gehalt in Zellkultur deutlich zu reduzieren. Das könnte bedeuten, dass die

Diskussion

Antikörper, die durch die Proteinimmunisierung in Wildtyp-Mäusen induziert wurden, zu schwach sind, um an PrP zu binden und so den PrP^{Sc}-Gehalt zu reduzieren. Nachdem durch die Proteinimmunisierung eine humorale Immunantwort in *Prnp*^{0/0}-Mäusen nachgewiesen werden konnte, wurde die zelluläre Immunantwort untersucht. Die Untersuchung zeigte, dass durch die Proteinimmunisierung mit CpG-ODN in *Prnp*^{0/0}-Mäusen eine starke spezifische Proliferation der Milzzellen nach *in vitro* Stimulation mit rek. mPrP stattfand. Diese zelluläre Immunantwort war stärker als die, die nach Proteinimmunisierung mit IFA erreicht wurde (Abbildung 14 und Abbildung 21). Die Proliferation der Milzzellen der immunisierten *Prnp*^{0/0}-Mäuse ist durch geringe Stimulationsindexe nach *in vitro* Stimulation mit Mitogen oder rek. mPrP gekennzeichnet. Diese Ergebnisse bestätigen die Aussage, dass PrP^C eine funktionelle Rolle in der T-Zell-Aktivierung spielt (Mabbott et al., 1997). Es konnte in der Arbeit von Mabbott et al. gezeigt werden, dass T-Zellen von *Prnp*^{0/0}-Mäusen nach Mitogen-Stimulation eine geringere T-Zell-Aktivierung aufwiesen als Wildtypiere. Desweiteren wurde nachgewiesen, dass anti-PrP Antikörper die T-Zell-Proliferation nach Mitogen-Stimulation reduzieren (Cashman et al., 1990; Bainbridge und Walker et al., 2003). Die Untersuchung der Zytokinantwort zeigte, dass die Proteinimmunisierung mit CpG-ODN zu einer Induktion von Zytokinen der Th1-Antwort wie IFN γ und TNF α nach spezifischer Stimulation der Milzzellen *in vitro* führte (Abbildung 15). Diese Ergebnisse konnten durch die intrazelluläre Zytokinfärbung, bei der eine CD3/CD28 Stimulation der Milzzellen durchgeführt wurde, bestätigt werden (Abbildung 12 und Abbildung 19). Durch die CD3/CD28 Behandlung werden vorher *in vivo* aktivierte T-Zellen *in vitro* restimuliert.

Die Untersuchungsergebnisse der humoralen Immunantwort zeigten eine hohe IgG1-Antwort. Antikörper vom Isotyp IgG1 werden in der Literatur mit einer Th2-Antwort in Verbindung gebracht. Dies widerspricht den Daten der Zytokinantwort, da nach Proteinimmunisierung nur Zytokine der Th1-Antwort (TNF α und IFN γ) nachgewiesen werden konnten. In einigen Arbeiten konnte eine Verbindung zwischen den IgG-Isotypen und der Th-Antwort gezeigt werden. Die Antikörperantwort kann allerdings nur als Hinweis dienen, da sie keine Th-Zelldifferenzierung induziert. Bei der Proteinimmunisierung in der IFA als Adjuvants genutzt wurde, wurde keine Zytokinantwort induziert, die sich von den Kontrolltieren unterschied (Abbildung 12 und Abbildung 13). Diese Daten zeigen,

dass durch die Immunisierung mit rek. mPrP und CpG-ODN sowohl eine starke humorale als auch zelluläre Immunantwort gegen das PrP induziert werden kann, wohingegen bei Verwendung von IFA als Adjuvants die zelluläre Antwort schwach ist. Durch die Proteinimmunisierung war es also möglich eine zelluläre und humorale Immunantwort gegen das Prion-Protein in *Prnp*^{0/0}-Mäuse zu induzieren, allerdings konnte die immunologische Toleranz in Wildtypmäusen auf diesem Weg nicht gebrochen werden.

4.2 DNA-Immunisierung und Immunantwort

Die Immunisierung mit Antigen-exprimierenden Plasmiden ist eine effektive Methode um Antikörper (Ak), T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) und zytotoxische T-Zellen (CTL) zu induzieren. Diese Form der Vakzinierung konnte schon in vielen Modellen erfolgreich getestet werden, z.B. gegen Herpes-Viren, Hepatitis B und Influenzaviren (Cox et al., 1993; Robinson et al., 1993; Manickan et al., 1995; Michel et al., 1995). Durch die DNA-Immunisierung erfolgt eine endogene Synthese des Proteins, die eine Präsentation von fremdem Antigen durch Moleküle der MHC-Klasse-I erlaubt. Desweiteren wird durch die Aufnahme von löslichem Protein durch spezialisierte APCs, die Präsentation des Antigens über den MHC-Klasse-II-Weg gewährleistet.

Für diese Arbeit wurde der pCG-Vektor genutzt, der über einen CMV-Promotor verfügt. Dieser Promotor ist bekannt für seine starke Expressionsinduktion von Antigenen in vielen verschiedenen Zelltypen (Foecking und Hofstetter, 1986). Die Applikation der DNA erfolgte intradermal (i.d.) und subkutan (s.c.), da in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass durch diesen Weg der DNA-Gabe eine starke zelluläre und humorale Immunantwort gegen ein Transgen induziert werden kann (Eisenbraun et al., 1993; Abbas et al., 1994; Raz et al., 1994; Hengge et al., 1995).

Desweiteren wurde ein Fusionskonstrukt hergestellt, das neben dem Prion-Protein ein T-Helfer-Epitop des Tetanus-Toxins (P30) besitzt. Dieses Th-Epitop wurde in anderen Arbeiten erfolgreich eingesetzt, um eine Immunantwort gegen körpereigene Antigene/Proteine zu induzieren (Hertz et al., 2001; Steinaa et al., 2005). Durch das Einführen des Th-Epitops P30 sollte die Immunogenität des Prion-Proteins verstärkt und die immunologische Toleranz gebrochen werden.

Diskussion

Durch die DNA-Immunisierung konnte eine humorale Immunantwort in *Prnp*^{0/0}-Mäusen induziert werden. Die induzierten Antikörper gegen das PrP waren in der Lage sowohl die zelluläre als auch die pathogene Form des Prion-Proteins zu binden. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse aus früheren Arbeiten, in denen durch eine DNA-Immunisierung in *Prnp*^{0/0}-Mäusen Antikörper gegen bestimmte Epitope des Prion-Proteins induziert werden konnten (Krasemann et al., 1996, 1999; Gregoire et al., 2005). Die T-Zellproliferation in *Prnp*^{0/0}-Mäusen war nach DNA-Immunisierung schwächer als die, die durch die Proteinimmunisierung erzielt wurde. Desweiteren ergaben die Ergebnisse der intrazellulären Zytokinfärbung, dass die Mäuse eine zelluläre Immunantwort auf den Vektor ausgebildet haben, da es zwar zu einer erhöhten intrazellulären Zytokinausschüttung kam, diese sich jedoch nicht zwischen den verwendeten Expressionskonstrukten bzw. dem leeren Vektor unterschied. Eine weitere Erklärung für die hohe intrazelluläre Zytokinantwort könnte eine *in vivo* abgelaufene Infektion der Tiere sein. Diese könnte auf einen möglicherweise erhöhten Keimstatus in den Tierräumen zurückzuführen sein. Die Untersuchung der zellulären Immunantwort der Wildtyptiere zeigte eine signifikant erhöhte Zytokinexpression in den CD8⁺-Zellen von den mit dem pCG-PrP-Vektor immunisierten C57BL/6-Mäuse nach CD3/CD28 Stimulation. Es konnte allerdings keine Proliferation nach spezifischer Stimulation mit rek. mPrP bei diesen Mäusen festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Tiere z. B. eine Infektion hatten oder auf den Vektor reagierten, und so durch die CD3/CD28 Stimulation *in vivo* induzierte nicht PrP spezifische T-Zellen aktiviert wurden. Desweiteren konnte in den Wildtypmäusen auch durch das Einfügen des T-Helfer-Epitopes P30 keine Induktion von spezifischen Autoantikörpern oder eine zelluläre Immunantwort gegen das Prion-Protein induziert werden. Das Einfügen des Th-Epitops reichte in diesem Fall nicht aus, um die immunologische Toleranz gegen das Prion-Protein zu brechen. Mögliche Gründe für das Fehlschlagen des Toleranzbruches werden in einem späteren Teil der Diskussion aufgeführt. Für eine effektive Immunisierung gegen TSEs ist es wichtig in Wildtypmäusen eine zelluläre und humorale Immunantwort gegen das körpereigene PrP zu induzieren, ohne dabei eine Autoimmunerkrankung zu erzeugen. Deshalb wäre es wichtig zu untersuchen, in Anlehnung an Studien in Tumormodellen, ob die Vakzinierung mit Fusionskonstrukten aus dem Antigen und einem Zytokin, das als Immunmodulator

wirken soll, in der Lage ist, die immunologische Toleranz zu brechen. Mögliche Zytokine, die für den Einsatz bei Fusionskonstrukten gegen das Prion-Protein in Frage kommen würden, wären IL-12 (Induktion von CTLs), IL-4 (Induktion einer Th2-Antwort) oder GM-CSF (Stimulation der APCs) (Dranhoff et al., 1993; Tao et al., 1993; Chen et al., 1994; Kim et al., 1998).

