

**Immunisierungsstrategien gegen
Prionenerkrankungen und Untersuchungen zur
Prionen-induzierten Neurodegeneration**



Angela Bahlo

**Immunisierungsstrategien gegen
Prionenerkrankungen und Untersuchungen zur
Prionen-induzierten Neurodegeneration**



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

vorgelegt von
Angela Bahlo
aus Oberderdingen

Würzburg, 2008

Eingereicht am: 27.05.2008

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. G. Krohne (vom Dekan beauftragt)

Gutachter: Prof. Dr. M. Klein

Gutachter: Prof. Dr. E. Buchner

Tag des Promotionskolloquiums: 31.08.2008

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Für meine Eltern

Die Tragödie der Wissenschaft - das Erschlagen einer schönen
Hypothese durch eine hässliche Tatsache.

Thomas Huxley

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 Prionen und Prionenerkrankungen	1
1.2 Das Prion-Protein	6
1.3 Generelle Eigenschaften des Prion-Proteins	6
1.4 Modelle der Prionenvermehrung	8
1.5 Prionen und Apoptose	9
1.5.1 Signalübertragungswege der Apoptose	11
1.5.2 Die BCL-2 Familie der apoptotischen Proteine	12
1.5.3 Die Physiologische Funktion von PrP und seine Rolle in der Apoptose	14
1.5.4 Das Prion-Protein, BAX und BCL-2	17
1.6 Neurografts zur Untersuchung der Prionen-vermittelten Neurodegeneration	19
1.7 Das Immunsystem	20
1.7.1 Toleranzmechanismen	22
1.7.1.1 Zentrale Toleranz	23
1.7.1.2 Periphere Toleranz	23
1.8 Die Rolle von PrP im Immunsystem	25
1.9 Prophylaktische und therapeutische Ansätze gegen Prionenerkrankungen	26
ZIEL DER ARBEIT.....	27
1) Aktive Immunisierungsstrategien gegen Prionenerkrankungen.....	27
2) Untersuchung zur Prionen-induzierten Neurodegeneration	28
2 MATERIAL	29
2.1 Geräte	29
2.2 Chemikalien	31
2.3 Kits.....	31
2.4 Größen-und Längenstandards	31
2.5 Zelllinien.....	32
2.6 Puffer und Medien.....	32
2.7 Antikörper.....	33
2.8 Scrapie Erregerstämme	34
2.8.1 Scrapie Erregerstamm Rocky-Mountain –Laboratory (RML)	34

2.8.2	Hamster-Scrapie-Erregerstamm (Sc237)	34
2.9	Primer und Sequenzen	34
2.10	Mauslinien	35
2.10.1	<i>Prnp</i> ^{0/0} (Prion-Protein-defiziente Mäuse)	35
2.10.2	Inzuchtstamm <i>C57BL/6</i> (WT)	36
2.10.3	<i>NSEHa-Prnp</i> ^{0/0}	36
2.10.4	<i>Tg(SHaPrP)3922-Prnp</i> ^{0/0}	36
2.10.5	<i>BAX</i> ^{-/-} (BAX-Protein-defiziente Mäuse)	36
2.10.6	<i>BCL-2</i> ^{-/-} (BCL-2-Protein-defiziente Mäuse)	36
3	METHODEN	37
3.1	Molekularbiologische Methoden	37
3.1.1	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	37
3.1.2	Transformation von Bakterien	37
3.1.3	Präparation von Plasmid-DNA	37
3.1.4	Isolierung von DNA aus Schwanzbiopsaten von Mäusen	38
3.1.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
3.1.5.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen	39
3.1.5.2	Genotypisierung transgener Mäuse	39
3.1.6	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	40
3.1.7	Elektrophoretische Auftrennung der DNA	41
3.1.8	Reinigung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA	41
3.1.9	Ligation	41
3.1.10	Sequenzanalyse von DNA	42
3.2	Zellbiologische Methoden	43
3.2.1	Passagieren und Kultivieren eukaryotischer Zelllinien	43
3.2.2	Bestimmung der Zellzahl mit der Zählkammer nach Neubauer	43
3.2.3	Transiente Transfektion von Eukaryotenzellen	43
3.2.4	Fluorescence activated cell sorting (FACS)	44
3.2.5	Herstellung von Zellysaten	44
3.2.6	Behandlung von ScN2a-Zellen mit Mausserum	44
3.3	Biochemische Methoden	45
3.3.1	Herstellung von Gehirnhomogenaten	45
3.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford	45
3.3.3	Proteinase-K Verdau	45
3.3.4	SDS-PAGE Elektrophorese	46
3.3.5	Westernblot, Immunodetektion	46
3.4	Immunologische Methoden	46
3.4.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	46
3.4.2	Präparation von Knochenmarkszellen	47
3.4.3	Proliferationsanalyse	47
3.5	Tierexperimentelle Methoden	48
3.5.1	Betäubung der Mäuse	48
3.5.2	Injektionen von rekombinantem Prion-Protein	48
3.5.3	Retroorbitale Blutentnahme und Serumgewinnung	48
3.5.4	Bioassay zur Bestimmung der Infektiösität	48
3.5.5	Organentnahme und Herzpunktion	49
3.5.6	Transplantation von neuroektodermalem Gewebe	49

3.6	Immunhistochemische Methoden.....	50
3.6.1	Präparation von Organen zur histologischen Untersuchung.....	50
3.6.1.1	Einfrieren und Herstellung von Gefrierschnitten.....	50
3.6.1.2	Fixieren und Herstellen von Paraffinschnitten.....	50
3.6.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	50
3.6.3	Gliab fibrillary acidic protein-Färbung („Saures Gliafaserprotein“, GFAP).....	51
3.6.4	MAP-2 und Synaptophysin-Färbung.....	51
3.6.5	Paraffin-Embedded-Tissue (PET) Blot.....	51
3.6.6	Histoblot.....	52
3.6.7	TUNEL-Färbung („TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling“).....	52
3.6.8	Aktivierte-Caspase-3 Färbung.....	52
4	ERGEBNISSE	54
4.1	Immunisierungsstrategie gegen Prionenerkrankungen im Mausmodell.....	54
4.1.1	Immunisierung mit rekombinantem PrP und dem Fusionsprotein PrP-P30.....	55
4.1.2	Rekombinantes PrP- und PrP-P30-induziertes Maus-Immuneserum ist spezifisch für Hamster- bzw. Maus-Prion-Protein.....	56
4.1.3	Klonierung eines Expressionsvektors für die spezifische Expression von Hamster-Prion-Protein.....	62
4.1.4	Nachweis der Spezifität der Anti-PrP Antikörper mittels FACS-Analyse.....	63
4.1.5	Nachweis der Spezifität der Anti-PrP Antikörper mittels Westernblot.....	64
4.1.6	Rekombinantes PrP- und PrP-P30-induziertes Maus-Immuneserum ist funktionell aktiv und inhibiert die PrP ^{Sc} -Biogenese in lebenden Zellen.....	66
4.1.7	Immunisierung mit PrP-P30 verlängert die Inkubationszeit nach Infektion mit Hamster-Prionen.....	68
4.1.8	Die Immunisierung mit PrP-P30 führt zur Reduktion des PrP ^{Sc} -Gehaltes im Gehirn der mit Prionen-infizierten Tiere.....	70
4.1.8.1	PrP ^{Sc} -Gehalt im Gehirn der immunisierten und infizierten Tieren mittels Westernblot-Analyse.....	70
4.1.8.2	Nachweis des PrP ^{Sc} -Gehaltes in den Gehirnen immunisierter Tiere mittels Histoblot.....	71
4.1.8.3	Bestimmung der Infektiösität infizierter und immunisierter Tiere mittels Bioassay.....	72
4.1.9	Analyse der T-Zell-Immunantwort nach Immunisierung mit rekombinantem PrP und dem Fusionsprotein PrP-P30.....	74
4.1.10	Die Immuneseren sind hochspezifisch für Maus- und Hamster-Prion Protein.....	75
4.1.11	Bestimmung der Spezifität mittels FACS-Analyse.....	78
4.1.12	Spezifität der Immuneseren im Westernblot.....	79
4.1.13	Die Immuneseren sind in der Lage die PrP ^{Sc} Akkumulation <i>in vitro</i> zu inhibieren.....	81
4.1.14	Einfluss der Proteinimmunisierung auf die Proliferation von T-Lymphozyten.....	82
4.2	Analyse der Funktion der apoptotischen Proteine BAX und BCL-2 in der Prionenpathogenese.....	85
4.2.1	Genotypisierung der Embryonen und Transplantation von neuroektodermalem Gewebe.....	86
4.2.2	Seren von transplantierten Empfängertieren zeigen eine spezifische Anti-PrP-Immunantwort.....	87
4.1.1	Analyse der Transplantate.....	88
4.1.1.1	Nachweis von PrP ^{Sc} in neuroektodermalen Transplantaten.....	89
4.1.1.2	Immunhistochemische Analyse der Transplantate.....	91
4.1.1.3	Normale Differenzierung der neuroektodermalen Transplantate.....	93
4.1.1.4	Die Deletion von BAX oder BCL-2 hat keinen Einfluss auf die Induktion der Apoptose.....	95
5	DISKUSSION	98
5.1	Immunisierungsstrategien gegen Prionenerkrankungen im Mausmodell.....	98
5.1.1	Immunisierung mit rekombinantem Prion-Protein und dem Fusionskonstrukt PrP-P30.....	99
5.1.2	Die Immunisierung mit PrP-P30 führt zu einer Verlängerung der Inkubationszeit.....	105
5.1.3	Untersuchung zur Induktion einer T-Zell-spezifischen Immunantwort durch Immunisierung mit rek.PrP und PrP-P30.....	109
5.1.4	Ausblick.....	110

INHALTSVERZEICHNIS

5.2	Funktion von BAX und BCL-2 bei Prionenerkrankungen.....	112
5.2.1	Die neuronale Differenzierung der Transplantate ist unbeeinflusst.....	115
5.2.2	Autophagie als möglicher Mechanismus des neuronalen Zelltods in TSEs	117
6	ZUSAMMENFASSUNG	119
7	SUMMARY.....	121
8	LITERATURVERZEICHNIS	123
	ANHANG	140
	Abkürzungsverzeichnis	140
	Abbildungs-und Tabellenverzeichnis	143
	Ehrenwörtliche Erklärung	146
	<i>LEBENS LAUF</i>	147
	Publikationsliste	148
	<i>DANKSAGUNG</i>	149

1 EINLEITUNG

1.1 Prionen und Prionenerkrankungen

Im Jahr 1985 wurde in der südenglischen Stadt Sussex bei einer Kuh ein bis dahin unbekanntes Krankheitsbild beobachtet. Das Tier konnte seine Gliedmaßen nicht mehr richtig bewegen, torkelte, war nervös und verhielt sich aggressiv. Nach nur wenigen Wochen verendete das Tier an der *Bovinen Spongiformen Enzephalopathie* (BSE). Bisher war eine derartige Erkrankung nur bei Schafen unter dem Namen Traberkrankheit (Scrapie) bekannt. Das Verhalten der Rinder bezeichnet man in Großbritannien als „Mad Cow Disease“, was im Deutschen mit „Rinderwahnsinn“ übersetzt wurde.

Das epidemieartige Auftreten von BSE Anfang der 90er Jahre zunächst in Großbritannien, dann auch in anderen Teilen Europas sowie weltweit, führte zu einer massiven Verunsicherung der Öffentlichkeit. Die Krankheit gehört zu der Gruppe der Prionenerkrankungen, auch *Transmissible Spongiforme Enzephalopathien* (TSE) genannt. Dabei handelt es sich um eine infektiöse, degenerative Nervenkrankheit, die durch Prionen, abnorm gefaltete Prion-Proteine (PrP), verursacht wird (DeArmond, 1993). Neben anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. der Alzheimer-Krankheit, dem Morbus Parkinson oder der Chorea Huntington, nehmen Prionenerkrankungen eine besondere Stellung ein, da sie nicht nur sporadisch oder hereditär auftreten, sondern auch infektiösen Ursprungs sein können. Zum Beispiel führt man BSE auf die Verfütterung von Tiermehl zurück, in denen sich Überreste Prion-infizierter Tiere befanden. Es ist immer noch unklar, ob die Krankheit ursprünglich vom Schaf oder von spontan erkrankten Rindern ausging. Eine wichtige Frage in diesem Zusammenhang war, ob der BSE-Erreger über die Nahrungskette auch auf den Menschen übertragen werden kann.

Die TSE-Erkrankung „Scrapie“ (Traberkrankheit) bei Schafen und Ziegen ist bereits seit dem 18. Jahrhundert in Großbritannien bekannt und betrifft dort heute noch jährlich bis zu 10000 Tiere. Inzwischen ist sie außer in Australien und Neuseeland praktisch weltweit in Ländern mit Schafhaltung verbreitet. Die Krankheit ist in Europa, Nordamerika, einigen asiatischen, afrikanischen und mindestens einem südamerikanischen Land festgestellt worden oder gar endemisch verbreitet. Die Bezeichnung „Scrapie“ stammt aus dem englischen Wort „to scrape“ (schaben, scheuern) und leitet sich aus dem Erkrankungsbild der betroffenen Tiere ab, welche die Tendenz zeigen, sich die Wolle herunterzuscheuern. Die Übertragung vom Schaf auf den Menschen über die Nahrungskette ist wohl sicher auszuschließen, denn bis heute ist eine solche Übertragung noch nie nachgewiesen worden. Die Übertragung eines Prionenstammes auf eine

andere Art gelingt nur, wenn zwischen dem Prion des Spenders und dem zellulären Prion-Protein des Wirtes eine bestimmte Homologie vorhanden ist. Diese Homologie auf der Ebene der Aminosäuresequenzen besteht beispielsweise zwischen Schaf und Rind, sowie auch zwischen Schaf und Hamster. Es ist mittlerweile unumstritten, dass BSE aus dem Rind die so genannte „Speziesbarriere“ übersprungen hat und auch den Menschen infizieren kann. Jedoch sind die genauen Überträgermechanismen und vor allem das mögliche Ausmaß der Übertragung noch nicht hinreichend bekannt. TSE-Erkrankungen treten sowohl beim Tier als auch beim Menschen auf (Tabelle 1 und 2). Sie sind durch eine sehr lange Inkubationszeit mit einem progressiv verlaufenden Krankheitsbild gekennzeichnet und enden immer tödlich. Es kommt zu motorischen Störungen wie Myoklonien, Ataxie, Schreckhaftigkeit und letztendlich zum Verlust der geistigen Fähigkeiten. Pathologisch sind TSEs durch spongiforme (schwammartige) Veränderungen im Gehirn charakterisiert. Diese Pathologie begleitend findet sich eine astrozytäre Gliose, worunter man eine erhöhte Anzahl von aktivierten Astrozyten im geschädigten Bereich des Gehirns versteht, und welche mit vermehrter Bildung des sauren Gliafaserprotein („glial fibrillary acidic protein“, GFAP) einhergeht (Raff et al., 1979).