4.3 Kombination von DNA und Proteinimmunisierung zur Verstärkung der PrP-spezifischen Immunantwort

Durch eine Kombination von DNA-Immunsierung mit Proteinimmunisierung sollte untersucht werden, ob eine Verstärkung der humoralen und zellulären Immunantwort in *Prnp*^{0/0}-Mäusen oder der Toleranzbruch in Wildtypmäusen induziert werden kann. Durch diese Kombination sollte die durch DNA-Immunsierung induzierte Immunantwort durch die anschließende Proteinimmunisierung verstärkt werden, dies konnte für einige Modelle wie HIV-1, Hepatitis B und C und Tuberkulose gezeigt werden (Letvin et al., 1997; Song et al., 2000; Tanghe et al., 2001; Vordermeier et al., 2003; Xiao-Wen et al., 2005). In der Arbeit von Letvin et al. (1997) konnte sogar gezeigt werden, dass Affen nach kombinierter DNA- und Proteinimmunisierung vor einer Infektion mit einem replikationskompetenten chimären Retrovirus (SHIV= Chimere aus "Human immunodeficiency Virus" (HIV) und "Simian immunodeficiency virus" (SIV)) geschützt sind. Durch die Kombinationsimmunisierung mit PrP-exprimierenden Vektoren gefolgt von einer Proteinimmunisierung mit rek. mPrP und CpG-1668 als Adjuvants konnte in *Prnp*^{0/0}-Mäusen eine Erhöhung der humoralen Immunantwort im Vergleich zu den Mäusen, die nur mit DNA immunisiert wurden, erreicht werden (Abbildung 28 und Abbildung 40). Es konnte allerdings keine Erhöhung der zellulären Immunantwort durch die Kombination der beiden Impfstoffe im Vergleich zu den Mäusen, die nur mit DNA immunisiert wurden, festgestellt werden. Desweiteren konnten auch in den Wildtyptieren keine Autoantikörper gegen das Prion-Protein (Abbildung 40) und keine spezifische zelluläre Immunantwort gezeigt werden (Abbildung 44).

Nach Inokulation der immunisierten Wildtypmäuse mit dem Scrapie-Stamm RML wurde keine Verlängerung der Inkubationszeit im Vergleich zu nicht immunisierten Mäusen festgestellt. Die Immunisierung induzierte also keinen Schutz vor dem

Diskussion

Ausbruch der Prionenerkrankung. Es konnten nach Inokulation die typischen neuropathologischen Veränderungen mit Mikrovakuolen und reaktiver Astrozytose wie bei nicht-immunisierten Kontrolltieren festgestellt werden (Abbildung 50). Da bei der prophylaktischen Gabe von CpG-ODN in hohen Dosen ein Schutz vor Scrapie induziert wurde (Sethi et al., 2002), der allerdings mit morphologischen Veränderungen in der Milz (Zerstörung des follikulärdendritischen Netzwerkes) einherging (Heikenwalder et al., 2004), wurden die Milzen der immunisierten und inokulierten Wildtypmäuse untersucht. Es konnte keine Veränderungen im Vergleich zu nicht immunisierten Wildtypmäusen festgestellt werden (Abbildung 50). Die starken morphologischen Veränderungen, die in der Publikation von Heikenwalder et al. (2004) beschrieben wurden, sind auf die hohe Dosis von CpG-ODN in dieser Studie zurückzuführen.

Da die Kombination von DNA- und Proteinimmunisierung in dieser Arbeit nicht zu einer Induktion von Autoantikörpern und zu keiner zellulären Immunantwort gegen das Prion-Protein führte, müssen andere Methoden gefunden werden, durch die die immunologische Toleranz gegen das Prion-Protein gebrochen werden kann. Eine der Möglichkeiten wäre die Beladung von Antigen-präsentierenden-Zellen (APCs, z. B. Dendritische Zellen) mit Prion-Protein oder Peptiden des PrP, da diese Form der Vakzinierung schon im Tumormodell erfolgreich getestet werden konnte (Hsu et al., 1996). Da es sich bei Tumoren um körpereigene Zellen handelt, die durch maligne Transformation nicht mehr den normalen Wachstumskontrollen unterliegen, aber die meisten Merkmale der elterlichen Zelle besitzen, kann gegen diese häufig keine Immunantwort induziert werden (immunologische Toleranz). Aus diesem Grund sind Strategien, die im Tumormodell erfolgreich getestet wurden ein möglicher Ansatzpunkt für die Entwicklung von Methoden, um die immunologische Toleranz gegen das Prion-Protein zu brechen. Eine weitere Form der Tumorthherapie ist die Tumoringpfung mit Hitzeschockproteinen (Tytell und Hooper, 2001; Ren et al., 2004). Es gibt einige Hinweise auf Rezeptoren an der Oberfläche von APCs, die in der Lage sind das Hitzeschockprotein zusammen mit einem beliebigen Peptid aufzunehmen. Dieses Begleitpeptid gelangt so in den Antigenprozessierungsweg und kann über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden (Binder et al., 2001; Srivastava, 2002). Wie in der Arbeit von Koller et al. (2002) gezeigt werden konnte, ist der Einsatz von Hitzeschockproteinen als Adjuvants, zur Verstärkung der Immunogenität des

Diskussion

Prion-Proteins, ein viel versprechender Ansatz in der Therapie von TSEs, da eine Induktion von Autoantikörpern induziert werden konnte. Diese Arbeit zeigt, dass die Adaption von Tumorimpfungen auf das Prion-Modell ein möglicher Weg für den Toleranzbruch sein könnte.

Desweiteren könnte die Verwendung von rekombinanten Viren (z.B. Vaccinia, Adenoviren) im Prion-Modell getestet werden, da es durch die Vakzinierung mit diesen Viren zu einer höheren Antigen-Expression im Muskelgewebe und in dendritischen Zellen im Vergleich zur Immunisierung mit „nackter“ DNA kommt (Ranieri et al., 1999). Die Adeno-Vakzinierung konnte bereits im Tumormodell erfolgreich getestet werden (Armstrong et al., 2002). Rekombinante Adenoviren sind besonders effektive Vektoren, da sie in der Lage sind sowohl eine zelluläre als auch humorale Immunantwort gegen das Gen für das sie kodieren zu induzieren (Juillard et al., 1995; Zhai et al., 1996; Tuting et al., 1997; Perricone et al., 2000).

Es gibt viele Studien, die gezeigt haben, dass eine Immunisierung gegen ein körpereigenes Protein erfolgreich sein kann, gegen das Prion-Protein scheint das aber besonders schwer zu sein. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass das PrP ubiquitär exprimiert wird und somit das Immunsystem besonders effizient Toleranz induziert. Ein weiterer Grund könnte die Rolle von PrP bei der Aktivierung von T-Zellen sein, da schon in früheren Arbeiten gezeigt wurde, dass das Vorhandensein von anti-PrP-Antikörpern die T-Zell-Aktivierung reduziert. Ein wichtiger Punkt ist also die Erforschung der Funktion des Prion-Proteins im Immunsystem, um so Ansätze für eine mögliche Intervention zu finden. Die Übertragung dieser verschiedenen Ansätze auf das Prionmodell sollte das Ziel für die Entwicklung einer Therapie oder Prophylaxe für die Zukunft sein.