Erkrankung	Wirt	Ursache
Scrapie (Traberkrankheit)	Schaf/Ziege	Vertikale und horizontale Übertragung in genetisch anfälligen Tieren Orale Transmission Spontan
TME (transmissible mink encephalopathy)	Nerz	Infektion über verseuchtes Fleisch von Schaf und Rind
CWD (chronic wasting disease)	Hirsch/Elch	Möglicherweise ähnliche Übertragung wie bei Scrapie
BSE (bovine spongiforme encephalopathy)	Rinder und rinderartige Wiederkäuer	Infektion durch Prionkontaminiertem Futter Spontan (?)
FSE (feline spongiforme encephalopathy)	Katze/Großkatze	Infektion über verseuchtes Fleisch von Schaf und Rind

Tabelle 1. Übersicht über Prionenerkrankungen bei Tieren.

Besonders bei längeren Krankheitsverläufen kann die Ablagerung von Amyloiden beobachtet werden (Abb.1). Amyloide sind Komplexe aus Proteinen und Polysacchariden und liegen in Form kleiner Fasern, so genannter Fibrillen vor. Sie lagern sich bevorzugt in der Nähe von Gefäßen ab, wodurch es wahrscheinlich zur Beeinträchtigung des lokalen Stoffaustausches kommt. Die Fibrillen können durch Bindung von Kongorot im Gewebe sichtbar gemacht werden (Puchtler and Sweat, 1962).

Scrapie zählt zu den ältesten bekannten Prionenerkrankungen bei Tieren. Neben Scrapie existieren bei Tieren aber noch weitere Prionenerkrankungen (Tabelle 1). Beispiele sind die chronisch zehrende Hirschkrankheit (*chronic wasting disease, CWD*) (Williams and Young, 1980), die Nerz-Enzephalopathie (*transmissible mink enzephalopathy, TME*) (Hartsough and Burger, 1965), die spongiforme Enzephalopathie von Katzen (*feline spongiform enzephalopathy*) (Pearson et al., 1991) und die bovine spongiforme Enzephalopathie in Rindern (*BSE*) (Wells et al., 1987). Die humanen Prionenerkrankungen lassen sich anhand ihrer Ätiologie in drei Kategorien unterteilen: spontane (sporadische), genetisch-familiäre und erworbene Formen (Tabelle 2).

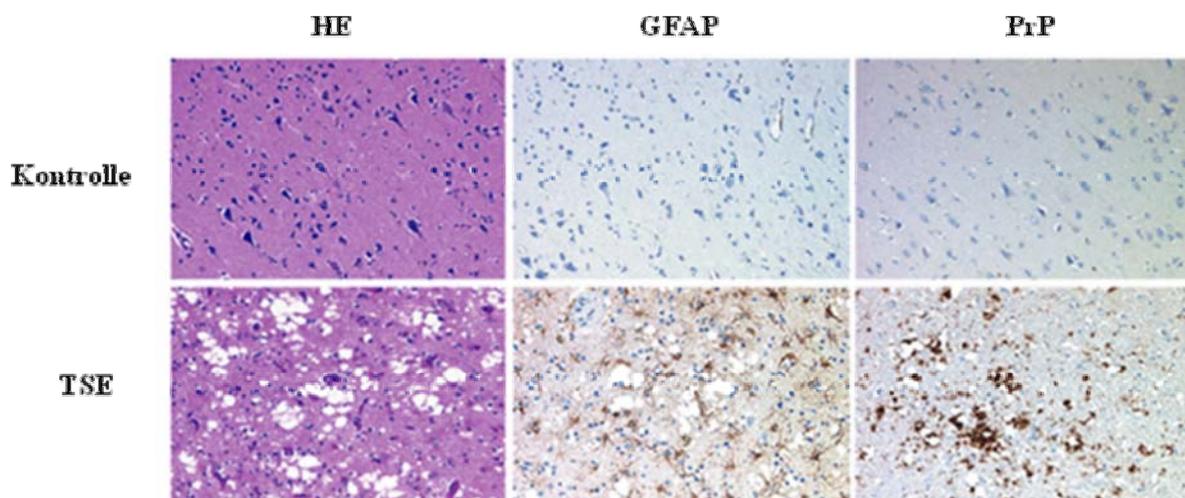


Abbildung 1. Neuropathologische Eigenschaften von Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien. Immunhistologische Veränderung im Kortex eines TSE-Patienten und Kontrollen. Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt sowie mit Antikörper gegen das saure Gliafaserprotein (GFAP) und gegen das Prion-Protein (PrP). Durch die HE-Färbung werden in den Proben des TSE-Patienten im Gegensatz zur Kontrolle spongiforme Veränderungen und Neuronenverlust sichtbar, begleitet von einer vermehrten Proliferation reaktiver Astrozyten (Gliose) und Ablagerungen von PrP^{Sc} (nach Aguzzi et al., 2001).

Ätiologie	Krankheit	Ursache
Sporadisch (spontan)	sCJD (sporadische CJD)	Spontane Konformationsänderung von PrP (?) Somatische Mutation in <i>PRNP</i> (?)
Genetisch-familiär	fCJD (familiäre CJD)	
	GSS (Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom)	Keimbahnmutation von <i>PRNP</i>
	FFI (fatale familiäre Insomnie)	
Erworben	Kuru	Ritueller Kannibalismus
	iCJD (iatrogene CJD)	Operationsbesteck, Hirn- und Hornhauttransplantationen, Hormone aus Leichenhypophysen
	vCJD	Verzehr BSE-kontaminierter Nahrung, Bluttransfusionen

Tabelle 2. Ätiologische Einteilung der menschlichen Prionenerkrankungen und ihre Ursachen

Etwa 90% aller humanen Prionenerkrankungen und besonders die Creutzfeldt-Jakob Erkrankung (CJD, Creutzfeldt-Jakob disease (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921)), welche mit einer weltweiten Inzidenz von ca. 1:1.000.000 auftritt, sind sporadisch (sCJD), der Rest ist genetisch durch Mutationen im Prion-Protein-Gen (*PRNP*) bedingt oder durch Infektion erworben. Zu den erworbenen Arten gehören iatrogene Formen von CJD und die als „lachender Tod“ bezeichnete endemische Nervenkrankheit Kuru. An sich ist CJD nicht ansteckend, allerdings traten iatrogene Mensch-zu-Mensch-Übertragungen nach Kornea und Dura-Mater Transplantationen auf (Lang et al., 1998). In einzelnen Fällen wurden Prionen auch durch unzureichend gesäuberte neurochirurgische Instrumente und nach Behandlung von Patienten mit Wachstumshormonen, welche aus Hypophysen infizierter Verstorbener gewonnen wurden, übertragen (Fradkin et al., 1991). Kuru ist eine Prionenerkrankung, welche ausschließlich im östlichen Hochland von Papua Neuguinea auftrat und welche durch eine Form von rituellem Kannibalismus weitergegeben wurde. Bei diesem Ritual wurden als Zeichen der Verehrung die Gehirne Verstorbener verzehrt. In den 50er Jahren wurde diese Form des Kannibalismus verboten und Kuru mit Ausnahme

einzelner Fälle fast vollständig eliminiert (Palpers, 2005). Rund 10% aller CJD-Fälle sind genetisch vererbt (fCJD = familiäre CJD). Neben fCJD existieren noch weitere Formen von genetisch vererbten Prionenerkrankungen wie das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und die fatale (letale) familiäre Insomnie (FFI= fatale familiäre Insomnie). Das GSS ist benannt nach Joseph G.Gerstmann und seinen Mitarbeitern E.Sträussler und I.Scheinker. Die Krankheit wurde erstmals 1928 in einer österreichischen Familie entdeckt und ist relativ selten (0,01 Fälle/1.000.000 Menschen und Jahr). Das Syndrom wird durch genetische Disposition hervorgerufen und wird autosomal dominant vererbt (Gerstmann et al., 1936). Die sehr seltene FFI ist die jüngst bekannte Prionenerkrankung. Sie wurde erstmals 1986 in Italien beschrieben (Lugaresi et al., 1986) und ist charakterisiert durch Störungen im Schlaf-Wach-Rhythmus (Insomnie) sowie anderen neurologischen Defiziten.

Nach dem heutigen Stand der Dinge muss man davon ausgehen, dass der BSE-Erreger tatsächlich auf den Menschen übertragen wurde. 1994 trat in Großbritannien erstmals eine neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit auf (vCJD), welche sich von sporadisch auftretenden Formen unterscheidet. Die ersten Anzeichen einer sCJD sind eher unspezifisch: Die Patienten entwickeln Schlafstörungen, die Leistungsfähigkeit nimmt ab und sind schreckhaft. Innerhalb weniger Wochen verschlechtert sich der Allgemeinzustand. Sprachstörungen und Störungen der Koordination und der Feinmotorik sind Anzeichen einer fortschreitenden CJD-Erkrankung. Wenige Wochen später entwickeln die Patienten Wahrnehmungsstörungen, Persönlichkeitsveränderungen und einen Verlust von kognitiven Fähigkeiten bis hin zur Demenz. Der Tod tritt bei der sporadischen oder iatrogenen CJD häufig nach sechs bis acht Monaten ein. Mit 14 Monaten ist die durchschnittliche Krankheitsdauer der neuen Varianten von CJD etwa doppelt so lang wie bei den sporadischen Formen. Außerdem zeigen die jungen Patienten bei vCJD Verhaltensauffälligkeiten, Depressionen und Angstzustände, was bei der klassischen Form seltener vorkommt. Die sporadische CJD findet man normalerweise erst bei Patienten nach dem 60. Lebensjahr. Das Durchschnittsalter bei der neuen Variante CJD liegt hingegen bei 29 Jahren. Das Erkrankungsalter des GSS liegt ähnlich wie andere hereditäre Prionenerkrankungen im mittleren Lebensalter (zwischen 35 und 50 Jahren, Gerstmann et al., 1936).

1.2 Das Prion-Protein

Die Frage nach der Natur des Scrapie-Erregers wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. Die extrem langen Inkubationszeiten führten zu dem durch den amerikanischen Wissenschaftler Gajdusek geprägten Begriff „slow virus disease“. Allerdings sprach das Fehlen jeglicher Immunantwort gegen einen Erreger vom Virustyp. Schon 1966 beschrieb die englische Biologin Tikvah Alper die außerordentliche Resistenz des Erregers gegenüber kurzweiliger, ionisierender Strahlung. Die Dosis hätte eine aus Nukleinsäuren bestehenden Erreger zerstört oder geschädigt. Daraufhin prägte der amerikanische Biochemiker Stanley Prusiner 1982 den Begriff „Prion“ für *proteinaceous infectious particles* (proteinartige, infektiöse Teilchen), das ohne Nukleinsäuren auszukommen scheint (Prusiner, 1982). Diese Prionenhypothese wurde in der Wissenschaft zuerst kritisch aufgenommen, da bis dahin ein nukleinsäurefreies und trotzdem infektiöses Agens unvorstellbar war. Später erwies sich die Hypothese als wegweisend für die weitere Forschung und Prusiner erhielt 1997 für seine Arbeit den Nobelpreis in Medizin und Physiologie.

1.3 Generelle Eigenschaften des Prion-Proteins

Das Prion-Protein (PrP) ist ein körpereigenes, membrangebundenes Glykoprotein, das vorwiegend auf der Oberfläche von Neuronen, jedoch auch auf Astrozyten und einer Vielzahl von anderen Zellen exprimiert wird (Brown et al., 1998; Cashman et al., 1990; Kretzschmar et al., 1986). Es wird durch einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI) am Serinrest 231 an die Membran gebunden (Abb.2) (Stahl et al., 1987). Wie andere Membranproteine wird PrP im rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) synthetisiert und über den Golgi-Apparat an die Zellmembran transportiert, wo es in cholesterolreichen Mikrodomänen, den sogenannten „Lipid Rafts“ lokalisiert ist. Während des Transportes wird PrP zahlreichen Faltungs- und Prozessierungsprozessen unterzogen, wie z.B. die Abspaltung der Signalsequenz, Glykosylierungsreaktionen, Bildung einer Disulfidbrücke und der Anhang des GPI-Ankers. Die dreidimensionale Struktur der zellulären Isoform (PrP^C) wurde durch NMR Spektroskopie von rekombinantem Maus-PrP ermittelt (Brown et al., 1997; Riek et al., 1996). Das reife PrP^C Protein besteht aus einer ca. 100 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Region, welche unstrukturiert vorliegt, und einen ebenfalls 100 Aminosäuren umfassenden C-terminalen Segment. Diese C-terminale Domäne besteht aus drei α -Helices und zwei kleinen antiparallelen β -Faltblättern,