5 Literaturverzeichnis

- Anggard, E. (1994).** "Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine." Lancet **343**(8907): 1199-206.
- Armstrong, A. C., S. Dermime, et al. (2002).** "Immunization with a recombinant adenovirus encoding a lymphoma idiotype: induction of tumor-protective immunity and identification of an idiotype-specific T cell epitope." J Immunol **168**(8): 3983-91.
- Babiuk, L. A., P. J. Lewis, et al. (1995).** "DNA immunization with bovine herpesvirus-1 genes." Ann N Y Acad Sci **772**: 47-63.
- Bainbridge, J. und B. Walker (2003).** "Cell mediated immune responses against human prion protein." Clin Exp Immunol **133**(3): 310-7.
- Barret, A., F. Tagliavini, et al. (2003).** "Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases." J Virol **77**(15): 8462-9.
- Bellinger-Kawahara, C., J. E. Cleaver, et al. (1987a).** "Purified scrapie prions resist inactivation by UV irradiation." J Virol **61**(1): 159-66.
- Bellinger-Kawahara, C., T. O. Diener, et al. (1987b).** "Purified scrapie prions resist inactivation by procedures that hydrolyze, modify, or shear nucleic acids." Virology **160**(1): 271-4.
- Bendigs, S., U. Salzer, et al. (1999).** "CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells." Eur J Immunol **29**(4): 1209-18.
- Beringue, V., D. Vilette, et al. (2004).** "PrPSc binding antibodies are potent inhibitors of prion replication in cell lines." J Biol Chem **279**(38): 39671-6.
- Binder, R. J., N. E. Blachere, et al. (2001).** "Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules." J Biol Chem **276**(20): 17163-71.
- Bliss, J., V. Van Cleave, et al. (1996).** "IL-12, as an adjuvant, promotes a T helper 1 cell, but does not suppress a T helper 2 cell recall response." J Immunol **156**(3): 887-94.
- Bomford, R. (1998).** "Will adjuvants be needed for vaccines of the future?" Dev Biol Stand **92**: 13-7.

- Brazolot Millan, C. L., R. Weeratna, et al. (1998).** "CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15553-8.
- Broderson, J. R. (1989).** "A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant." Lab Anim Sci **39**(5): 400-5.
- Brown, P., L. G. Goldfarb, et al. (1991).** "Clinical and molecular genetic study of a large German kindred with Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome." Neurology **41**(3): 375-9.
- Brown, D. R. et al. (1997).** "The cellular prion protein binds copper *in vivo*." Nature **390**: 684-7
- Brown, D. R., B. S. Wong, et al. (1999a).** "Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase." Biochem J **344 Pt 1**: 1-5.
- Brown, K. L., K. Stewart, et al. (1999b).** "Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells." Nat Med **5**(11): 1308-12.
- Bruce, M. E., R. G. Will, et al. (1997).** "Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent." Nature **389**(6650): 498-501.
- Bueler, H., M. Fischer, et al. (1992).** "Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein." Nature **356**(6370): 577-82.
- Bueler, H., A. Aguzzi, et al. (1993).** "Mice devoid of PrP are resistant to scrapie." Cell **73**(7): 1339-47.
- Burger, D. et al. (1965).** "Encephalopathy of mink – 2. Experimental and natural transmission." J. Infect. Dis. **115**: 393-399
- Cashman, N. R., R. Loertscher, et al. (1990).** "Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation." Cell **61**(1): 185-92.
- Cardoso, A. I., N. Sixt, et al. (1998).** "Measles virus DNA vaccination: antibody isotype is determined by the method of immunization and by the nature of both the antigen and the coimmunized antigen." J Virol **72**(3): 2516-8.
- Chen, T. T., M. H. Tao, et al. (1994).** "Idiotypic-cytokine fusion proteins as cancer vaccines. Relative efficacy of IL-2, IL-4, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." J Immunol **153**(10): 4775-87.
- Chu, R. S., O. S. Targoni, et al. (1997).** "CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity." J Exp Med **186**(10): 1623-31.

- Chu, R. S., D. Askew, et al. (2000).** "CpG DNA switches on Th1 immunity and modulates antigen-presenting cell function." Curr Top Microbiol Immunol **247**: 199-210.
- Chu, Y., M. Xia, et al. (2005).** "Th2-dominated antitumor immunity induced by DNA immunization with the genes coding for a basal core peptide PDTRP and GM-CSF." Cancer Gene Ther.
- Cohen, F. E. und S. B. Prusiner (1998).** "Pathologic conformations of prion proteins." Annu Rev Biochem **67**: 793-819.
- Collinge, J., K. C. Sidle, et al. (1996).** "Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD." Nature **383**(6602): 685-90.
- Comoy, E. E., A. Capron, et al. (1997).** "*In vivo* induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens." Int Immunol **9**(4): 523-31.
- Cowdery, J. S., J. H. Chace, et al. (1996).** "Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma *in vivo* and increases the toxicity of lipopolysaccharides." J Immunol **156**(12): 4570-5.
- Creutzfeldt, H. G. (1920).** "Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems." Z. Ges. Neurol. Psychiatr. **57**: 1-18
- DeArmond, S. J. und S. B. Prusiner (2003).** "Perspectives on prion biology, prion disease pathogenesis, and pharmacologic approaches to treatment." Clin Lab Med **23**(1): 1-41.
- Dimitz, L. (1913).** "Bericht des Vereins für Psychiatrie und Neurologie in Wien. Vereinsjahr 1912/13, Sitzung vom 11. Juni 1912." Jahrb. Psychiatr. Neurol. **34**: 384
- Diringer, H., H. R. Braig, et al. (1988).** "Scrapie: a virus-induced amyloidosis of the brain." Ciba Found Symp **135**: 135-45.
- Dranoff, G., E. Jaffee, et al. (1993).** "Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3539-43.
- Edenhofer, F., R. Rieger, et al. (1996).** "Prion protein PrP^C interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family." J Virol **70**(7): 4724-8.
- Eisenbraun, M. D., D. H. Fuller, et al. (1993).** "Examination of parameters affecting the elicitation of humoral immune responses by particle bombardment-mediated genetic immunization." DNA Cell Biol **12**(9): 791-7.

- Enari, M., E. Flechsig, et al. (2001).** "Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9295-9.
- Fensterle, J., L. Grode, et al. (1999).** "Effective DNA vaccination against listeriosis by prime/boost inoculation with the gene gun." J Immunol **163**(8): 4510-8.
- Feraudet, C., N. Morel, et al. (2005).** "Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrPSc replication in infected cells." J Biol Chem **280**(12): 11247-58.
- Finkelman, F. D., J. Holmes, et al. (1990).** "Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection." Annu Rev Immunol **8**: 303-33.
- Foecking, M. K. and H. Hofstetter (1986).** "Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors." Gene **45**(1): 101-5.
- Forsthuber, T., H. C. Yip, et al. (1996).** "Induction of TH1 and TH2 immunity in neonatal mice." Science **271**(5256): 1728-30.
- Freund, J. (1956).** "The mode of action of immunologic adjuvants." Bibl Tuberc(10): 130-48.
- Gajdusek, D. C., C. J. Gibbs, Jr., et al. (1977).** "Precautions in medical care of, and in handling materials from, patients with transmissible virus dementia (Creutzfeldt-Jakob disease)." N Engl J Med **297**(23): 1253-8.
- Gerstmann, J. (1928).** "Über ein noch nicht beschriebenes Reflexphänomen bei einer Erkrankung des zerebellären Systems." Wien. Medizin. Wochenschr. **78**: 906-908
- Gerstmann, J., et al. (1936).** "Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems; zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns." Z. Ges. Neurol. Psychiat. **154**: 736-762
- Gilch, S., F. Wopfner, et al. (2003).** "Polyclonal anti-PrP auto-antibodies induced with dimeric PrP interfere efficiently with PrPSc propagation in prion-infected cells." J Biol Chem **278**(20): 18524-31.
- Gregoire, S., A. S. Bergot, et al. (2005).** "The murine B cell repertoire is severely selected against endogenous cellular prion protein." J Immunol **175**(10): 6443-9.
- Griffith, J. S. (1967).** "Self-replication and scrapie." Nature **215**(105): 1043-4.