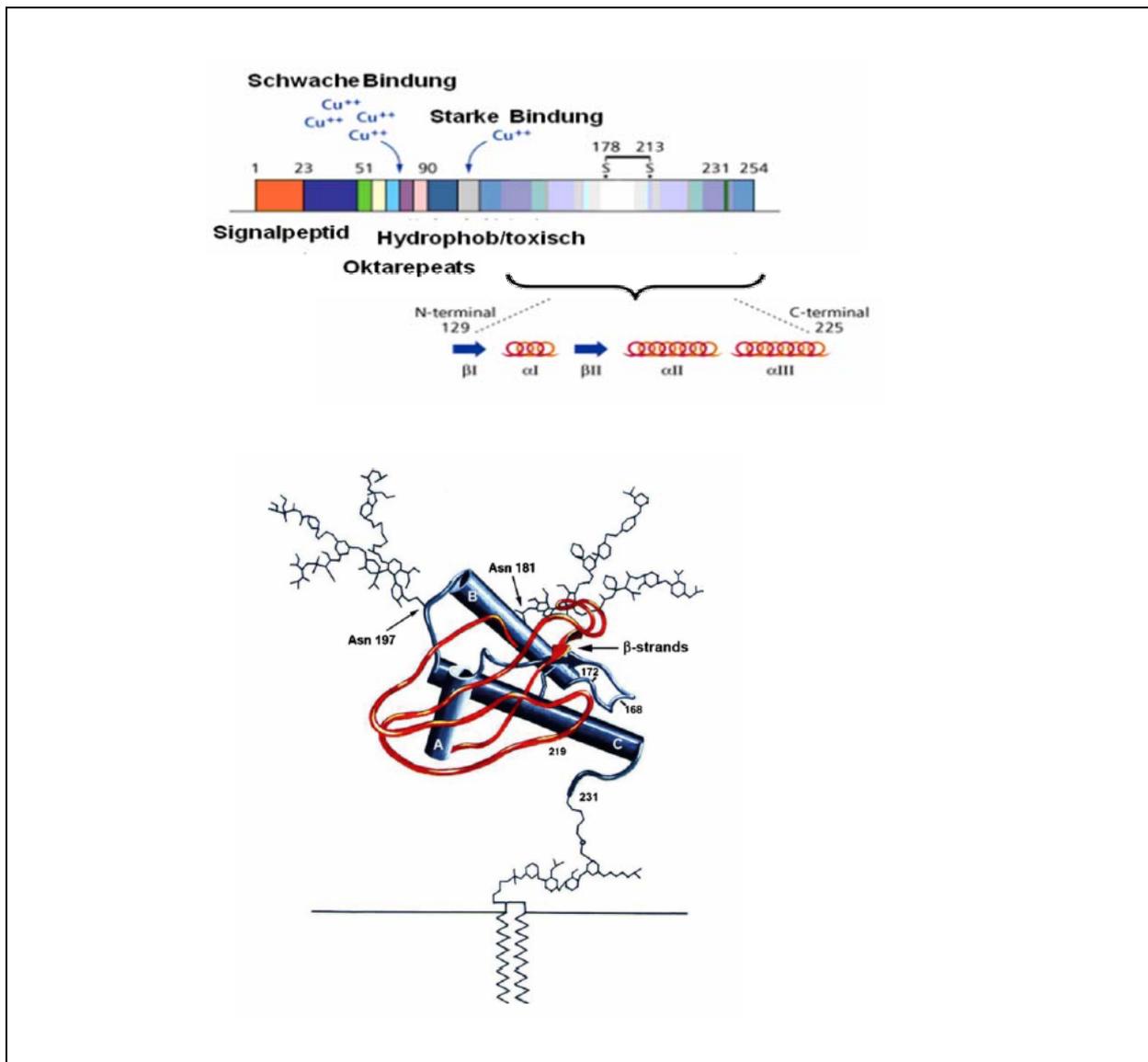


Abbildung 2. Sequenz des Prion-Proteins und Strukturmodell des zellulären PrP. Das reife Molekül erstreckt sich von Aminosäure 23 bis 231 und wird über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI) in der äußeren Plasmamembran verankert. PrP^C enthält zwei unterscheidbare Domänen. Der N-terminale Bereich ist unstrukturiert mit Ausnahme zweier antiparalleler β -Stränge (Reste 128-131 und 161-164) und einer kurzen α -Helix (Reste 144-154). Die C-terminale Domäne ist hoch strukturiert. Diese enthält zwei lange α -helikale Strukturen (Helix 2; Reste 173-194, Helix 3 Reste 200-228), welche über eine Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren Cystein 197 und 214 miteinander verbunden sind. Außerdem enthält die Domäne zwei Glykosylierungsstellen an Asparagin 197 und 181 (DeArmond, 2004).

welche durch eine einzelne Disulfidbrücke zwischen Helix 2 (Asparagin 181) und Helix 3 (Asparagin 197) stabilisiert werden (Endo et al., 1989). Die N-terminale Region des Prion-Proteins enthält fünf Wiederholungen einer acht Aminosäuren umfassenden Sequenz, die so

genannte Oktarepeat-Region, welche zweiwertige Metallionen wie Kupfer binden kann (Brown et al., 1997; Stockel et al., 1998). Diese Region ist innerhalb verschiedener Arten hochkonserviert und Mutationen innerhalb dieser Region sind die Ursache für verschiedene vererbte Formen der Prionenerkrankungen.

Die infektiöse oder „Scrapie“ Form von PrP (PrP^{Sc}) weist einen deutlich höheren Anteil von β -Faltblattstrukturen auf (~43%) und einen verringerten Anteil an α -Helices (~30%) (Hope and Manson, 1991). Die exakte Struktur von PrP^{Sc} konnte bisher nicht aufgeklärt werden, da die infektiösen Aggregate aus PrP^{Sc} in nichtionischen Detergenzien unlöslich sind. PrP^{Sc} zeigt eine partielle Resistenz gegenüber dem Verdau mit Proteinase K (PK) und hinterlässt nach PK-Behandlung nur den Protease-resistenten Teil, der auch als PrP^{27-30} bekannt ist (McKinley et al., 1983). Eine einzelne infektiöse Einheit entspricht ca. 10^5 PrP-Molekülen (Bolton et al., 1982).

1.4 Modelle der Prionenvermehrung

Trotz Unklarheiten bezüglich der strukturellen Eigenschaften der infektiösen Form von PrP gibt es einige Modelle zur Vermehrung und Umfaltung von PrP^{C} zu PrP^{Sc} (Abb.3). Beim so genannten Faltungsmodell („Refolding Model“) nach Prusiner (Harrison et al., 2001) kommt es zur Interaktion zwischen einem PrP^{C} - und einem PrP^{Sc} -Molekül, bei der, unter Überwindung einer hohen Energiebarriere, die Konformation von PrP^{C} so verändert wird, dass es die Struktur von PrP^{Sc} annimmt. Dieses Modell entspricht einer autokatalytischen Strukturumwandlung. Im Keimbildungsmodell („Seeding Model“) nach Lansbury (Come et al., 1993) vermehren sich aus PrP^{Sc} bestehende Aggregate in zwei Schritten, wobei es im ersten Schritt zur Bindung von PrP^{C} an die PrP^{Sc} -Aggregate kommt und die zelluläre Form in die pathogene Form umgewandelt wird, ähnlich einem Polymerisationsprozess. Im zweiten Schritt kommt es zum Zerfall der großen Aggregate in kleinere Fragmente und zu einer exponentiellen Vermehrung der infektiösen Untereinheiten. Voraussetzung für dieses Modell ist die Entstehung eines „Keimes“ aus PrP^{Sc} -Molekülen, was ein seltenes Ereignis darstellt und die niedrige Inzidenz von Prionenerkrankungen erklären würde (Lansbury, 1994).

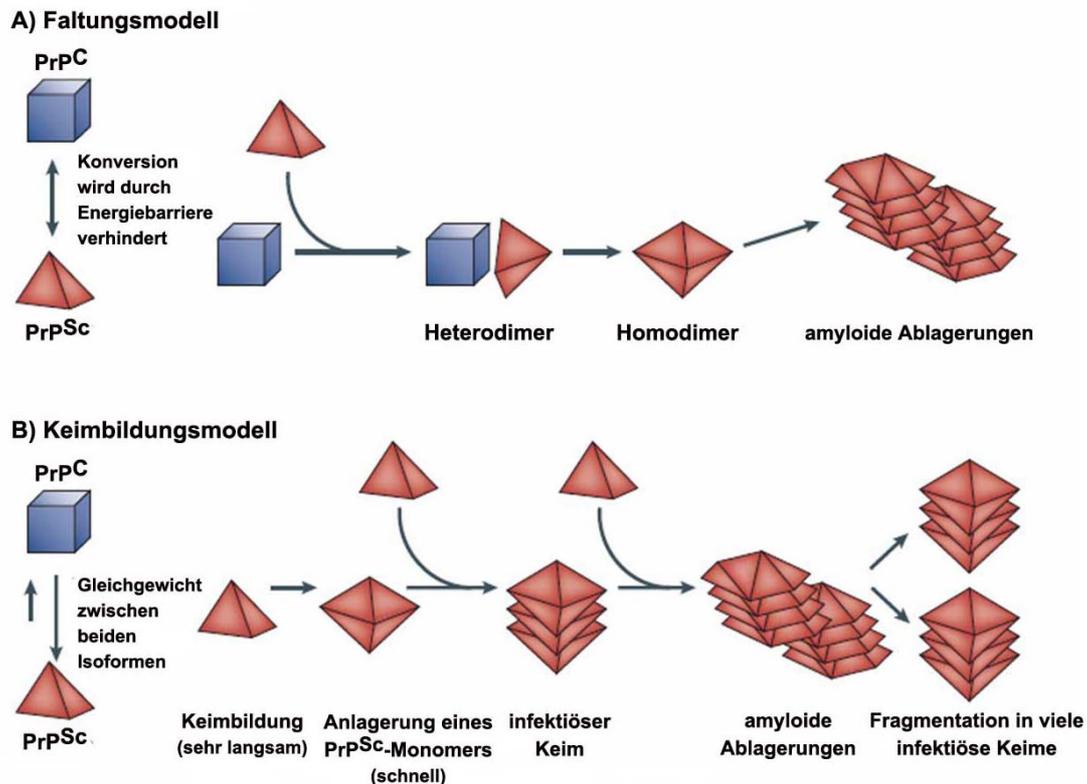


Abbildung 3. Zwei Modelle der Prion-Konversion und Replikation (Aguzzi and Sigurdson, 2004). **A) Das Faltungsmodell.** Die Konformationsänderung von PrP^{C} zu PrP^{Sc} wird im Normalfall durch eine hohe Energiebarriere verhindert. Durch die Interaktion von PrP^{C} mit einem PrP^{Sc} -Molekül kommt es zur Umfaltung von PrP^{C} in die pathogene Form; es bilden sich Homodimere und anschließend Aggregate (Harrison et al., 2001). **B) Das Keimbildungsmodell** Es liegt ein Gleichgewicht von PrP^{C} und PrP^{Sc} -Molekülen vor. Durch die Bindung von PrP^{C} an aus PrP^{Sc} -bestehenden Aggregaten kommt es zur Umwandlung der zellulären Form in die pathogene. Es findet eine Art Polymerisation der pathogenen Aggregate statt, die dann in kleinere Untereinheiten zerfallen. Durch weitere Bindung und Umwandlung von PrP^{C} kommt es somit zu einer exponentiellen Vermehrung der infektiösen Form (Lansbury, 1994).

1.5 Prionen und Apoptose

Wie bereits erwähnt sind Prionenerkrankungen mit neuronalem Zelltod verbunden. Deshalb soll im Folgenden die wichtigsten Merkmale und Mechanismen kurz dargestellt werden.

Die einzelne Zelle als Grundeinheit komplexer biologischer Systeme unterliegt vielfältigen Kontrollmechanismen. Zellteilung, Zellwachstum und -differenzierung und letztlich Zelltod sind Prozesse, die eine Zelle während ihres Lebens durchläuft. Aufgrund ihrer Bedeutung für die

Ausbildung intakter Zellen und Zellverbände unterliegen die genannten Prozesse einer besonders strengen Regulation. Vielzellige Organismen benötigen zur Konstanthaltung ihrer Zellzahl neben der Zellproliferation auch Prozesse für den gezielten Abbau unerwünschter oder geschädigter Zellen. Dieser Prozess wurde zuerst 1972 von Kerr, Wyllie und Currie als „Apoptose“ beschrieben (griechisch für „weg“ („apo“) und „fall“ („ptosis“) (Kerr et al., 1972). Bei der Apoptose handelt es sich um einen klar definierten, ATP-abhängigen Prozess, der durch externe oder interne Signale induziert wird und sich somit klar von der Nekrose unterscheidet. Unter Nekrose versteht man den pathologischen Tod einzelner Zellen oder Zellgruppen, welche durch Zell- und Organschwellung gekennzeichnet ist. Dieser Prozess ruft im Organismus eine Entzündungsreaktion hervor, die zu einer Schädigung benachbarter Zellen führen kann. Apoptose hingegen ist ein streng kontrollierter Prozess und führt in der Regel zum Schrumpfen und Zellkontaktverlust nur einzelner Zellen. Der Zellkern unterliegt bei der Apoptose einer Vielzahl von Veränderungen, was in der Kondensation von Chromatin und der Spaltung der DNA endet. Bei diesem Spaltprozess entstehen Fragmente von 180bp, was dem Abstand zweier Nucleosomen entspricht. Die apoptotischen Zellen werden phagozytiert und von Nachbarzellen absorbiert, wobei es zu keiner entzündlichen Reaktion kommt.

Apoptoseprozesse spielen schon während der Embryonalentwicklung eine entscheidende Rolle. Die Formgebung von Körper und Organen erfolgt mittels apoptotischer Vorgänge, wie zum Beispiel der Abbau der Häute zwischen Zehen und Fingern während der humanen Embryonalentwicklung. Diese ontogenetisch notwendige Form der Apoptose wird auch als programmierter Zelltod (PCD) bezeichnet. Die Entwicklung, Regulation und Homeostase des Immunsystems beruht ebenfalls auf apoptotischen Prozessen wie die Deletion potentiell autoreaktiver T-Lymphozyten im Thymus und die Eliminierung aktivierter T-Zellen nach Immunreaktionen. Apoptose ist also ein Bestandteil der Selbsttoleranz. Die Auslöser für apoptotische Signalkaskaden sind vielfältig. Sie kann als Folge von Strahlung, chemischer Mutagene oder Onkogene sowie Wachstumsfaktorenentzug oder ähnlichem auftreten (Fernandez-Luna, 2007). Eine Dysregulation der Apoptose kann im Organismus zu verschiedenen Krankheitsbildern führen. Eine zu niedrige Apoptoserate kann beispielsweise zu Autoimmunerkrankungen wie Diabetes führen oder zu malignen Erkrankungen wie z.B. dem Burkitt-Lymphom (Borgerson et al., 1999). Eine zu hohe Apoptoseaktivität charakterisiert Krankheitsbilder wie AIDS und verschiedene neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus

Alzheimer, Morbus Parkinson und auch TSEs (Castilla et al., 2004; Fiskum et al., 2003; Leuner et al., 2007; Smale et al., 1995).

1.5.1 Signalübertragungswege der Apoptose

Die zur Apoptose führenden Reaktionsprozesse einer Zelle sind vielfältig organisiert und resultieren aus einem komplexen Wechselspiel von Apoptose-induzierenden und Apoptose-supprimierenden intrazellulären Signalen. Sie führen aber alle zur Aktivierung so genannter Caspasen, Cysteinproteasen, welche die enzymatischen und katabolischen Reaktionen, die zum Tod der Zelle führen, katalysieren, indem sie ihre Substrate hinter einem Aspartatrest spalten (Strasser et al., 2000). In der Zelle liegen die Caspasen als inaktive Vorläuferproteine (Procaspasen) vor, die aus einer großen und kleinen Untereinheit aufgebaut sind. Diese werden nach Aktivierung des Apoptoseweges gespalten und lagern sich zu einem aktiven Enzymkomplex zusammen. Die Caspasen aktivieren sich gegenseitig in einer komplexen Hierarchie, wobei sie prinzipiell in zwei Gruppen unterteilt werden können. Die Gruppe der Initiator-Caspasen umfasst die Procaspasen-2, -8, -9 und -10; die Gruppe der Exekutions-Caspasen die Procaspasen-3, -6, und -7.

Apoptose kann sowohl über extrinsische als auch intrinsische Signalwege ausgelöst werden (Abb.4). Der extrinsische Signalweg wird durch so genannte Todesliganden-Systeme kontrolliert. Als Todesliganden bezeichnete Faktoren vermitteln ihre Effekte über transmembranäre Rezeptoren, welche zur Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFR) gehören. Die Bindung der Todesliganden führt über Rekrutierung von Adaptorproteinen zur Aktivierung der Caspase-Kaskade. Dies führt zur Apoptose (Jin et al., 2005). Beispiel dafür ist das CD95-System. CD95 (auch bekannt als Fas oder Apo-1) befindet sich auf der Zelloberfläche und wird durch Bindung an den dazugehörigen Liganden, CD95L (auch bekannt als FasL) aktiviert. Nach Bindung von FasL an CD95 kommt es zur Bindung von FADD („Fas Associated protein with Death Domain“). Über eine so genannte „Todeseffektordomäne“ (death effector domain, DED) interagiert FADD mit der Procaspase-8. Der Gesamtkomplex aus trimerisiertem Rezeptor, FADD und Procaspase-8 wird als DISC („death inducing signalling complex“) bezeichnet und ist für die Aktivierung der Procaspase von zentraler Bedeutung. Die im DISC aktivierte Caspase-8 aktiviert Effektorcaspasen, die die Apoptose vollenden (Peter and Kramer, 2003).

Der intrinsische Signalweg der Apoptose hingegen wird durch Stressreize hervorgerufen, die eine Störung der Mitochondrien auslösen und somit ein komplexes System von Proteinen

beeinflussen, die die Freisetzung von anderen Proteinen in die Zelle fördern oder unterdrücken. Folglich reagieren die Mitochondrien auf diesen Stress, indem sie z.B. Cytochrom C in die Zelle abgeben. Durch die Bindung von Cytochrom C und dATP an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) wird eine Konformationsänderung des Proteins verursacht. Durch diese Konformationsänderung wird eine Bindung und Aktivierung der Procaspase-9 möglich. Dieser Komplex wird Apoptosom genannt und stellt die aktive Form der Caspase-9 dar. Analog zu Caspase-8 initiiert aktive Caspase-9 die Caspase-Kaskade, die schließlich zum Zelltod führt.

Die Signaltransduktionswege, welche zum Tod der Zelle führen, werden auf verschiedenen Ebenen und über verschiedene Gene/Proteine reguliert. Von besonderer Bedeutung für die Regulierung des mitochondrialen Signaltransduktionsweges sind die Mitglieder der BCL-2 Familie, die sowohl pro- (BAX, Bcl-xS, Bak, Bad, Bok) als auch anti-apoptotische (BCL-2, Bcl-3, Bcl-xL, mcl-1, A1) Wirkungen haben können. Für die proapoptotische bzw. hemmende Wirkung sind auch die Interaktionen zwischen den Mitgliedern der BCL-2 Familie entscheidend, wobei die Komponenten sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden können. Das Verhältnis zwischen BCL-2/BCL-2 Homodimeren und den BAX/BCL-2 Heterodimeren bestimmt beispielsweise die Wirkung von BCL-2 als Inhibitor (McDonnell et al., 1996).

1.5.2 Die BCL-2 Familie der apoptotischen Proteine

Die Familie der BCL-2 Proteine besteht aus pro- und antiapoptotisch wirkenden Mitgliedern (Reed, 1995). Charakteristisch für alle Mitglieder ist das Vorhandensein von maximal vier Domänen, welche intern eine hohe Sequenzhomologie aufweisen (*BCL-2 homology*, *BH1-4*) (Tsujimoto and Shimizu, 2000). Aufgrund ihrer Struktur und Sequenz werden sie nochmals in verschiedene Subfamilien unterteilt. Namensgebend für die Familie und eines der Hauptproteine ist das Protoonkogen BCL-2 (*B cell lymphoma gene-2*), welches in follikulären B-Zell Lymphomen überexprimiert ist. Das BCL-2 Gen ist aus drei Exons aufgebaut, wobei das Exon 3 für das biologisch aktive, 25 kDa große Protein kodiert. Es ist ein integrales Membranprotein, welches in der äußeren Mitochondrienmembran, im Endoplasmatischen Retikulum und in der Kernmembran lokalisiert ist (Hockenbery et al., 1990; Krajewski et al., 1993; Monaghan et al., 1992). Es enthält eine 19 Aminosäuren umfassende C-terminale hydrophobe Signalsequenz, worüber es in den Membranen verankert wird, während der N-Terminus frei im Zytoplasma liegt. Die Hauptfunktion von BCL-2 liegt im Schutz der Zelle gegenüber Apoptose (Hockenbery et al., 1990; Korsmeyer, 1992), wobei es vielfältige Zellschutzfunktion gegenüber den verschiedenen

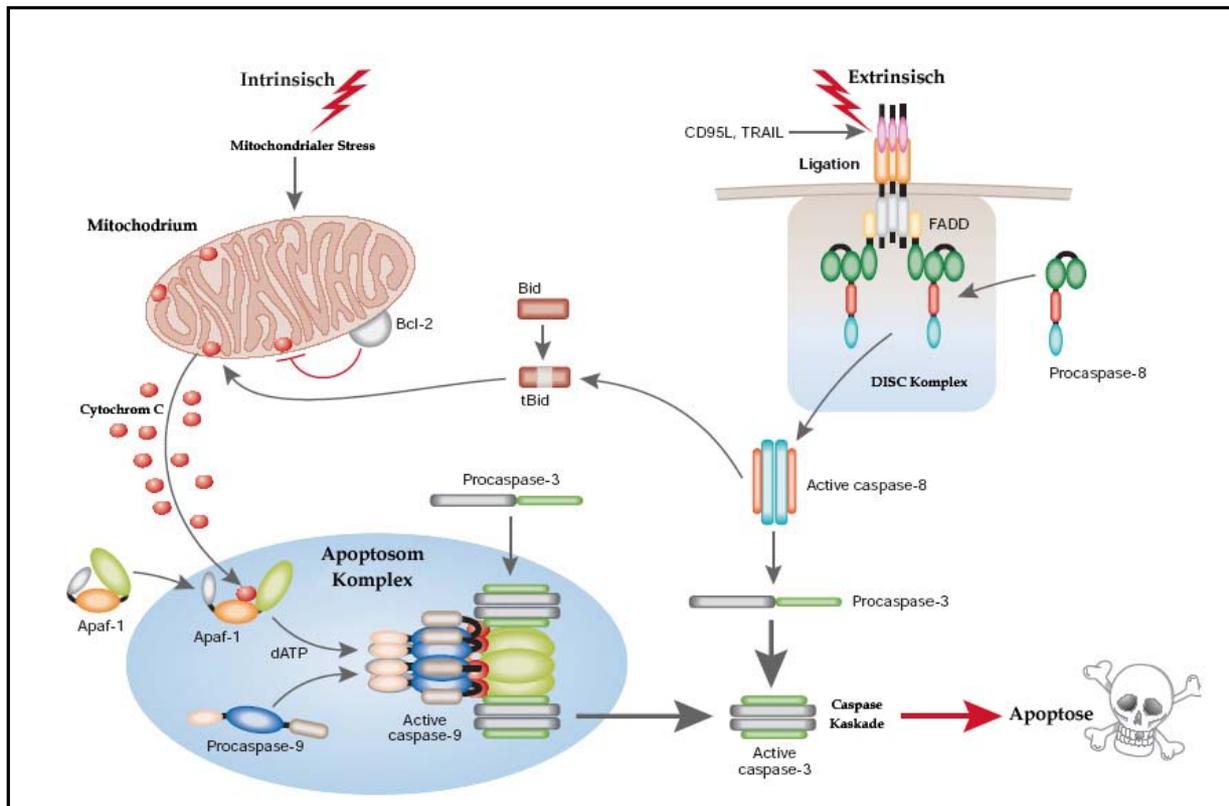


Abbildung 4. Extrinsischer und Intrinsischer Signalweg für die Aktivierung von Caspasen. Der extrinsische Signalweg wird durch Mitglieder der TNFR-Familie wie CD95L oder TRAIL initiiert und führt zur Bildung des DISC-Komplexes, welcher wiederum zur Aktivierung von Caspase-8 und -3 führt. Dieser Signalweg wird durch UV-Strahlung oder Wachstumsfaktorenentzug eingeleitet. Die Initiation des intrinsischen Signalweges hingegen führt zur Freisetzung verschiedener Proteine wie beispielsweise Cytochrom C aus dem Intermembranraum der Mitochondrien. Dieser Prozess unterliegt der Kontrolle von Pro- und Anti-apoptischen Mitgliedern der BCL-2-Familie. Nach dessen Freisetzung interagiert Cytochrom C mit dem apoptotischen Protease-aktivierenden Faktor-1 (Apaf-1), welches zur Bildung des Apoptosom-Komplexes, bestehend aus Caspase-9 und Apaf-1, führt. Durch die Aktivierung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 über die Initiator-Caspasen-8 und -9 führen der extrinsische und intrinsische Signalweg zusammen und resultieren in der Spaltung wichtiger zellulärer Substrate, was zum typischen morphologischen Phänotyp der betroffenen Zelle führt (MacFarlane and Williams, 2004).

proapoptischen Stimuli zeigt (Haendeler et al., 1996). Mäuse, deren *BCL-2* Gen funktionell inaktiviert wurde (*BCL-2*-Knockouts, *BCL-2*^{-/-}) vollenden ihre Embryogenese normal, zeigen aber schon eine Woche nach der Geburt erste phänotypische Veränderungen im Vergleich zu wildtypischen Tieren. Sie sind in der Regel kleiner und zeigen in verschiedensten Geweben eine erhöhte Apoptoserate. Die Tiere sterben nach maximal 10 Wochen aufgrund Lebererkrankungen und Nierenversagen (Nakayama et al., 1993; Veis et al., 1993).

Ein anderes wichtiges Mitglied der BCL-2 Proteine ist BAX (*BCL-2 Associated X protein*), welches anhand seiner Interaktion mit BCL-2 identifiziert wurde (Oltvai et al., 1993). Das BAX-Gen kodiert für ein 21 kDa Protein und enthält in seiner Promotorregion eine Bindungsstelle für das Tumorsuppressorprotein p53 (Miyashita and Reed, 1995). BAX ist ein proapoptotisches Mitglied der BCL-2 Familie und liegt in seiner inaktiven Form als Monomer im Zytoplasma vor. Nach seiner Aktivierung kommt es zur Konformationsänderung und Oligomerbildung und inseriert anschließend in die äußere Mitochondrienmembran. Hier bildet der Proteinkomplex eine Pore, durch die Cytochrom C aus dem periplasmatischen Raum in das Zytoplasma gelangen kann und somit der intrinsische Apoptosesignalweg initiiert wird.

BAX knock-out Mäuse ($BAX^{-/-}$) zeigen eine massive Zellzahlerhöhung (Hyperplasie) in verschiedensten Typen von v.a. lymphoiden Geweben: in granulären Zellen, Thymozyten und B-Zellen, Neuronen und unreifen Keimzellen (Knudson et al., 1995). Weibliche $BAX^{-/-}$ -Tiere sind fertil, männliche $BAX^{-/-}$ Tiere dagegen sind unfruchtbar.

1.5.3 Die Physiologische Funktion von PrP und seine Rolle in der Apoptose

Um die Pathogenesemechanismen einer Krankheit wie die TSEs zu verstehen, sind Kenntnisse über die biologische Funktion des entsprechenden Pathogens unabdingbar. Die genaue physiologische Funktion der zellulären Form des Prion-Proteins ist bis heute ungeklärt. Die Herstellung von PrP^C-Knockout Mäusen ($Prnp^{o/o}$) im Labor von Charles Weissmann im Jahre 1992 (Bueler et al., 1992) brachte allerdings den grundsätzlichen Beweis für die essentielle Rolle von PrP^C für die Entstehung von Prionenerkrankungen. Tiere, welche ein funktionell inaktives $Prnp$ -Gen tragen, sind selbst nach intrazerebraler Injektion mit Scrapie-Prionen nicht infizierbar und entwickeln die Krankheit nicht (Bueler et al., 1993). Ansonsten zeigen weder hetero- noch homozygote Tiere starke phänotypische Auffälligkeiten, sind lebensfähig, entwickeln sich normal und haben nur schwache phänotypische Auswirkungen wie z.B. Veränderungen im Schlaf-Wach-Rhythmus (Tobler et al., 1996). Einige Arbeiten deuten auf eine potentielle Funktion des Prion-Proteins im Kupfermetabolismus einer Zelle hin. Dies basiert auf der Tatsache, dass die Oktarepeat-Region im N-terminalen Bereich von PrP^C in der Lage ist Kupferionen zu binden und somit bei der Regulation der intrazellulären Kupferkonzentration beteiligt ist (Brown et al., 1997; Hornshaw et al., 1995; Pauly and Harris, 1998; Stockel et al., 1998). Diese Hypothese unterstützt die Tatsache, dass der Gehalt an Kupferionen in Zellmembranen aus $Prnp^{o/o}$ -Mäusen gegenüber wildtypischen Tieren signifikant reduziert ist. Dies führt in den Mäusen zu einer erhöhten

Sensitivität von Neuronen gegenüber oxidativem Stress und einer reduzierten Cu/Zn Superoxid-Dismutase- (SOD) Aktivität. Daher wird für PrP eine SOD-Aktivität oder eine Transporterfunktion für die Aufnahme von Metallionen aus dem synaptischen Spalt und deren Transport in die Zelle diskutiert (Wong et al., 2000). Somit ist auch möglich, dass dem zellulären Prion-Protein eine Rolle bei der normalen synaptischen Funktion zukommt (Collinge et al., 1994; Herms et al., 2000).