- Grzych, J. M., E. Pearce, et al. (1991).** "Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni." J Immunol **146**(4): 1322-7.
- Gupta, R. K., E. H. Relyveld, et al. (1993).** "Adjuvants--a balance between toxicity and adjuvanticity." Vaccine **11**(3): 293-306.
- Gurunathan, S., D. M. Klinman, et al. (2000).** "DNA vaccines: immunology, application, and optimization*." Annu Rev Immunol **18**: 927-74.
- Hartsough, G. R. et al. (1965).** "Encephalopathy of mink - 1. Epizootiologic and clinical observations." J. Infect. Dis. **115**: 387-392
- Hartsough, G. R., Marsh, R. F., R. A. Bessen, et al. (1991).** "Epidemiological and experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy." J Gen Virol **72 (Pt 3)**: 589-94.
- Heeger, P. S., T. Forsthuber, et al. (2000).** "Revisiting tolerance induced by autoantigen in incomplete Freund's adjuvant." J Immunol **164**(11): 5771-81.
- Heikenwalder, M., M. Polymenidou, et al. (2004).** "Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration." Nat Med **10**(2): 187-92.
- Hengge, U. R., E. F. Chan, et al. (1995).** "Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA." Nat Genet **10**(2): 161-6.
- Heppner, F. L., I. Arrighi, et al. (2001).** "Immunity against prions?" Trends Mol Med **7**(11): 477-9.
- Herms, J. W., A. Madlung, et al. (1997).** "Increase of intracellular free Ca²⁺ in microglia activated by prion protein fragment." Glia **21**(2): 253-7.
- Hertz, M., S. Mahalingam, et al. (2001).** "Active vaccination against IL-5 bypasses immunological tolerance and ameliorates experimental asthma." J Immunol **167**(7): 3792-9.
- Hill, A. F., M. Desbruslais, et al. (1997).** "The same prion strain causes vCJD and BSE." Nature **389**(6650): 448-50, 526.
- Hill, A. F., R. J. Butterworth, et al. (1999).** "Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples." Lancet **353**(9148): 183-9.

- Hilton, D. A., E. Fathers, et al. (1998).** "Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease." Lancet **352**(9129): 703-4.
- Howland, K. C., L. J. Ausubel, et al. (2000).** "The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance." J Immunol **164**(9): 4465-70.
- Hsu, F. J., C. Benike, et al. (1996).** "Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells." Nat Med **2**(1): 52-8.
- Hunter, N., J. Foster, et al. (2002).** "Transmission of prion diseases by blood transfusion." J Gen Virol **83**(Pt 11): 2897-905.
- Hutter, G., F. L. Heppner, et al. (2003).** "No superoxide dismutase activity of cellular prion protein *in vivo*." Biol Chem **384**(9): 1279-85.
- Hwang, E. S., K. B. Kwon, et al. (1999).** "Induction of neutralizing antibody against human cytomegalovirus (HCMV) with DNA-mediated immunization of HCMV glycoprotein B in mice." Microbiol Immunol **43**(3): 307-10.
- Ingram, D. K. (2001).** "Vaccine development for Alzheimer's disease: a shot of good news." Trends Neurosci **24**(6): 305-7.
- Ironside, J. W. (1998).** "Prion diseases in man." J Pathol **186**(3): 227-34.
- Jakob, A. M. (1921).** "Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunden (Spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden)." Dtsch. Z. Nervenheilk. **70**: 132-46
- Jakob, T., P. S. Walker, et al. (1998).** "Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA." J Immunol **161**(6): 3042-9.
- Janeway, C. A. et al. (2002).** "Immunologie." Spektrum, Akad. Verl., **5. Auflage**
- Jarrett, J. T. und P. T. Lansbury, Jr. (1993).** "Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?" Cell **73**(6): 1055-8.
- Jeffrey, M. und G. A. Wells (1988).** "Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angasi*)." Vet Pathol **25**(5): 398-9.
- Juillard, V., P. Villefroy, et al. (1995).** "Long-term humoral and cellular immunity induced by a single immunization with replication-defective adenovirus recombinant vector." Eur J Immunol **25**(12): 3467-73.

- Kaneko, K., M. Vey, et al. (1997).** "COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(6): 2333-8.
- Kappler, J. W., N. Roehm, et al. (1987).** "T cell tolerance by clonal elimination in the thymus." Cell **49**(2): 273-80.
- Kelso, A. und N. M. Gough (1988).** "Coexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, gamma interferon, and interleukins 3 and 4 is random in murine alloreactive T-lymphocyte clones." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(23): 9189-93.
- Kim, C. J., J. Cormier, et al. (1998).** "Use of recombinant poxviruses to stimulate anti-melanoma T cell reactivity." Ann Surg Oncol **5**(1): 64-76.
- Kim, C. L., A. Karino, et al. (2004).** "Cell-surface retention of PrPC by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation." J Gen Virol **85**(Pt 11): 3473-82.
- Kingsbury, D. T., D. A. Smeltzer, et al. (1981).** "Evidence for normal cell-mediated immunity in scrapie-infected mice." Infect Immun **32**(3): 1176-80.
- Kisielow, P., H. Bluthmann, et al. (1988).** "Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4⁺8⁺ thymocytes." Nature **333**(6175): 742-6.
- Klein, M. A., R. Frigg, et al. (1997).** "A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie." Nature **390**(6661): 687-90.
- Klein, M. A., P. S. Kaeser, et al. (2001).** "Complement facilitates early prion pathogenesis." Nat Med **7**(4): 488-92.
- Klinman, D. M., A. K. Yi, et al. (1996).** "CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(7): 2879-83.
- Koller, M. F., T. Grau, et al. (2002).** "Induction of antibodies against murine full-length prion protein in wild-type mice." J Neuroimmunol **132**(1-2): 113-6.
- Krasemann, S., M. Groschup, et al. (1996).** "Induction of antibodies against human prion proteins (PrP) by DNA-mediated immunization of PrP⁰/0 mice." J Immunol Methods **199**(2): 109-18.
- Krasemann, S., T. Jurgens, et al. (1999).** "Generation of monoclonal antibodies against prion proteins with an unconventional nucleic acid-based immunization strategy." J Biotechnol **73**(2-3): 119-29.

- Krieg, A. M., A. K. Yi, et al. (1995).** "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." Nature **374**(6522): 546-9.
- Krieg, A. M. (2002).** "CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects." Annu Rev Immunol **20**: 709-60.
- Krummel, M. F. und J. P. Allison (1995).** "CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation." J Exp Med **182**(2): 459-65.
- Kurschner, C. und J. I. Morgan (1995).** "The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system." Brain Res Mol Brain Res **30**(1): 165-8.
- Kurschner, C. und J. I. Morgan (1996).** "Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein." Brain Res Mol Brain Res **37**(1-2): 249-58.
- Leclerc, C., E. Deriaud, et al. (1997).** "The preferential induction of a Th1 immune response by DNA-based immunization is mediated by the immunostimulatory effect of plasmid DNA." Cell Immunol **179**(2): 97-106.
- Leenaars, P. P., M. A. Koedam, et al. (1998).** "Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice." Lab Anim **32**(4): 387-406.
- Letvin, N. L., D. C. Montefiori, et al. (1997).** "Potent, protective anti-HIV immune responses generated by bimodal HIV envelope DNA plus protein vaccination." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9378-83.
- Llewelyn, C. A., P. E. Hewitt, et al. (2004).** "Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion." Lancet **363**(9407): 417-21.
- Lugaresi, E., R. Medori, et al. (1986).** "Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei." N Engl J Med **315**(16): 997-1003.
- Mabbott, N. A., K. L. Brown, et al. (1997).** "T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein." Immunology **92**(2): 161-5.
- Mabbott, N. A., F. Mackay, et al. (2000).** "Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie." Nat Med **6**(7): 719-20.
- Mabbott, N. A., M. E. Bruce, et al. (2001).** "Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie." Nat Med **7**(4): 485-7.