Wie auch andere GPI-verankerte Proteine findet man PrP^C überwiegend in sogenannten Lipid Raft-Domänen in der Plasmamembran (Taylor and Hooper, 2006). Dies sind Mikrodomänen in der Membran reich an Cholesterinen und Sphingolipiden, welche eine wichtige Rolle bei Signaltransduktionprozessen spielen (Tsui-Pierchala et al., 2002). Eine mögliche Funktion für PrP^C in der zellulären Signaltransduktion wurde in den letzten Jahren von einigen Arbeitsgruppen postuliert und experimentell untermauert. PrP^C ist an verschiedensten Signalwegen aktiv beteiligt, unter anderem für das Überleben und Wachstum von Neuronen und Neuriten und auch für die Vermittlung von neurotoxischen Signalkaskaden. So wurden bei *Prnp*^{0/0}-Mäusen, die N-terminal trunkiertes PrP^C exprimierten, kurz nach der Geburt schwere neurodegenerative Erscheinungen beobachtet (Shmerling et al., 1998). Außerdem konnte die Interaktion von PrP^C mit Proteinen gezeigt werden, die an der zellulären Signaltransduktion beteiligt sind. Das saure Gliafaserprotein (GFAP, glial fibrillary acidic protein) ist als einer der ersten möglichen zellulären Bindungspartner beschrieben worden (Oesch et al., 1990). Des Weiteren werden BCL-2 (Kurschner and Morgan, 1995, 1996), molekulare Chaperone, das Amyloid-Vorläufer-ähnliche Protein 1 (APLP1, (Yehiely et al., 1997) und der 37 kDa Lamininrezeptor (Rieger et al., 1997) als potentielle Bindungspartner diskutiert. Durch Crosslinking-Experimenten mittels Antikörper wurde gezeigt, dass das Crosslinken (Vernetzung) von PrP^C auf der Oberfläche von Zellen zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase Fyn führt (Abb.5 (1)). PrP^C scheint Fyn durch Erhöhung des Phosphorylierungsniveaus zu aktivieren, wobei Caveolin-1 als Mediator zwischen PrP^C und Fyn fungieren könnte (Mouillet-Richard et al., 2000). Durch diese Aktivierung kommt es zur Stimulierung von NADPH Oxidasen und extrazellulär-regulierten Kinasen (ERKs) sowie zur Produktion von reaktiven Sauerstoffprodukten (ROS) (Abb.5 (2)). Insgesamt führen diese Signalwege zu allgemein proapoptischen Effekten (Schneider et al., 2003). Ein anderer proapoptischer Signalweg wird durch die Interaktion von PrP^C mit dem „stress-inducible Protein 1“ (ST1) aktiviert, welches ursprünglich als Co-Chaperon von Hitzeschockproteinen der Hsp70 und Hsp90-Familie identifiziert wurde. Obwohl ST1 überwiegend im Zytoplasma und

Nukleus lokalisiert ist, werden einige Moleküle auch auf der Plasmamembran gefunden und können mit PrP^C kolokalisieren (Zanata et al., 2002). Durch diese Interaktion von PrP^C mit ST1 kommt es zum Schutz der Zellen vor Anisomyein induzierter Apoptose, ein Prozess, der abhängig ist von der Bildung von cAMP und der Aktivierung von Proteinkinase A (Chiarini et al., 2002) (Abb.5 (3)).

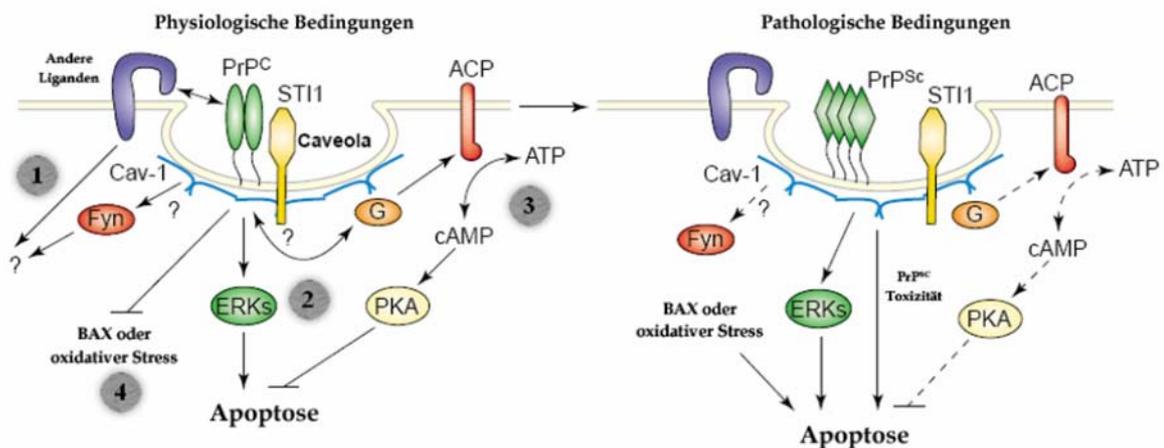


Abbildung 5. Signaltransduktion über das Prion-Protein. Unter physiologischen Bedingungen führt die Interaktion von PrP^C mit verschiedenen Liganden auf der Zelloberfläche zur Aktivierung unterschiedlicher Signalwege: 1) Es kommt zur Caveolin-1-abhängigen Aktivierung der Tyrosinkinase Fyn. 2) Die Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERKs) führt zu neuronaler Apoptose. 3) Durch die Aktivierung eines G-Proteins und der Adenylatzyklase (ACP) kommt es zur Bildung von cAMP und dadurch zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). 4) Der intrinsische apoptotische Signalweg wird inhibiert, indem die Aktivität von BAX bzw. andere Auswirkungen von oxidativem Stress verhindert werden. Unter pathologischen Bedingungen kommt es zur Konformationsänderung von PrP^C zu PrP^{Sc} und somit zu einer Reduktion von neuroprotektiver Signalübertragung und/oder zu einer Erhöhung des neurotoxischen Signalweges (Hetz et al., 2003a).

Eine weitere Funktion hinsichtlich von PrP^C beim Neuritenwachstum ist die Interaktion von PrP^C mit N-CAM, einem Glykoprotein, welches auf der Oberfläche von Neuronen, Gliazellen und Skelettmuskeln exprimiert wird und welches eine Rolle bei Zelladhäsion, Neuritenwachstum und Ausbildung der synaptischen Plastizität spielt. Durch diese Interaktion kommt es zur Anreicherung von N-CAM in Lipid Rafts und nachfolgender Aktivierung der Fyn-Kinase. Es gibt allerdings auch PrP^C-vermittelte Signalwege, die zu neurotoxischen Wirkungen führen. Ein Beispiel ist eine verkürzte Version des Prion-Proteins, das nur aus einem C-terminalen Fragment

des vollständigen Proteins besteht (PrP Δ 106-126). In Zellkultur führt PrP Δ 106-126 zur Aktivierung von zahlreichen intrazellulären Kinasen wie p38, ERK1/2 und JNK1/2 (Carimalo et al., 2005; Pietri et al., 2006; Thellung et al., 2002) und wirkt toxisch (Forloni et al., 1993). Dieses Peptid wird häufig für Untersuchungen der von PrP^{Sc} verursachten neurotoxischen Effekte sowohl für *in vivo* als auch *in vitro* Studien verwendet, weil es auf molekularer Ebene die Eigenschaften von PrP^{Sc} repräsentiert (Nguyen et al., 1995). PrP Δ 106-126 bindet an einen putativen Liganden von PrP^C, ohne jedoch Signalwege zu aktivieren, die mit dem Überleben der Zelle in Zusammenhang gebracht werden (Brown et al., 1997). Es wird angenommen, dass die pathologische Form PrP^{Sc} selbst nicht toxisch wirkt, sondern durch kompetitive Inhibierung von PrP^C, wichtige Signalübertragungsprozesse verhindert (Abb.5).

1.5.4 Das Prion-Protein, BAX und BCL-2

In yeast-two-hybrid Experimenten und Co-Immunopräzipitationen wurde gezeigt, dass PrP-Fusionsproteine mit dem antiapoptotischen Protein BCL-2 interagieren (Kurschner and Morgan, 1995, 1996). Die Oktarepeat-Region des PrP^C-Moleküls weist eine hohe Sequenzhomologie mit der für die BCL-2 Familie charakteristischen BH2-Domäne auf. Diese Domäne ist essentiell für die antiapoptotische Wirkung von BCL-2 und seine Interaktion mit dem antiapoptotischen Protein BAX, weshalb eine Zugehörigkeit von PrP zu der BCL-2 Familie gemutmaßt wird. Eine Bestätigung dafür bilden Versuche, in denen gezeigt wurde, dass die zelluläre Form des Prion-Proteins in der Lage ist, humane fötale Neuronen in Zellkultur gegen BAX-vermittelte Apoptose zu schützen. Wenn die Neuronen mit einem BAX-exprimierenden Plasmid transfiziert werden, sterben ca. 90% der gesamten Zellen infolge Apoptose. Wenn hingegen PrP^C gleichzeitig kotransfiziert wird, verringert sich die Rate apoptotischer Zellen auf ca. 10% (Bounhar et al., 2001; Roucou et al., 2003). Diese Eigenschaft von PrP scheint dabei spezifisch für BAX zu sein, auf andere Apoptose-induzierende Proteine wie Bak oder t-Bid scheint PrP keinen Einfluss zu nehmen (Roucou et al., 2005). Außerdem verliert PrP^C seine neuroprotektive Wirkung wenn die Oktarepeat-Region deletiert wird oder C-terminal Mutationen eingeführt werden, die mit erblichen Prionenerkrankungen assoziiert sind (Bounhar et al., 2001).

In einer anderen neuronalen Zelllinie ist die Expression von PrP^C ausreichend, die Zellen vor Apoptose zu schützen, welche beispielsweise durch Serummangel induziert wird (Kuwahara et al., 1999; Sakudo et al., 2005). Ein anderes Beispiel für diese protektive Eigenschaft von PrP^C stellt die Zelllinie MCF-7 dar (Zelllinie eines humanen Brust-Adenokarzinoms). Diese Zellen

sterben durch Apoptose wenn sie in Kultur mit dem Zytokin Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) behandelt werden. Durch endogene Überexpression von PrP^C kann der Zelltod verhindert werden, wobei zumindest teilweise eine Inhibierung des mitochondrialen Apoptose-Signalweg nachgewiesen werden konnte (Diarra-Mehrpour et al., 2004).

Die genauen antiapoptotischen und neuroprotektiven zugrunde liegenden Mechanismen von PrP^C sind noch weitgehend unbekannt, doch es wird vermutet, dass PrP seine Wirkung über die Inhibierung des BAX-induzierten Zelltods bewirkt (Abb.6). Das Verhältnis von BAX und BCL-2 ist ein wichtiges Kriterium bei der Regulation von apoptotischen Vorgängen (Oltvai and Korsmeyer, 1994) und Heterodimerbildung und Verschiebungen des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen bestimmen die Sensitivität oder Resistenz einer Zelle gegenüber apoptotischen Stimuli (Kroemer and Reed, 2000; Reed, 1997). Zurzeit ist nicht bekannt, ob PrP^C seine Wirkung direkt über eine Interaktion mit BAX ausübt, oder indirekt über andere Mediatoren wirkt. Da PrP^C vorwiegend auf der Zelloberfläche lokalisiert ist, könnte die Interaktion mit einem putativen PrP^C-Rezeptor zum Auslösen einer intrazellulären Signalkaskade führen, die direkt oder indirekt auf BAX wirkt. Von verschiedenen BAX-Inhibitoren wurde gezeigt, dass sie direkt im Zytosol an BAX binden und somit seine Translokation ins Mitochondrium verhindern. Auch von PrP^C wurde eine zumindest teilweise Lokalisierung im Zytosol beschrieben. Dieses zytosolische PrP könnte ebenfalls direkt mit BAX interagieren und somit eine Konformationsänderung und Aktivierung des Proteins verhindern. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass PrP^C durch BCL-2 agiert und somit das Verhältnis von BCL-2 zu BAX qualitativ verändert wird. Ein erst vor kurzem entdeckter Mechanismus der Apoptose wird über das endoplasmatische Retikulum (ER) aktiviert. Dieser Signalweg wird spezifisch durch ER-Stress-Signale ausgelöst, wie z.B. Störungen der Calcium-Homöostase. Interessanterweise ist die ER-induzierte Apoptose durch BCL-2 hemmbar und auch PrP könnte hier durch direkten Einfluss auf die Calcium-Konzentration der Zelle wirken.

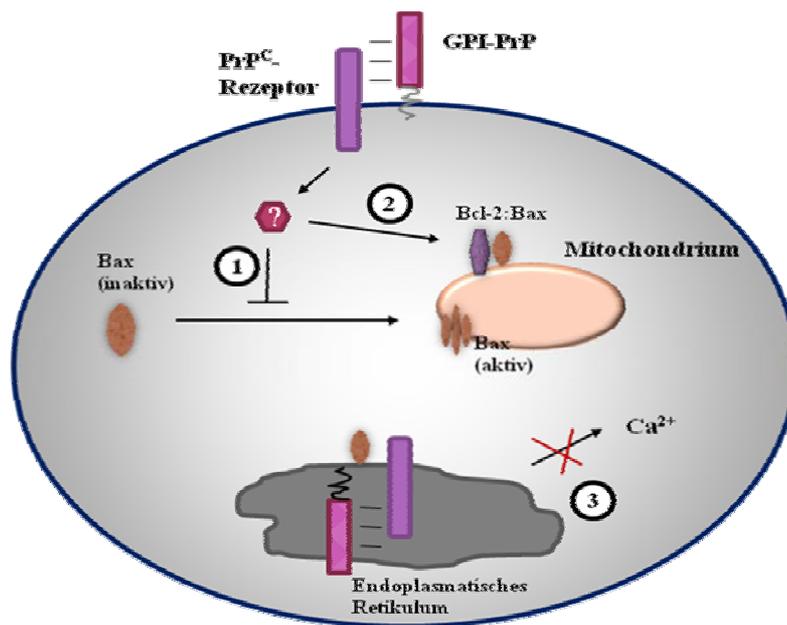


Abbildung 6. Mögliche Mechanismen der Inhibition von BAX-induzierter Apoptose durch PrP^C. PrP^C auf der Zelloberfläche (GPI-PrP) bindet an einen putativen PrP^C-Rezeptor und löst intrazellulär eine Signalkaskade aus, welche dann (1) zur Störung der Translokation von BAX ins Mitochondrium führt bzw. die Konformationsänderung bzw. Oligomerisierung von BAX verhindert. Eine weitere Möglichkeit liegt in der Erhöhung der Bindung zwischen BAX und antiapoptotischen Proteinen wie BCL-2 oder Bcl-X_L durch Signalübertragung von PrP^C (2). Außerdem könnte PrP im Endoplasmatischen Retikulum direkt auf den intrazellulären Calciumspiegel Einfluss nehmen (3) (Westergard et al., 2007).