- Mahanty, S., C. L. King, et al. (1993).** "IL-4- and IL-5-secreting lymphocyte populations are preferentially stimulated by parasite-derived antigens in human tissue invasive nematode infections." J Immunol **151**(7): 3704-11.
- Manickan, E., R. J. Rouse, et al. (1995).** "Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4⁺ T lymphocytes." J Immunol **155**(1): 259-65.
- Manson, J. C., A. R. Clarke, et al. (1994).** "129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal." Mol Neurobiol **8**(2-3): 121-7.
- Manuelidis, L., T. Sklaviadis, et al. (1995).** "Viral particles are required for infection in neurodegenerative Creutzfeldt-Jakob disease." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 5124-8.
- Marx, J. L. (1979).** "The scrapie agent: is it a viroid?" Science **203**(4380): 532.
- McBride, P. A. und M. Beekes (1999).** "Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie." Neurosci Lett **265**(2): 135-8.
- McCluskie, M. J., Y. M. Wen, et al. (1998).** "Immunization against hepatitis B virus by mucosal administration of antigen-antibody complexes." Viral Immunol **11**(4): 245-52.
- McGowan, J. P. (1922).** "Scrapie in sheep." Scottish J. Agric. **5**: 365-375
- McKinley, M. P., D. C. Bolton, et al. (1983).** "A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion." Cell **35**(1): 57-62.
- Meyer, N., V. Rosenbaum, et al. (1991).** "Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids." J Gen Virol **72** (Pt 1): 37-49.
- Michel, M. L., H. L. Davis, et al. (1995).** "DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: aspects of the humoral response mimic hepatitis B viral infection in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(12): 5307-11.
- Montrasio, F., R. Frigg, et al. (2000).** "Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells." Science **288**(5469): 1257-9.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, et al. (1986).** "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol **136**(7): 2348-57.

- Mosmann, T. R. und R. L. Coffman (1989).** "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-73.
- Miyamoto, K., N. Nakamura, et al. (2005).** "Inhibition of prion propagation in scrapie-infected mouse neuroblastoma cell lines using mouse monoclonal antibodies against prion protein." Biochem Biophys Res Commun **335**(1): 197-204.
- Oesch, B., D. Westaway, et al. (1985).** "A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein." Cell **40**(4): 735-46.
- Oesch, B., D. B. Teplow, et al. (1990).** "Identification of cellular proteins binding to the scrapie prion protein." Biochemistry **29**(24): 5848-55.
- Ohashi, P. S. und A. L. DeFranco (2002).** "Making and breaking tolerance." Curr Opin Immunol **14**(6): 744-59.
- Oleszak, E. L., G. Murdoch, et al. (1988).** "Growth factor production by Creutzfeldt-Jakob disease cell lines." J Virol **62**(9): 3103-8.
- Parnes, J. R. (1989).** "Molecular biology and function of CD4 and CD8." Adv Immunol **44**: 265-311.
- Parronchi, P., D. Macchia, et al. (1991).** "Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4538-42.
- Paul, W. E. und R. A. Seder (1994).** "Lymphocyte responses and cytokines." Cell **76**(2): 241-51.
- Peden, A. H., M. W. Head, et al. (2004).** "Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient." Lancet **364**(9433): 527-9.
- Peretz, D., R. A. Williamson, et al. (2001).** "Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity." Nature **412**(6848): 739-43.
- Perricone, M. A., K. A. Claussen, et al. (2000).** "Immunogene therapy for murine melanoma using recombinant adenoviral vectors expressing melanoma-associated antigens." Mol Ther **1**(3): 275-84.
- Pertmer, T. M., T. R. Roberts, et al. (1996).** "Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery." J Virol **70**(9): 6119-25.

- Porter, D. D., H. G. Porter, et al. (1973).** "Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice." J Immunol **111**(5): 1407-10.
- Powrie, F. und R. L. Coffman (1993).** "Inhibition of cell-mediated immunity by IL4 and IL10." Res Immunol **144**(8): 639-43.
- Prasad, S. J., K. J. Farrand, et al. (2005).** "Dendritic cells loaded with stressed tumor cells elicit long-lasting protective tumor immunity in mice depleted of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells." J Immunol **174**(1): 90-8.
- Prusiner, S. B. (1982).** "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie." Science **216**(4542): 136-44.
- Prusiner, S. B. (1987).** "Prions causing degenerative neurological diseases." Annu Rev Med **38**: 381-98.
- Prusiner, S. B. (1989).** "Scrapie prions." Annu Rev Microbiol **43**: 345-74.
- Prusiner, S. B. (1990).** "Novel structure and genetics of prions causing neurodegeneration in humans and animals." Biologicals **18**(4): 247-62.
- Prusiner, S. B. (1991).** "Molecular biology of prion diseases." Science **252**(5012): 1515-22.
- Prusiner, S. B. (1993a).** "Genetic and infectious prion diseases." Arch Neurol **50**(11): 1129-53.
- Prusiner, S. B. (1993b).** "Transgenetics and cell biology of prion diseases: investigations of PrPSc synthesis and diversity." Br Med Bull **49**(4): 873-912.
- Prusiner, S. B. (1993c).** "Transgenic investigations of prion diseases of humans and animals." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **339**(1288): 239-54.
- Prusiner, S. B. (1998).** "Prions." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13363-83.
- Ranieri, E., W. Herr, et al. (1999).** "Dendritic cells transduced with an adenovirus vector encoding Epstein-Barr virus latent membrane protein 2B: a new modality for vaccination." J Virol **73**(12): 10416-25.
- Raz, E., D. A. Carson, et al. (1994).** "Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(20): 9519-23.
- Raz, E., H. Tighe, et al. (1996).** "Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 5141-5.

- Ren, W., R. Strube, et al. (2004).** "Potent tumor-specific immunity induced by an *in vivo* heat shock protein-suicide gene-based tumor vaccine." Cancer Res **64**(18): 6645-51.
- Rieger, R., F. Edenhofer, et al. (1997).** "The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells." Nat Med **3**(12): 1383-8.
- Riek, R., S. Hornemann, et al. (1996).** "NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321)." Nature **382**(6587): 180-2.
- Robinson, H. L., L. A. Hunt, et al. (1993).** "Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA." Vaccine **11**(9): 957-60.
- Robinson, H. L., S. Lu, et al. (1996).** "DNA vaccines." AIDS Res Hum Retroviruses **12**(5): 455-7.
- Safar, J., H. Wille, et al. (1998).** "Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations." Nat Med **4**(10): 1157-65.
- Seder, R. A., R. Gazzinelli, et al. (1993).** "Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(21): 10188-92.
- Sethi, S., G. Lipford, et al. (2002).** "Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity." Lancet **360**(9328): 229-30.
- Snapper, C. M. und W. E. Paul (1987).** "Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production." Science **236**(4804): 944-7.
- Song, M. K., S. W. Lee, et al. (2000).** "Enhancement of immunoglobulin G2a and cytotoxic T-lymphocyte responses by a booster immunization with recombinant hepatitis C virus E2 protein in E2 DNA-primed mice." J Virol **74**(6): 2920-5.
- Sprent, J., D. Lo, et al. (1988).** "T cell selection in the thymus." Immunol Rev **101**: 173-90.
- Srivastava, P. (2002).** "Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses." Annu Rev Immunol **20**: 395-425.

- Stahl, N., M. A. Baldwin, et al. (1990).** "Identification of glycoinositol phospholipid linked and truncated forms of the scrapie prion protein." Biochemistry **29**(38): 8879-84.
- Stahl, N., M. A. Baldwin, et al. (1993).** "Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing." Biochemistry **32**(8): 1991-2002.
- Stacey, K. J., M. J. Sweet, et al. (1996).** "Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA." J Immunol **157**(5): 2116-22.
- Steinaa, L., P. B. Rasmussen, et al. (2005).** "Linked foreign T-cell help activates self-reactive CTL and inhibits tumor growth." J Immunol **175**(1): 329-34.
- Stevens, T. L., A. Bossie, et al. (1988).** "Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells." Nature **334**(6179): 255-8.
- Swain, S. L., A. D. Weinberg, et al. (1990).** "CD4⁺ T cell subsets. Lymphokine secretion of memory cells and of effector cells that develop from precursors *in vitro*." J Immunol **144**(5): 1788-99.
- Tang, D. C., M. DeVit, et al. (1992).** "Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response." Nature **356**(6365): 152-4.
- Tanghe, A., S. D'Souza, et al. (2001).** "Improved immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85 by protein boosting." Infect Immun **69**(5): 3041-7.
- Tao, M. H. and R. Levy (1993).** "Idiotypic/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma." Nature **362**(6422): 755-8.
- Taraboulos, A., M. Scott, et al. (1995).** "Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform." J Cell Biol **129**(1): 121-32.
- Tobler, I., T. Deboer, et al. (1997).** "Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice." J Neurosci **17**(5): 1869-79.
- Toth, L. A., A. W. Dunlap, et al. (1989).** "An evaluation of distress following intraperitoneal immunization with Freund's adjuvant in mice." Lab Anim Sci **39**(2): 122-6.
- Tuting, T., A. B. DeLeo, et al. (1997).** "Genetically modified bone marrow-derived dendritic cells expressing tumor-associated viral or "self" antigens induce antitumor immunity *in vivo*." Eur J Immunol **27**(10): 2702-7.