1.6 Neurografts zur Untersuchung der Prionen-vermittelten Neurodegeneration

Die so genannte „Neurografting“ Technik verwendet ein Transplantationsmodell, in dem neuronales Gewebe aus Tieren untersucht werden kann, die nicht direkt mit Prionen inokuliert werden können. Darunter versteht man beispielsweise „Knock-out“-Mausmodelle, die einen ausgeprägten evtl. letalen Phänotyp aufweisen und deshalb für Inokulationsstudien nicht geeignet sind. Bei der Transplantationstechnik (Abb.7) wird mit Hilfe eines stereotaktischen Rahmens neuroektodermales Gewebe eines zu untersuchenden Mausstammes in das Gehirn von *Prnp*^{0/0}-Mäusen implantiert. Nach Ausdifferenzierung der Transplantate erfolgt die intrazerebrale Inokulation mit Prionen. Die Prionenreplikation ist dabei auf das PrP^C-exprimierende Transplantat beschränkt und pathologische Veränderungen können über einen längeren Zeitraum untersucht werden, da die *Prnp*^{0/0}-Empfängertiere nicht erkranken.

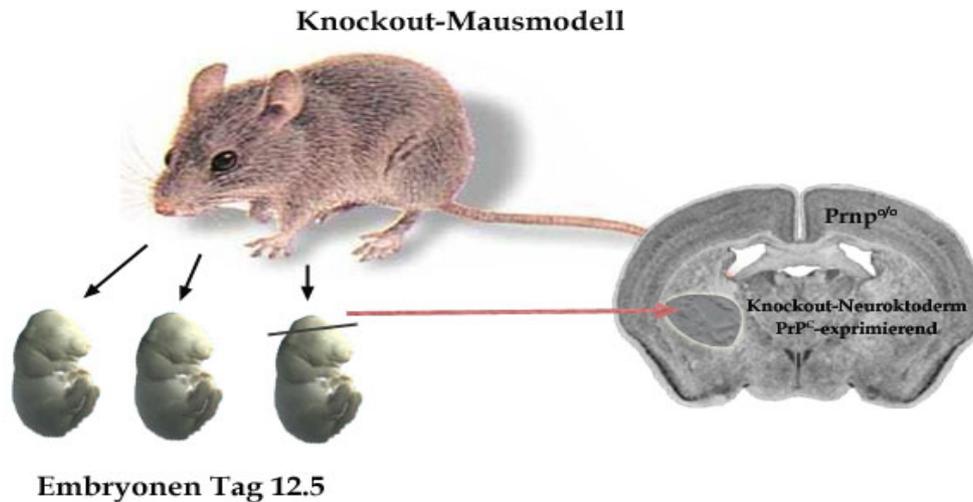


Abbildung 7. Die „Neurografting“ Technik. Die Hirnanlage eines für den zu untersuchenden Faktor defizienten Mausembryos wird an Tag 12,5 entnommen, die neuroektodermale Anlage präpariert und in das Gehirn einer $Prnp^{o/o}$ -Maus transplantiert. Nach Inokulation mit Prionen ist die Replikation und Prionenpathologie auf das PrP^C -exprimierende Transplantat beschränkt, während das Empfängertier gesund bleibt.

Das Modell kann verwendet werden, um den Einfluss verschiedener Moleküle oder Faktoren auf den Verlauf des neurodegenerativen Prozesses zu untersuchen.

1.7 Das Immunsystem

Da in der vorliegenden Arbeit Immunisierungsstrategien durchgeführt wurden, soll im Folgenden die Grundlagen der Immunabwehr kurz zusammengefasst werden. Als Immunsystem (aus dem lateinischen *immunis* für „frei“ und „unberührt“) bezeichnet man die Fähigkeit höherer Lebewesen sich gegen pathogene Krankheitserreger wie Viren, Bakterien und Parasiten zu wehren und somit Schädigungen des Organismus zu verhindern. Es existieren zwei Abwehrmechanismen, die parallel ablaufen können und sich in ihrer Wirkung ergänzen: die *unspezifische, angeborene Immunität* und die *spezifische, erworbene Immunität*, die auch als *adaptive Immunantwort* bezeichnet wird.

Das Prinzip der unspezifischen Immunität ist die Aufnahme und Zerstörung der in den Organismus eingedrungenen fremden Mikroorganismen und pathogene Makromoleküle durch Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Diese Zellen

gehören zu den weißen Blutkörperchen (Leukozyten) und entwickeln sich aus lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark. Dabei wirken NK-Zellen antigenunspezifisch gegen virusinfizierte Zellen oder auch körpereigene Tumorzellen. Granulozyten werden auch als polymorphkernige Leukozyten bezeichnet. Sie enthalten große, azurophile Granula und werden je nach Färbeverhalten ihres Protoplasmas in neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten unterteilt. Die Granula enthalten Proteine und Lipoproteine (z.B. „Perforin“), die bei Bindung an Zielzellen freigesetzt und in die Zellmembran der Zielzelle eingelagert werden. Sie bilden dann Poren in den Zielzellen und lösen diese auf (Zytolyse). Granulozyten sind mit einer Lebensdauer von zwei bis drei Tagen kurzlebig. Monozyten haben einen Durchmesser von 12-25µm bilden somit die größten aller Leukozyten. Sie wandern nach ihrer Reifung im Knochenmark in den Blutkreislauf in ihre Zielgewebe und besitzen eine ausgeprägte Phagozytosefähigkeit. Granulozyten und Makrophagen werden zu den Fresszellen gezählt, da sie körperfremde Proteine, wie etwa auf der Oberfläche von Viren und Bakterien, ständig phagozytieren, intrazellulär zerkleinern und als Antigene auf der eigenen Zelloberfläche präsentieren. Die angeborene Immunität beruht insgesamt auf unspezifischen Abwehrmechanismen, die sofort oder innerhalb einiger Stunden nach Erscheinen eines Antigens im Körper wirken.

Die erworbene Immunität hingegen entwickelt sich im Laufe des Lebens aufgrund des Kontaktes mit Fremdstoffen, die durch unspezifische Abwehrmechanismen nicht bekämpft worden sind. Die Funktion der erworbenen Immunität wird durch ein komplexes System von Zellen und verschiedenen Substanzen gesichert. Durch Antigenkontakt wird eine für jedes Fremd-Molekül spezifische Antwort hervorgerufen. Die Effizienz dieser immunologischen Antwort verbessert sich durch wiederholte Exposition mit dem gleichen Antigen, es entsteht ein immunologisches Gedächtnis. Effektorzellen der adaptiven Immunität sind die Lymphozyten, welche in zwei Hauptgruppen unterteilt werden können, die B- und die T-Lymphozyten.

Die B-Lymphozyten sind verantwortlich für die Bildung von Antikörpern (Immunglobuline, Ig), und werden im Knochenmark gebildet (bone marrow, B-Zellen). Jede B-Zelle produziert nur einen Typ Antikörper, der auf ein spezifisches Epitop ausgerichtet ist. Die Produktion der Antikörper beginnt, wenn die B-Zelle das ihr zugehörige Antigen erkannt hat und gleichzeitig mit Zytokinen stimuliert wird. Die noch unreife B-Zelle beginnt daraufhin sich zu teilen und den Zellapparat für die Proteinbiosynthese aufzubauen. Eine nach 4-5 Tagen voll ausgereifte B-Zelle wird Plasmazelle genannt; 90-95 % der von ihr produzierten Proteine sind Antikörper, von der

sie pro Sekunde bis zu 2.000 sezerniert. Nach einer solchen Immunreaktion bleiben einige B-Zellen in einem späten, inaktiven Prä-Plasmazellen-Stadium zurück. Diese B-Gedächtniszellen können bei erneutem Antigenkontakt sehr viel schneller zur Plasmazelle reifen und innerhalb kurzer Zeit das Antigen mit Antikörpern bekämpfen. B-Gedächtniszellen sind ein wichtiger Teil des bei einer Impfung gebildeten immunologischen Gedächtnisses.

Die T-Lymphozyten (T-Zellen) reifen im Thymus und können anhand der Expression spezifischer Oberflächen-Glykoproteine („Cluster of differentiation“, CD) in zytotoxische T-Zellen ($CD8^+$ T-Zellen) und Helfer-T-Zellen ($CD4^+$ T-Zellen) unterteilt werden (Parnes, 1989). T-Helferzellen sind befasst mit der primären Antigenerkennung. Sie erkennen zusammen über dem Major Histocompatibility Complex II (MHC II) präsentierte Antigene und werden dadurch aktiviert. Sie aktivieren dann selbst $CD8^+$ T-Zellen und B-Zellen. Der MHC umfasst eine Gruppe von Genen, welche für Proteine codieren, die für die Immunerkennung, die Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) und die immunologische Individualität wichtig sind. Durch die Aktivierung von T-Helferzellen kommt es zur Produktion von Interleukinen (und anderen Zytokinen). Durch ihr Interleukin-Muster lassen sich zwei T-Helferzellen-Populationen unterscheiden: die T_{H1} -Zellen und T_{H2} -Zellen (Bliss et al., 1996; Janeway, 2001; Mosmann and Coffman, 1989; Seder and Paul, 1994). T_{H1} -Helferzellen wirken bei Infektionen allgemein und besonders bei intrazellulären Pathogenen wie Viren und Parasiten. Es erfolgt eine frühe Freisetzung von Interferon-Gamma ($IFN-\gamma$), GM-CSF und Interleukin-2 und -3 (IL2, IL3), dadurch werden NK-Zellen aktiviert. Diese können Krankheitserreger schon sehr früh angreifen, noch bevor Antikörper gebildet wurden. Außerdem aktivieren sie über ihre Zytokine Makrophagen und regen B-Zellen zur Produktion von Immunglobulin M an. T_{H2} -Helferzellen finden sich vorwiegend bei Parasitenerkrankungen und Allergien. Eine frühe Interleukin-4, -5 und -3 (IL4, IL5, IL3)-Freisetzung lockt eosinophile Granulozyten an und regt B-Lymphozyten zur Bildung von Immunglobulin G und -E an (Janeway, 2001).

1.7.1 Toleranzmechanismen

Als Toleranz wird die Fähigkeit des Immunsystems eines Organismus bezeichnet, zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ zu unterscheiden. Krankheitserreger wie Bakterien, Parasiten oder Viren müssen vom Organismus als körperfremd erkannt werden, wohingegen Immunreaktionen gegen körpereigene Antigene verhindert werden müssen. Diese Selbsttoleranz gegen körpereigene Strukturen wird auf mehreren Wegen erreicht.

1.7.1.1 Zentrale Toleranz

Zentrale Toleranz entsteht bei der Entwicklung von T-Zellen im Thymus. T-Zellen werden hier, sobald sie einen funktionellen T-Zell-Rezeptor exprimieren, einer ersten Kontrolle auf potentielle Selbstreaktivität unterzogen. Wenn während dieser T-Zell-Entwicklungsphase Selbstantigene mit hoher Affinität erkannt werden, kommt es zur „negativen Selektion“ dieser Zellen und dies führt zum apoptotischen Zelltod (Kisielow et al., 1988; Sprent et al., 1988). Damit wird verhindert, dass T-Zellen mit einer hohen Eigenaffinität aus dem Thymus in die Peripherie entlassen werden. Damit sich Thymozyten zu reifen T-Lymphozyten entwickeln, müssen sich die in diesem frühen Entwicklungsstadium befindenden doppelt positiven Lymphozyten ($CD4^+ CD8^+$) noch einem anderen Selektionsprozess unterziehen. In dieser so genannten „positive Selektion“ werden T-Zellen, die Peptide im Komplex mit eigenen MHC-Molekülen erkennen, positiv selektioniert. Der Rest, der dieses Selektionskriterium nicht erfüllt, d.h. entweder zu stark bindet oder MHC-Moleküle überhaupt nicht erkennt, stirbt ebenfalls den apoptotischen Zelltod. Im Gegensatz zur „negativen Selektion“, die sich hauptsächlich an Oberflächen von anderen Zellen, wie z.B. dendritischen Zellen (DCs) oder Makrophagen abspielt, ereignet sich die positive Selektion hauptsächlich an Epithelzellen des Thymus. Erst wenn die T-Zellen diese Selektionsschritte erfolgreich durchlaufen haben, werden sie als immunkompetente Zellen im Blut zirkulieren und die sekundären Lymphorgane besiedeln. Nur ca. 3-5% aller T-Lymphozyten überleben diesen Selektionsprozess.

1.7.1.2 Periphere Toleranz

Zentrale Toleranz erfordert, dass ein entsprechendes Selbstantigen im Thymus exprimiert wird bzw. über Blut und Lymphe dorthin transportiert wird. Nicht alle Selbstantigene werden im Thymus repräsentiert und weitere Antigenepitope kommen in der Körperperipherie vor. Das Vorkommen potentiell selbstreaktiver T-Zellen in der Peripherie führt jedoch nicht automatisch zu einer Autoimmunpathologie. Zusätzlich zur zentralen Toleranz wirken andere Mechanismen in der Körperperipherie, wie klonale Deletion, Ignoranz oder Anergie und regulatorische T-Zellen.

Unter klonaler Deletion versteht man die Eliminierung unreifer Lymphozyten, die körpereigene Antigene erkennen, in Analogie zur negativen Selektion im Thymus. Um eine Immunantwort auszulösen, müssen neben der Präsentation des Antigens auf der Oberfläche von

antigenpräsentierenden Zellen (antigen presenting cells, APCs) kostimulatorische Signale abgegeben werden, welche dann zur Expansion und Differenzierung der T-Zellen führen (Lenschow et al., 1996). Als Anergie wird die fehlende Reaktion auf ein Antigen durch Abwesenheit der kostimulatorischen Signale bezeichnet, was ein Abschalten der Immunantwort zur Folge hat (Matzinger, 1994). Manche Selbstantigene induzieren weder zentrale noch periphere Toleranz, sie werden vom Immunsystem vollständig ignoriert. Das gilt beispielsweise für Antigene, die in großer Entfernung von Lymphozyten vorkommen (Ohashi et al., 1991). Die wichtigsten kostimulatorischen Signale für T-Zellen sind die B7-Moleküle (B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86)) auf APCs, die vom CD28 Rezeptor auf T-Zellen erkannt werden (Abb.8) (Jenkins and Schwartz, 1987; Schwartz et al., 2001) und das CD40-Molekül, welches vom CD40-Liganden erkannt wird. Wird diese Interaktion in Kombination des T-Zell-Rezeptors durchgeführt, der an Antigen-MHCII-Komplexe bindet, erfolgt die Aktivierung der T-Zellen und es kommt zur Proliferation und Zytokinproduktion (IL-2). Regulatorische T-Zellen (Tregs) werden anhand ihrer Oberflächenmarker $CD4^+$ und $CD25^+$ identifiziert und zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, sowie B-Zellen spezifisch zu regulieren.