- Tytell, M. und P. L. Hooper (2001).** "Heat shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies." Expert Opin Ther Targets **5**(2): 267-87.
- Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, et al. (1993).** "Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein." Science **259**(5102): 1745-9.
- Vey, M., S. Pilkuhn, et al. (1996).** "Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14945-9.
- Vordermeier, H. M., D. B. Lowrie, et al. (2003).** "Improved immunogenicity of DNA vaccination with mycobacterial HSP65 against bovine tuberculosis by protein boosting." Vet Microbiol **93**(4): 349-59.
- Warren, H. S., F. R. Vogel, et al. (1986).** "Current status of immunological adjuvants." Annu Rev Immunol **4**: 369-88.
- Weeratna, R. D., M. J. McCluskie, et al. (2000).** "CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants." Vaccine **18**(17): 1755-62.
- Weeratna, R. D., C. L. Brazolot Millan, et al. (2001).** "CpG ODN can re-direct the Th bias of established Th2 immune responses in adult and young mice." FEMS Immunol Med Microbiol **32**(1): 65-71.
- Weissmann, C., H. Bueler, et al. (1993).** "Role of the PrP gene in transmissible spongiform encephalopathies." Intervirology **35**(1-4): 164-75.
- Weissmann, C. und A. Aguzzi (1997).** "Bovine spongiform encephalopathy and early onset variant Creutzfeldt-Jakob disease." Curr Opin Neurobiol **7**(5): 695-700.
- Wells, G. A., A. C. Scott, et al. (1987).** "A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle." Vet Rec **121**(18): 419-20.
- White, A. R., P. Enever, et al. (2003).** "Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease." Nature **422**(6927): 80-3.
- Wiedemann, F., R. Link, et al. (1991).** "Histopathological studies on the local reactions induced by complete Freund's adjuvant (CFA), bacterial lipopolysaccharide (LPS), and synthetic lipopeptide (P3C) conjugates." J Pathol **164**(3): 265-71.

- Wierenga, E. A., M. Snoek, et al. (1990).** "Comparison of diversity and function of house dust mite-specific T lymphocyte clones from atopic and non-atopic donors." Eur J Immunol **20**(7): 1519-26.
- Will, R. G., J. W. Ironside, et al. (1996a).** "Creutzfeldt-Jakob disease." Lancet **347**(8993): 65-6.
- Will, R. G. (1996b).** "Incidence of Creutzfeldt-Jakob-Disease in the European Community. In: Gibbs, C. J. jr. (ed.). Bovine spongiform encephalopathy – BSE dilemma." Springer, New York, NY: pp364
- Williams, E. S. und S. Young (1980).** "Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy." J Wildl Dis **16**(1): 89-98.
- Williamson, R. A., D. Peretz, et al. (1996).** "Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(14): 7279-82.
- Wolff, J. A., R. W. Malone, et al. (1990).** "Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*." Science **247**(4949 Pt 1): 1465-8.
- Wyatt, J. M. et al. (1990).** "Spongiform encephalopathy in a cat." Vet. Rec. **126**: 513
- Xiao-wen, H., S. Shu-han, et al. (2005).** "Augmented humoral and cellular immune responses of a hepatitis B DNA vaccine encoding HBsAg by protein boosting." Vaccine **23**(14): 1649-56.
- Yip, H. C., A. Y. Karulin, et al. (1999).** "Adjuvant-guided type-1 and type-2 immunity: infectious/noninfectious dichotomy defines the class of response." J Immunol **162**(7): 3942-9.
- Zahn, R., A. Liu, et al. (2000).** "NMR solution structure of the human prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(1): 145-50.
- Zhai, Y., J. C. Yang, et al. (1996).** "Antigen-specific tumor vaccines. Development and characterization of recombinant adenoviruses encoding MART1 or gp100 for cancer therapy." J Immunol **156**(2): 700-10.
- Zigas, V. und D. C. Gajdusek (1957).** "Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea." Med J Aust **44**(21): 745-54.

6 Anhang

6.1 Zusammenfassung

Das Prion-Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von übertragbaren spongiformen Enzephalopathien. Studien aus den letzten Jahren haben gezeigt, dass die Entwicklung einer Therapie für Prionenerkrankungen eine Induktion von Autoantikörpern gegen das Prion-Protein voraussetzt. In dieser Arbeit wurden aktive Immunisierungsstrategien gegen das zelluläre Prion-Protein beschrieben und die zellulären und humoralen Immunantworten sowie deren Einfluss auf die Entstehung einer Prionenerkrankung analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Immunisierung mit rek. mPrP und Adjuvants eine Aktivierung und Proliferation von PrP-spezifischen T-Zellen in *Prnp*^{0/0}-Mäusen induziert wurde. Desweiteren konnten in PrP-defizienten Mäusen spezifische Antikörper gegen das Prion-Protein nachgewiesen werden, die in der Lage waren, die pathogene Form des PrPs (PrP^{Sc}) zu detektieren und den PrP^{Sc}-Gehalt in Zellkultur zu reduzieren. Durch die Immunisierung mit rek. mPrP und CpG-1826 konnten in CD4⁺-T-Zellen erhöhte Zytokinspiegel von TNF α und IFN γ induziert werden. Im Gegensatz dazu konnte keine T-Zell-Antwort und nur geringe Antikörperkonzentrationen nach Proteinimmunisierung in Wildtypmäusen nachgewiesen werden. Die induzierten Antikörper in Wildtypmäusen waren nicht in der Lage den PrP^{Sc}-Gehalt in Zellkultur zu reduzieren.

In einem zweiten Ansatz wurde die Immunisierung mit zwei unterschiedlichen PrP-exprimierenden DNA-Vektoren durchgeführt. Hierfür wurden der pCG-PrP-Vektor, der das Maus-PrP exprimiert, und der pCG-PrP-P30-Vektor, der zusätzlich zum PrP für das P30-Th-Epitop des Tetanustoxins kodiert, verwendet. Dieses P30-Epitop wurde schon in früheren Arbeiten genutzt, um die Toleranz gegen körpereigene Proteine zu brechen. Die Ergebnisse zeigten, dass durch die DNA-Immunisierung eine PrP-spezifische Antikörperantwort in *Prnp*^{0/0}-Mäusen induziert werden konnte. In Wildtypmäusen wurden allerdings nur geringe Antikörpertiter nachgewiesen. Die Antikörper aus den *Prnp*^{0/0}-Mäusen waren in der Lage PrP^{Sc} zu erkennen, und den PrP^{Sc}-Gehalt in Zellkultur zu reduzieren. Durch die DNA-Immunisierung wurde eine PrP-spezifische Aktivierung und Proliferation von T-Zellen in *Prnp*^{0/0}-Mäusen erreicht, die nach Immunisierung mit pCG-PrP-P30

stärker war als nach Immunisierung mit pCG-PrP. Nach DNA-Vakzinierung konnte in Wildtypmäusen eine unspezifische Erhöhung der Zytokinantwort mit erhöhten TNF α - und IFN γ -Spiegeln nachgewiesen werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde eine Kombination aus DNA- und Proteinimmunisierung durchgeführt, um die Toleranz gegen das Prion-Protein zu brechen. Die erhaltenen Ergebnisse waren vergleichbar mit denen, die nach DNA-Immunisierung allein erreicht wurden. Die Inokulation der immunisierten Wildtypmäuse mit einem Maus-adaptierten Scrapiestamm (RML) zeigte keinen Schutz dieser Tiere vor einer Prionenerkrankung. Alle Mäuse aus der immunisierten und nicht immunisierten Gruppe erkrankten im gleichen Zeitraum an Scrapie, zeigten PrP^{Sc} Akkumulation im Gehirn und in der Milz und für Prionenerkrankungen typische histopathologische Veränderungen.

Basierend auf diesen Ergebnissen sollten neue Immunisierungsstrategien entwickelt werden, um die Toleranz gegen das Prion-Protein zu brechen und einen Schutz vor Prionenerkrankungen zu induzieren.

6.2 Summary

The prion protein (PrP^C) plays a pivotal role in transmissible spongiform encephalopathies (TSE). Recent studies have shown that strategies aimed to elicit antibodies against PrP should be considered as a promising therapeutic approach for prion diseases. In this study active immunisation strategies against PrP^C were described, humoral and cellular immune responses as well as the influence of the onset of the prion disease were analyzed. Here we demonstrate that immunisation with recombinant murine prion-protein (mPrP) results in activation and proliferation of PrP-specific T cells and induction of PrP-specific antibodies in PrP-deficient mice (*Prnp*^{0/0}). These antibodies are able to detect and reduce PrP^{Sc} levels in cell culture. Immunisation with rek. mPrP and CpG-1826 results in increased levels of TNF α and IFN γ in *Prnp*^{0/0} mice. In contrast no T cell response and only low antibody titers against PrP were found in individual wild-type mice. The low level of antibodies in wildtype mice were not able to reduce the PrP^{Sc} level in cell culture. In a second approach, we investigated a new immunisation strategy against PrP^C with two vaccine DNA vectors (pCG-PrP and pCG-PrP-P30). The pCG-PrP vector system contains murine PrP sequence, whereas the pCG-PrP-P30 vector also

Anhang

contains an immune stimulatory peptide of the tetanus toxin, which has been shown to break tolerance against self proteins. Results indicate that this improved vaccine evokes a sustained antibody response in *Prnp*^{0/0} mice, but only low antibody titers were found in wild-type mice. The antibodies from *Prnp*^{0/0} mice were able to detect PrP^{Sc} and to reduce PrP^{Sc} levels in cell culture. DNA immunisation induced activation and proliferation of PrP-specific T cells in *Prnp*^{0/0}-mice which was even stronger after immunisation with pCG-PrP-P30 than after pCG-PrP treatment. DNA vaccination induced an unspecific T cell response with increased levels of IFN γ and TNF α in wild-type mice.

Furthermore we combined DNA and protein immunisation to break tolerance against PrP. The results obtained were similar then those after DNA vaccination alone. Inoculation of the immunised wildtype mice with mouse adapted scrapie prions showed that these animals were not protected against the development of the prion disease. All mice in the vaccinated and control groups succumbed to scrapie with similar incubation times, deposition of PrP^{Sc} in brain and spleen and typical histopathological changes in the brain.

Nevertheless based on these findings additional strategies of immunisation should be envisaged to develop immunotherapeutic approaches to break tolerance against PrP and to protect against the prion disease.

6.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	ELISA	enzyme-linked-
A. dest.	destiliertes Wasser		immunosorbent-assay
Ak	Antikörper	ER	endoplasmatisches
APC	Antigen-präsentierende		Retikulum
	Zelle	FACS	<i>fluorescence activated</i>
BGH	bovines		<i>cell sorter</i>
	Wachstumshormon	FCS	Fötales Kälberserum
bp	Basenpaare	FDC	follikulär dendritische
BSA	Rinderserumalbumin		Zellen
BSE	bovine spongiforme	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
	Enzephalopathien	g	Gramm
bzw.	beziehungsweise	GFAP	gliales saures
CBA	Cytokine-Bead-Array		Faserprotein
CD	Lymphozyten-	GM-CSF	Granulozyten-
	differenzierungsgruppe		Makrophagen-
CIAP	<i>calf intestine alkaline</i>		koloniestimulierender
	<i>phosphatase</i>		Faktor
CJD	Creutzfeldt-Jakob-	GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-
	Krankheit		Inositol
cm	Zentimeter	HBsAG	Oberflächenantigen des
CMV	Cytomegalievirus		Hepatitis B Virus
CpG	Cytosin-Guanosin-	HE	Hämalaun/Eosin
	Dinukleotide	HIV	Humanes
cpm	counts per minute		Immundefizienzvirus
CTL	zytotoxische T-Zelle	i.d.	intradermal
Cy	Cychrome	i.p.	intraperitoneal
ddNTP	Didesoxyribonukleotid-	IFA	inkomplettes Freundsches
	triphosphat		Adjuvants
DMSO	Dimethylsulfoxid	IFN	Interferon
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Ig	Immunglobulin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	IL	Interleukin
ECL	<i>Enhanced</i>	kDa	Kilo-Dalton
	<i>Chemiluminescence</i>	l	Liter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	LD ₅₀	lethale Dosis

Anhang

M	Molar	µg	mikrogramm
mA	Milliamper	µm	mikrometer
mg	Milligramm	PrP ^{Sc}	pathologische Form des Prion-Proteins
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex	rek. mPrP	rekombinantes Maus-Prion-Protein
Min.	Minute(n)		
ml	Milliliter	RML	Rocky-Mountain-Laboratory
mM	Millimolar		
N	Aminosäure	RNA	Ribonukleinsäure
NaPTA	Natrium-Phosphotungstate	s.c. ScN2a	subkutan PrP ^{Sc} tragende N2a Zellen
NK	natürliche Killerzelle	SDS	Natriumdodecylsulfat
OD	Optische Dichte	Sek.	Sekunde(n)
ODN	Oligodinukleotid(e)	SOD-1	Superoxiddismutase-1
ORF	offener Leserahmen	SSC	Seitwärts-Streulicht
PAGE	Polyacrylamid-gelelektrophorese	Std. TGF	Stunde(n) Tumor-Wachstumsfaktor
PCR	Polymerasekettenreaktion		
PE	Phycoerythrin	Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-konzentration	TNF TSE	Tumornekrosefaktor transmissible spongiforme Enzephalopathien
PK	Proteinase K	U	Enzymeinheit (Unit)
<i>Prnp</i> ^{0/0}	PrP-knock out Mäuse	upm	Umdrehungen per Minute
<i>Prnp</i> ^{+/+}	C57BL/6-Mäuse	UV	ultraviolett
PrP ^C	zelluläres Prion-Protein	V	Volt
µl	mikroliter	z. B.	zum Beispiel
µCi	mikrocurie		

6.4 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Transmissible Spongiforme Enzephalopathien beim Menschen und bei Tieren	2
Abbildung 1: Aufbau und Organisation des Prion-Protein-Gens in der Maus.....	4
Abbildung 2: Schematische Struktur des zellulären Prion-Proteins (PrP ^C).....	5
Abbildung 3: Modellvorstellungen für die Umfaltung von PrP ^C in PrP ^{Sc}	6
Abbildung 4: Immunisierungsschema für die Proteinimmunisierung	48
Abbildung 5: Anti-PrP ^C Antikörper in <i>Prnp</i> ^{0/0} - und C57BL/6-Mäusen nach Proteinimmunisierung.....	49
Abbildung 6: Anti-PrP ^C Immunglobulinsubtypen in <i>Prnp</i> ^{0/0} - Mäusen nach Proteinimmunisierung.....	50
Abbildung 7: FACS-Analyse der Seren von <i>Prnp</i> ^{0/0} -Mäusen nach Proteinimmunisierung auf N2a-Zellen.....	51
Abbildung 8: FACS-Analyse der Seren von Wildtyp-Mäusen nach Proteinimmunisierung auf N2a-Zellen.....	51
Abbildung 9: Westernblot-Analyse der Seren der proteinimmunisierten <i>Prnp</i> ^{0/0} -Mäuse	52
Abbildung 10: Western Blot der Zelllysate nach Behandlung der ScN2a mit Seren von <i>Prnp</i> ^{0/0} -Mäusen	53
Abbildung 11: Westernblot der Zelllysate von ScN2a nach Behandlung mit Seren von C57BL/6-Mäusen.....	54
Abbildung 12: Intrazelluläre Zytokinfärbung für TNF α und IFN γ in CD4 ⁺ -Zellen der <i>Prnp</i> ^{0/0} -Mäuse	55
Abbildung 13: Intrazelluläre Zytokinfärbung für TNF α und IFN γ in CD4 ⁺ -Zellen der C57BL/6-Mäuse.....	56
Abbildung 14: Proliferationstest nach Antigen-spezifischer Stimulation der Milzzellen von proteinimmunisierten <i>Prnp</i> ^{0/0} -Mäuse	57
Abbildung 15: Zytokine im Überstand nach <i>in vitro</i> Stimulation von Milzzellen proteinimmunisierter <i>Prnp</i> ^{0/0} - Mäuse.....	58
Abbildung 16: ELISA für Ig gesamt gegen das Prion-Protein in <i>Prnp</i> ^{0/0} - und C57BL/6-Mäuse nach Proteinimmunisierung mit CpG-1826.....	59
Abbildung 17: Antikörper-Subtypen IgG1 und IgG2a in <i>Prnp</i> ^{0/0} -Mäusen nach Proteinimmunisierung mit CpG-1826.....	60
Abbildung 18: FACS-Analyse von N2a-Zellen mit Seren von proteinimmunisierten Mäusen mit CpG-1826 als Adjuvants	61
Abbildung 19: Intrazelluläre Zytokinfärbung von Milzzellen der <i>Prnp</i> ^{0/0} -Mäuse nach Immunisierung mit rek. mPrP und CpG-1826.....	62
Abbildung 20: Intrazelluläre Zytokinfärbung von Milzzellen der C57BL/6-Mäuse nach Immunisierung mit rek. mPrP und CpG-1826.....	62
Abbildung 21: Proliferationstest mit Milzzellen der mit rek. mPrP und CpG-1826 immunisierten <i>Prnp</i> ^{0/0} -Mäuse	63
Abbildung 22: Herstellung des pCG-PrP-Vektors.....	65
Abbildung 23: Klonierung des pCG-PrP-P30-Vektors (1. Schritt).....	66
Abbildung 24: Klonierung des pCG-PrP-P30-Vektors (2. Schritt).....	67
Abbildung 25: Expressionskontrolle der DNA-Konstrukte mittels FACS-Analyse	68
Abbildung 26: Westernblot-Analyse der Konstrukte	69
Abbildung 27: Immunisierungsschema bei der DNA-Immunisierung.....	69
Abbildung 28: Anti-PrP ^C Antikörper in <i>Prnp</i> ^{0/0} - und C57BL/6-Mäusen nach DNA-Immunisierung	70
Abbildung 29: Anti-PrP ^C Immunglobulinsubtypen in <i>Prnp</i> ^{0/0} - Mäusen nach DNA-Immunisierung	71