Induktion der Immunantwort

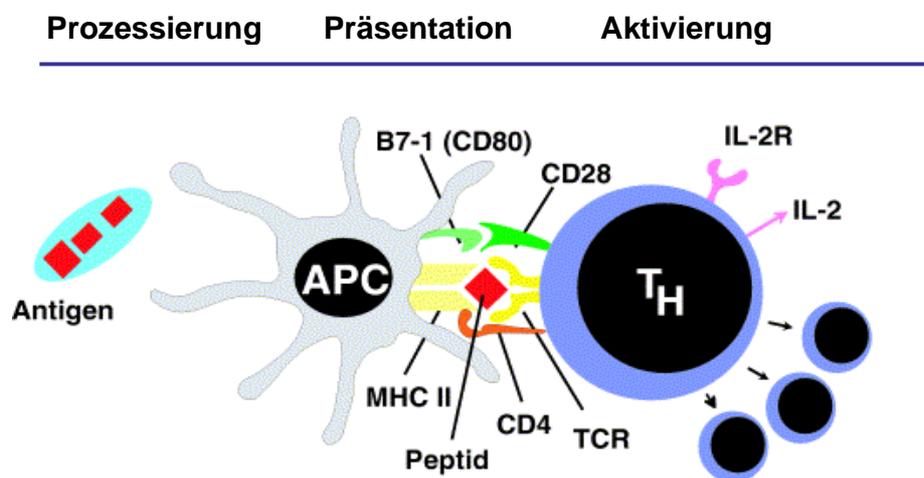


Abbildung 8. Induktion der Immunantwort. T-Zellen erkennen ein Antigen und werden durch Interaktionen zwischen T-Zell-Rezeptoren (TCR), dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) und kostimulatorischen Molekülen (CD28-B7, CD40L-CD40) aktiviert. Aktivierte T-Zellen sezernieren Zytokine, die wiederum Makrophagen, B-Zellen, zytotoxische T-Zellen und Natürliche Killerzellen (NK) aktivieren. APC=Antigen-präsentierende Zelle, T_H=T-Helferzelle, TCR=T-Zell-Rezeptor, IL-2=Interleukin-2; IL-2R=IL-2-Rezeptor (Pleyer and Ritter, 2003).

Die genaue Wirkungsweise ist bisher noch weitgehend unklar. Diskutiert wird, ob Tregs ihre Wirkung über direkten Zell-Zell-Kontakt (Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998) oder über die Sekretion von Zytokinen wie z.B. IL-10 oder TGF- β (transforming growth factor) ausüben (Annacker et al., 2001).

1.8 Die Rolle von PrP im Immunsystem

Die zelluläre Form von PrP wird neben Zellen des zentralen Nervensystems von einer Vielzahl von Zellen des Immunsystems wie z.B. hämatopoetischen Stammzellen (haematopoetic stem cells, HSCs) und reifen lymphoiden und myeliden Kompartimenten exprimiert (Cashman et al., 1990). In Prion-infizierten Tieren oder mit TSE infizierten Personen sind spezifische Antikörper gegen das Prion-Protein nicht nachweisbar. Diese Abwesenheit einer spezifischen Immunantwort bei Prionenerkrankungen ist die Folge der Toleranz des Immunsystems gegenüber PrP^{Sc}, welches die gleiche Primärstruktur wie das körpereigene Protein PrP^C besitzt. Für die Ausbreitung und Vermehrung von Prionen im Organismus hingegen spielt das lymphoretikuläre System eine bedeutende Rolle. Nach peritonealer, subkutaner oder intravenöser Infektion akkumulieren Prionen zuerst in der Milz und in den Lymphknoten. Im Mausmodell erreicht die Infektiösität in diesen Organen nach ca. vier Wochen ein Plateau, bevor nach weiteren acht Wochen die gleichen infektiösen Titer auch im zentralen Nervensystem gefunden werden. Nach oraler Kontamination werden Prionen zuerst im Darm-assoziierten lymphatischen System, v.a. in den Peyerschen Plaques gefunden (Maignien et al., 1999), gefolgt von der Infektion mesenterischer Lymphknoten und anderer sekundärer Lymphorgane (McBride et al., 2001; Sigurdson et al., 2001). Folglich akkumulieren Prionen in den peripheren Nerven kurz nach der Infektion des lymphoidalen Gewebes, was darauf hinweist dass Prionen das ZNS über axonale Transportwege erreichen (Beekes and McBride, 2000).

PrP^C wird auch auf T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten, Dendritischen (DCs) und follikulär dendritischen Zellen (FDCs) gefunden (Aucouturier et al., 2000; Blattler et al., 1997; Klein et al., 2001; Montrasio et al., 2001). FDCs sind Bindegewebszellen, die mit ihren dendritenartigen Fortsätzen in Lymphfollikeln die Keimzentren für die klonale Expansion von B-Zellen bilden. Ohne voll ausgereifte FDCs ist die PrP^{Sc}-Replikation in der Milz und die Neuroinvasion, d.h. die Verbreitung von Prionen ins Nervensystem, beeinträchtigt (Mabbott et al., 2000; Montrasio et al., 2000). Die Expression von PrP^C auf B-Lymphozyten hingegen spielt bei der Replikation und Vermehrung von Prionen keine direkte Rolle (Klein et al., 1998;

Montrasio et al., 2000), B-Zellen sind aber notwendig für die Reifung von FDCs und somit wichtiger Bestandteil der peripheren Prionpathogenese (Montrasio et al., 2000).

1.9 Prophylaktische und therapeutische Ansätze gegen Prionenerkrankungen

Aktuell ist eine Therapie gegen Prionenerkrankungen nicht verfügbar und auch prophylaktische Maßnahmen sind nur im begrenzten Umfang möglich. Basierend auf dem heutigen Erkenntnisstand sind allerdings mehrere therapeutische Strategien denkbar:

- 1) Verhinderung der Infektion an erster Stelle der Prionenreplikation
- 2) Verhinderung des Eintritts von PrP^{Sc} in das sekundär lymphatische System
- 3) Verhinderung der Infektion von FDCs
- 4) Verhinderung der Ausbreitung des infektiösen Agens im Nervensystem
- 5) Verhinderung des neuronalen Zelltods

Auf molekularer Ebene kann dies durch verschiedene Ansätze erreicht werden:

- 1) Inhibierung der PrP^C-Expression
- 2) Verhinderung der Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc}
- 3) Vermehrter Abbau (sog. „Clearance“) von PrP^{Sc}
- 4) Inhibierung von potentiell toxischen Mediatoren, die durch die Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} aktiviert werden

Eine Möglichkeit auf molekularer Ebene in die Pathogenese von Prionenerkrankungen regulierend einzugreifen, ist die Entwicklung von Impfstoffen. Ein wichtiges Kriterium von TSE ist das komplette Fehlen einer spezifischen Immunantwort gegen das Prion-Protein in den infizierten Organismen. Zusätzlich ist bis heute kein PrP-spezifischer Antikörper in der Lage zwischen der zellulären und der pathogenen Form zu unterscheiden.

Ziel der Arbeit

1) Aktive Immunisierungsstrategien gegen Prionenerkrankungen

In der Literatur finden sich vielfältige Hinweise darauf, dass gegen die zelluläre Form des Prion-Proteins gerichtete Antikörper einen Einfluss auf den Verlauf von Prionenerkrankungen haben können. So wurde beispielsweise in Mausstudien gezeigt, dass nach passiver Immunisierung mit Antikörpern, die gegen die zelluläre Form des Prion-Proteins gerichtet sind, Mäuse vor einer Infektion mit Prionen geschützt sind (White et al., 2003). Ebenso zeigten gentechnisch veränderte Mäuse, die spontan Antikörper gegen die zelluläre Form des Prion-Proteins bilden, einen verzögerten Verlauf von Prionenerkrankungen. Diese transgenen Mäuse exprimieren gleichzeitig das zelluläre Prion-Protein und Antikörper, die gegen das Prion-Protein gerichtet sind (Heppner et al., 2001). Die Entwicklung von aktiven Immunisierungsstrategien für die Induktion einer Anti-PrP^C Immunantwort wird allerdings durch das Phänomen der Selbsttoleranz erschwert. Diese Eigenschaft soll sicherstellen, dass keine Immunität gegen Selbststrukturen induziert wird. Auch in der Zukunft wird es eine große Herausforderung sein, therapeutische oder schützende Antikörperantworten gegen Selbstantigene zu induzieren, ohne selbstzerstörerische Immunität zu verursachen. Ein besseres Verständnis der Prozesse, die bei der Induktion von selbstreaktiven Immunantworten wie beispielsweise gegen das Prion-Protein von Bedeutung sind, werden auch bei der Entwicklung neuer Impfstoffe gegen andere Krankheiten, wie zum Beispiel gegen die Alzheimer Erkrankung oder gegen Tumore, eine wichtige Rolle spielen.

Das Ziel dieser Arbeit war es mit verschiedenen Immunisierungsprotokollen eine humorale und zelluläre Immunantwort gegen das Prion-Protein zu erreichen. Dafür wurden Mäuse mit dem rekombinanten Prion-Protein (rek.PrP) und einem Fusionskonstrukt aus rek.PrP und einem T-Helferepitop (PrP-P30) immunisiert. Um die Möglichkeit zu erhöhen, die immunologischen Toleranz gegenüber dem „Selbstprotein“ PrP^C zu umgehen, wurde für die Immunisierungen ein transgenes Mausmodell verwendet. Diese Tiere exprimieren das Hamster-Prion-Protein nur in Neuronen des Nervensystems (*NSEHa-Prnp^{0/0}*). Durch die Verwendung von murinem PrP als Vakzine gegen endogen exprimiertem Hamster-PrP sollte die Immunogenität der verwendeten Proteine zusätzlich erhöht werden, um so die Induktion von Anti-PrP^C-spezifischen Antikörpern zu erreichen. Diese induzierten Anti-PrP^C-spezifischen Antikörper wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, die Prionenreplikation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu inhibieren und somit mögliche Unterschiede zwischen den verwendeten Immunisierungsproteinen aufzuzeigen.

Zusätzlich zur Untersuchung der humoralen Immunantwort wurde in einem weiteren Teil der Arbeit potentielle Unterschiede der Vakzinierungsproteine auf die Induktion einer zellulären Immunantwort, das heißt auf Ebene der T-Lymphozyten, untersucht.

2) Untersuchung zur Prionen-induzierten Neurodegeneration

Die Pathologie von neurodegenerativen Erkrankungen ist charakterisiert durch ein massives Absterben von Neuronen im Gehirn. Die diesem Zelltod zugrundeliegenden Mechanismen und die Beteiligung von apoptotischen Signalwegen an diesem Prozess sind noch weitgehend unklar und werden kontrovers diskutiert. Es gibt Hinweise darauf, dass apoptotische Vorgänge sowohl in Creutzfeldt-Jakob Patienten, als auch in prioneninfizierten Hamstern, Mäusen und Schafen eine wichtige Rolle spielen. Die Proteine BAX und BCL-2 sind wichtige Vertreter der Pro- und Anti-apoptotischen Proteine, von denen schon bekannt ist, dass sie wichtige Funktionen in diversen neurologischen Erkrankungen einnehmen. Verschiedenste Arbeiten zeigen, dass BAX und BCL-2 auch wichtige Mediatoren bei der Induktion von Neurotoxizität durch Prionen sein könnten. Um die Funktion einer erniedrigten bzw. erhöhten Apoptoserate auf die Entwicklung der Pathologie nach einer Prioneninfektion zu untersuchen, wurden *BAX*^{-/-} bzw. *BCL-2*^{-/-} neuronales Gewebe mit Prionen inokuliert. Die dieser Methode zugrunde liegende Transplantationstechnik von embryonalem, neuroektodermalem Gewebe wurde schon häufiger bei entwicklungsbiologischen Fragestellungen verwendet. Diese Technik erlaubt die Untersuchung von Gewebe eines Donors in einem Zeitraum, welche seine natürliche Lebenserwartung weit überschritten hätte. Die Transplantation von BAX-bzw. BCL-2 defizientem Neuroektoderm und die anschließende Infektion mit Prionen sollte Hinweise auf die Funktion dieser beiden Proteine bei der Entwicklung der Prionen-induzierten Neurotoxizität geben. Nach definierten Zeiträumen sollten die Gewebe histologisch auf typische Charakteristika der Prionenpathologie untersucht werden, um potentielle Unterschiede zur wildtypischen Situation aufzudecken.

2 MATERIAL**2.1 Geräte**

Autoklav	Münchner Medizin
Bakterienkulturschüttler	Münchner Medizin
Blot Filterpapier	Schleicher & Schuell
Blottingkammern	BioRad®
Digitale Kamera	Diagnostic Instruments
Eismaschine	Scotsman
Elektrophoresekammern	BioRad®
FACS	FACS Calibur, Becton-Dickinson
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Leica
Gefrierschränke	Bosch electronic
Harvester	Perkin Elmer
Inkubatoren	Heraeus
Kapillarsequenzierer	Perkin Elmer ABI Prism 310, ABI Prism 3100, PE Applied Biosystems
Küvetten	Eppendorf
Laborwaage	Sartorius
Magnetrührer	Ikamag® RH
Mikrotom	Leica
Mikrowellenherd	Severin

Neubauer Zählkammer	Marienfeld
PVDF Membran	Roth
pH-Meter	Denver Instrument
Pipetten	Gilson, Eppendorf
Pipettierhilfe	Gilson
Plastikmaterial	Costar, Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc, Roth
Röntgenfilme	Amersham Biosciences
Scintillator	Perkin Elmer
Sonifier (Ultraschall)	Branson
Spektralphotometer	BioRad®
Sterilbank	Nuaire™
Thermocycler	Eppendorf
UV-Handlampe	Bachofer
UV-Leuchttisch/Videodrucker	MWG und Mitsubishi
Vortexer	Heidolph
Wasserbäder	GFL
Wippe	Heidolph
Zentrifugen	Kendro, Eppendorf, Hettich, Sorvall

2.2 Chemikalien

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Applichem und Merck, Darmstadt; Sigma, Deisenhofen; Carl Roth GmbH, Karlsruhe. Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße u.ä. wurden bei der Firma Hartenstein Laborbedarf, Würzburg bestellt. Bei Materialien für die Zellkultur handelte es sich um Produkte der Firma Nunc GmbH.

Enzyme für die Klonierungen wurden von den Firmen MWG-Biotech AG, Ebersberg, MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot und Invitrogen GmbH, Karlsruhe bezogen.