Anhang

Abbildung 30: FACS-Analyse der Seren der DNA-immunisierten <i>Prnp^{0/0}</i> -Mäuse auf N2a-Zellen	72
Abbildung 31: FACS-Analyse der Seren der DNA-immunisierten C57BL/6-Mäuse auf N2a-Zellen	72
Abbildung 32: Westernblot-Analyse der DNA-immunisierten <i>Prnp^{0/0}</i> -Mäuse	73
Abbildung 33: Westernblot der Zellysate der ScN2a-Zellen nach Behandlung mit den Seren der DNA-immunisierten <i>Prnp^{0/0}</i> -Mäuse	74
Abbildung 34: Westernblot der Zellysate der ScN2a-Zellen nach Behandlung mit den Seren der DNA-immunisierten C57BL/6-Mäuse	75
Abbildung 35: Intrazelluläre Zytokinantwort in <i>Prnp^{0/0}</i> -Mäusen nach DNA-Immunsierung	76
Abbildung 36: Intrazelluläre Zytokinantwort in C57BL/6-Mäusen nach DNA-Immunsierung	77
Abbildung 37: Proliferationsassay der <i>Prnp^{0/0}</i> -Tiere nach DNA-Immunsierung	78
Abbildung 38: Zytokine im Überstand von <i>in vitro</i> stimulierten Milzzellen DNA-immunisierten <i>Prnp^{0/0}</i> -Mäuse	79
Abbildung 39: Immunisierungsschema DNA-Impfstoff + Protein in <i>Prnp^{0/0}</i> - und C57BL/6-Mäusen	80
Abbildung 40: Anti-PrP ^C Antikörper in <i>Prnp^{0/0}</i> - und C57BL/6-Mäusen nach kombinierter DNA- und Proteinimmunisierung	81
Abbildung 41: Anti-PrP ^C Immunglobulinsubtypen in <i>Prnp^{0/0}</i> -Mäusen nach Immunisierung mit DNA + Protein in <i>Prnp^{0/0}</i> -Mäuse	82
Abbildung 42: FACS-Analyse der Seren der <i>Prnp^{0/0}</i> -Mäuse nach Kombinationsimmunisierung mit DNA und Protein	83
Abbildung 43: Intrazelluläre Zytokinfärbung nach DNA- und Proteinimmunisierung in Milzzellen von <i>Prnp^{0/0}</i> -Mäusen	84
Abbildung 44: Intrazelluläre Zytokinfärbung nach Immunisierung mit DNA + Protein in C57BL/6-Mäusen	85
Abbildung 45: Anti-PrP ^C Antikörper in C57BL/6-Mäusen nach kombinierter DNA- und Proteinimmunisierung und Inokulation mit RML	86
Abbildung 46: FACS-Analyse der Seren der terminal erkrankten C57BL/6-Mäuse	87
Abbildung 47: Überlebenskurve der inokulierten C57BL/6-Mäuse	88
Abbildung 48: Westernblot der Hirnhomogenate	89
Abbildung 49: Westernblot der Milzhomogenate	89
Abbildung 50: Histologie von Gehirn- und Milzschnitten	90

6.5 Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich diese Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Zudem erkläre ich, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Cindy Nitschke

6.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Cindy Nitschke
Geburtsdatum, -ort 01.04.1978, Ueckermünde
Familienstand ledig

Schulabschluss

1996 Abitur am Gymnasium in Eggesin

Studium

1996 - 2001 Humanbiologie Diplom, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald (Abschlussnote: gut)
2000 - 2001 Diplomarbeit an der Med. Fakultät/ Abteilung für Versuchstierkunde der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald (Prof. Dr. Dr. I. Klötting) „Auszucht und genetische Heterozygotie“

Promotion

ab 11/01 Promotionsstudium an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg, Institut für Virologie und Immunbiologie (Prof. Dr. Ulf Dittmer)
Thema: „Die Rolle der humoralen und zellulären Immunantwort bei Prioneninfektionen in der Maus“

Würzburg, den

Cindy Nitschke

6.7 Publikationsliste

Ingrid Klötting, Cindy Nitschke and Jens van den Brandt (2003)

Impact of genetic profiles on experimental studies: outbred versus wild rats.
Toxicol Appl Pharmacol. **15**;189(1):68-71.

**Cindy Nitschke, Eckhard Flechsig, Jens van den Brandt, Nele Lindner,
Ulf Dittmer and Michael A. Klein (2006)**

Incorporation of tetanus toxoid helper T-cell epitope enhances immunogenicity of a prion protein (PrP) DNA vaccine in PrP-deficient mice but does not protect vaccinated PrP-expressing wild-type mice against scrapie.

submitted in JV

Danksagung

Ich danke an erster Stelle meinem Doktorvater, Prof. Dr. Ulf Dittmer, der die Betreuung meiner Arbeit übernommen hat und trotz der Entfernung immer ein offenes Ohr für Probleme und Fragestellungen hatte. Er hat durch viele nützliche Anregungen und Hinweise maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke PD. Dr. Michael Kuhn für die Bereitschaft, die Zweitkorrektur zu übernehmen, und für sein Interesse am Fortschritt der Arbeit.

Bei Prof. Dr. Michael Klein möchte ich mich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken. Besonders dankbar bin ich für den Freiraum den er mir dabei ermöglicht hat. Ich bin sicher, dass ich dabei viel für meine zukünftige wissenschaftliche Karriere gelernt habe, und profitiere bereits jetzt davon. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Dr. Eckhard Flechsig danken.

Diese Arbeit wäre nicht dieselbe gewesen ohne den Spaß, den ich vor allem mit meinem Zwillingsswidder Nele, der Miss-Verständnisvoll und ewig hilfsbereiten Julia, der Frau **mit** Musikgeschmack Angela und der Partymaus Tanja innerhalb und außerhalb des Labors hatte. Natürlich möchte ich mich auch bei der männlichen Besetzung der Arbeitsgruppe Klein bedanken. Besonders erwähnen möchte ich Papa Patrick und Schnecken-Checker Paul.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen (auch ehemaligen) Mitarbeitern der Labore 050-052 für die angenehme Arbeitsatmosphäre im ersten Jahr vor meinem befohlenen Umzug in den Nordbau bedanken. Mein besonderer Dank gilt hierbei Katrin, die immer da war, wenn ich das Handtuch werfen wollte und mir in der letzten Phase des Zusammenschreibens hilfreich zur Seite stand.

Von ganzen Herzen möchte ich Jens danken. Ohne dich wären manche FACS-Nächte in der totalen Verzweiflung geendet. Danke, dass du mich durch die Doktorarbeit begleitet hast und noch immer da bist.

Nicht zuletzt möchte ich vor allem meiner Familie danken. Ich möchte ihnen für ihren unverhältnismäßigen Glauben an meine Fähigkeiten und für alles was sie mir ermöglicht haben von ganzem Herzen danken.

Ich widme meinen Eltern diese Arbeit, weil diese nur in Verbindung mit ihnen gesehen werden kann.