2.3 Kits

ABI Prism Big Dye Kit	PCR Sequenzierung	PE Applied Biosystems
ECL Westernblot Detection Kit	Immunoblot Entwicklung	Perbo Science
Gelextraktionskit	Gelextraktion	Qiagen
Plasmid prep Kit	Plasmidpräparation	Qiagen
Substrat AEC	Entwicklung der Schnitte	DCS
DNeasy Blood & Tissue Kit	DNA-Isolierung Mauschwänzen	aus Qiagen
<i>In situ</i> cell death Kit	TUNEL-Färbung	Roche

2.4 Größen-und Längenstandards

1kb DNA Ladder	MBI-Fermentas
100bp DNA Ladder	MBI-Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI-Fermentas

2.5 Zelllinien

HEK 293T	Humane, embryonale Nierenzelllinie; exprimiert das SV40 T-Antigen (Graham et al., 1977)
N2a	Neuroblastomzelllinie der Maus. Die Zellen stammen von einem spontanen Tumor in A/J-Mäusen (PrP _{a/a} -Stamm) ab (Olmsted et al., 1970). Die Zelllinie wird in Opti-MEM kultiviert (Zusammensetzung: 500 ml Opti-MEM Glutamax (Gibco, Karlsruhe), 50 ml fötales Kälberserum (PAA, Marburg))
ScN2a	N2a-Zelllinie infiziert mit Scrapie (Butler et al., 1988)

2.6 Puffer und Medien

Puffer/Medium	
Anästhetikum (Ketamin/Rompun)	1ml Ketamin 10% 0,25 ml Rompun 2% 5 ml 0,9% NaCl (steril)
Blotting-Puffer (1x)	0,75% SDS (w/v) 0,25M Tris 2M Glycin 20% Methanol (v/v)
5xLB Medium	100g LB Broth Base in 1l ddH ₂ O
LB Agar	20g LB Agar in 1l ddH ₂ O
Nach dem Autoklavieren Medium auf ca. 45°C abkühlen lassen und das entsprechende Antibiotika in Endkonzentration 100ug/ml zugeben. Das Medium wird in Bakterienkulturplatten gegossen und für ca. 2h bei RT stehen gelassen. Die Platten werden bei 4°C gelagert	
MEM	10% FCS (Biochrom AG)
Minimal Essential Medium, Gibco	120mg/l Penicillin/Streptomycin
DMEM	10% FCS Biochrom AG
(Dulbeccos Modified Eagle Medium, Gibco)	120mg/l Penicillin/Steptomycin
RPMI (Gibco)	RPMI 1640 + 10% FCS
Lysispuffer	50mM Tris-Hcl, pH 7.5 150mM NaCl 1% NP40

2. MATERIAL

	0.1% Sodium Deoxycholate
2xHBS	50mM Hepes, pH 7.05 10mM KCl 12mM Dextrose 280mM NaCl 1.5ml Na ₂ HPO ₄
3 Aliquots herstellen mit pH 7.0, 7.05 und 7.1 und 0,2µm steril filtrieren, Effizienz testen, bei -20°C lagern	
2M CaCl ₂	CaCl ₂ (Sigma, cell culture grade) 2M 0,22µm steril filtrieren, lagern bei -20°C
Natriumbutyrat	PBS mit 500mM Natriumbutyrat
FACS Buffer	PBS 20% FCS 10mM EDTA pH 8.0 0,1% Natriumazid
PBS	137mM NaCl 2,7mM KCl 4,3mM Na ₂ PO ₄ 1,5mM CaCl ₂ 1mM MgCl ₂
50x TAE	2 M Tris pH 8,0 5,7% (v/v) Konz. Essigsäure 0,05 M EDTA-Na ₂ pH 8,0
6x DNA Probenpuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol 30% Glycerin
3 M Natriumacetat, pH 5,2	3 M Natriumacetat pH mit konz. Essigsäure einstellen

2.7 Antikörper

Antikörper	Spezies	Isotyp	Konjugat	Hersteller
α-mouse-IgG1	Kaninchen	/	HRP	Zymed
α-mouse-IgG2a	Kaninchen	/	HRP	Zymed
α-rabbit-IgG (H+L)	Ziege	/	HRP	Zymed
α-mouse-IgG (H+L)	Ziege	/	FITC	Dianova
α-mouse-IgM	Ziege	/	HRP	Zymed
α-mouse-IgG (H+L)	Esel	/	HRP	Zymed
α-PrP (SA2124)	Kaninchen	pAk	/	AG Klein
α-PrP (6H4)	Maus	IgG1	/	Prionics
α-PrP (3F4)	Maus	IgG2a	/	Chemicon
α-mouse-Caspase-3	Kaninchen	IgG	/	R&D Systems

α -mouse-CD4	Ratte	IgG2a	APC	BD Pharmingen™
α -mouse -CD8a	Ratte	IgG2a	PerCP	BD Pharmingen™
α -CD40	Maus	/	PE	BD Pharmingen™
α -CD197 (CCR7)	Maus	/	Biotin	BD Pharmingen™
β 7.2	Maus	/	Biotin	BD Pharmingen™
GFAP	Kaninchen	pAk	/	DAKO
α -NeuN	Maus	IgG1	/	Chemicon

2.8 Scrapie Erregerstämme

2.8.1 Scrapie Erregerstamm Rocky-Mountain –Laboratory (RML)

Für die Inokulationen wurde der Scrapie-Erregerstamm RML verwendet. Dieser Stamm ist ein Maus-adaptiertes Scrapie-Isolat (Chandler, 1961), der in CD1 Mäusen passagiert wurde und dessen Inkubationszeit, die Histopathologie und das PrP^{Sc}-Läsionsprofil bekannt sind. Für die Inokulationen wurden 10% Gehirnhomogenate in PBS + 5% BSA von mit RML-infizierten Tieren hergestellt.

2.8.2 Hamster-Scrapie-Erregerstamm (Sc237)

Hamster-adaptierter Scrapie-Prion-Impfstoff, genannt Sc237. Dieser Impfstoff ist ähnlich dem Hamster-Scrapie Stamm 263K.

2.9 Primer und Sequenzen

Name	Sequenz 5' → 3'
P3	ATT CGC AGC GCA TCG CCT TCT ATC GCC
P10	GTA CCC ATA ATC AGT GGA ACA AGC CCA GC
P3'NC	CCC TCC CCC AGC CTA GAC CAC GA
Ha3F4	CCA ACA TGA AGC ACA TG CCG GCG C
MoHa217	CCT GGG ACT CCT TCT GGT ACT GGG TG
BCL-2 rp1	GGT AGC GAC GAG AGA AGT CAT C
BCL-2 rp2	CAT TCA GGC TGC GCA ACT GTT G
BCL-2 fp1	CAC CAG AAT CAA GTG TTC GGT G
BAXIN5R	GTT GAC CAG AGT GGC GTA GG

BAXEX5F	GAG CTG ATC AGA ACC ATC ATG
NeoR/BAX	CCG CTT CCA TTG CTC AGC GG
HaPrP Bam for	ATT GGA TCC ATG GCG AAC CTT AGC TAC TGG CTG TG G
HaPrP Mfe rev	ATA CAA TTG CCT CAT CCC ACC ATC AGG AAG ATG AGA AAGG
BS_MCS_Not	G TGG CGG CCG CTC TAG AAC TAG TGG
SAB_PrP_Mfe rev	TAG CCT ATG GGG GAC ACA GAG AAG C
CpGs-1826	TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT
Die DNA-Oligonukleotide wurden phosphothioatmodifiziert von MWG Ebersberg bezogen und für die Immunisierungen in ddH ₂ O gelöst.	
P30 T_H-Epitop	Aminosäuresequenz FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE
rekombinantes Maus-PrP (23-231)	zur Verfügung gestellt von Thorsten Lührs (Zahn et al., 1997)
rekombinantes Hamster-PrP	alicon AG, Schweiz

2.10 Mauslinien

2.10.1 *Prnp*^{0/0} (Prion-Protein-defiziente Mäuse)

Es wurden so genannte Zürich I- knockout Tiere verwendet. Bei diesem Stamm wurden die Codons 3 bis 188 der für PrP-kodierenden Sequenz durch ein Neomycinresistenzgen ersetzt (Abb. 9).

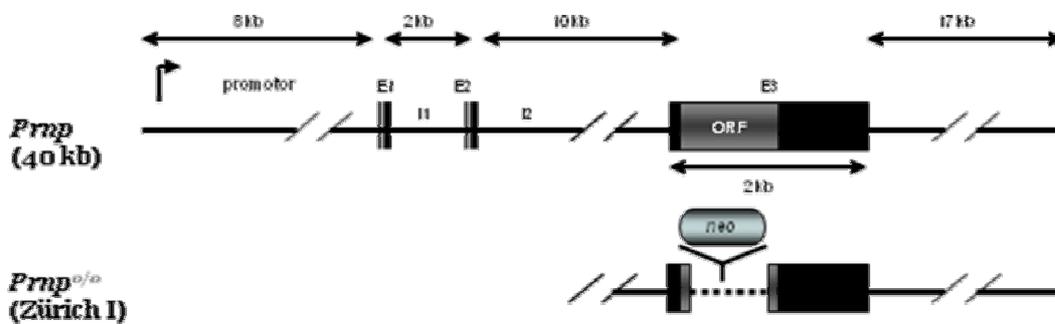


Abbildung 9. Struktur des wildtypischen PrP-Gens (*Prnp*) und des PrP-Knockout-Gens (*Prnp*^{0/0}). Das PrP-Gen besteht aus drei Exons (E1-E3) und zwei Introns (I1 und I2) wobei das Exon 3 die codierende Sequenz für das Prion-Protein enthält. Für die Herstellung der Zürich 1-Knockout-Maus wurden Codon 3 bis 188 des offenen Leserahmens von PrP durch eine Neomycin-Kassette ersetzt (neo).

Diese Tiere exprimieren kein Prion-Protein und sind gegenüber Infektion mit Prionen resistent. Die Generierung dieser Linie erfolgte auf dem gemischten *C57BL/6 129/Sv*-Wildtyp Hintergrund (Bueller et al., 1992).

2.10.2 Inzuchtstamm *C57BL/6* (WT)

Der wildtypische Inzuchtstamm *C57BL/6* wurde von C.C. Little im Jahr 1921 aus einer Zucht von Abby Lathrop's Bestand weiterentwickelt. Diese Tiere exprimieren die zelluläre Form des Prion-Proteins (Bueller et al., 1992).

2.10.3 *NSEHa-Prnp*^{0/0}

Diese Tiere (Tg52NSE) besitzen das Hamster-Prion-Protein (*HaPrP*)-Gen unter der Kontrolle des neuronenspezifischen Enolase-Promotors (NSE) auf dem PrP-Knockout Hintergrund. In diesen Mäusen ist die Expression des Hamster Prion-Proteins auf das Nervensystem beschränkt. Die Tiere sind mit dem Hamster-Scrapie-Stamm 263K sowohl intrazerebral als auch intraperitoneal infizierbar (Race et al., 1995).

2.10.4 *Tg(SHaPrP)3922-Prnp*^{0/0}

Die Mäuse exprimieren das Syrian Hamster Prion-Protein unter der Kontrolle des Hamster Prion-Promotors auf dem *Prnp*^{0/0}-Hintergrund (Scott et al., 1989).

2.10.5 *BAX*^{-/-} (BAX-Protein-defiziente Mäuse)

In diesen Tieren wurde durch homologe Rekombination Exon 2 bis Exon 5 des BAX-Gens durch ein Neomycinresistenzgen ersetzt. Heterozygote Tiere sind lebensfähig und fertil wobei homozygote Tiere eine Hyperplasie von lymphoidalen Gewebe aufzeigen und männliche Tiere nicht zeugungsfähig sind (Knudson et al., 1995).

2.10.6 *BCL-2*^{-/-} (BCL-2-Protein-defiziente Mäuse)

In den Mäusen wurde durch homologe Rekombination das Exon 3 des BCL-2-Gens durch ein Neomycinresistenzgen ersetzt. Homozygote Knockout-Tiere sind embryonal lebensfähig, zeigen aber ein verzögertes Wachstum und frühe postnatale Sterblichkeit (Veis et al., 1993).

3 METHODEN

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Zunächst wurde eine 1ml Vorkultur von E.coli DH5 α über Nacht in LB-Medium angesetzt. Diese Vorkultur wurde 100fach in 500ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer Zelldichte von 0,6-0,9 OD (Optische Dichte) wachsen gelassen. Die Zellen wurden nach Erreichen dieser Zelldichte für 5min auf Eis inkubiert, anschließend durch Zentrifugation (2500xg, 5min, 4°C) pelettiert und das Zellsediment in 20ml eiskalter 50mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis für 30min wurden die Zellen erneut zentrifugiert (2500rpm, 5min, 4°C) und anschließend in 5ml eiskalter 50mM CaCl₂-Lösung und 1 ml 100% Glycerol resuspendiert. Die nun kompetenten Bakterienzellen wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.2 Transformation von Bakterien

Nach Auftauen der kompetenten Zellen (100 μ l) auf Eis wurden 1 bis 100ng der zu transformierenden DNA bzw. 10 μ l eines Ligationsansatzes (s.u.) zu der Zellsuspension gegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Danach erfolgten für exakt 45sec ein Hitzeschock bei 42°C und eine erneute Inkubation für 2min auf Eis. Nach Zugabe von 900 μ l mit Antibiotika versetztem LB-Medium wurden die Bakterien für 1h bei 37°C und 350rpm inkubiert und 50 - 100 μ l der Suspension direkt auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen.

3.1.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA wurde nach dem Protokoll von QIAGEN durchgeführt. Die Reinigung basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) und beinhaltet die spezifische Bindung von Nukleinsäuren an das Anionenaustauscherharz des Herstellers.

Es wurden 25ml LB-Medium mit einem Bakterienklon angeimpft und über Nacht im Bakterieninkubator bei 37°C und 300rpm wachsen gelassen. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Um die Konzentration der DNA zu bestimmen, wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 und 280nm in einem Spektralphotometer der Firma BioRad gemessen. Die Konzentration der DNA (Sambrook et al., 1989) berechnete sich hierbei aus der Formel

$$[\mu\text{g} / \text{ml}]dsDNA = \frac{50 \times \text{Verdünnung} \times O.D._{260\text{nm}}}{1000}$$

Der Quotient zwischen OD₂₆₀ und OD₂₈₀ sollte in etwa zwischen 1 und 2 betragen (Schichtdicke der Küvette d = 1 cm), um eine Proteinkontaminationen der DNA auszuschließen.

3.1.4 Isolierung von DNA aus Schwanzbiopsaten von Mäusen

Den Mäusen wurden im Alter von ca. 3 Wochen mit einer Schere ca. 0,5-1cm der Schwanzspitze abgeschnitten und diese bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Die chromosomale DNA aus Mausschwanzbiopsaten wurde mit Hilfe des „DNeasy Blood & Tissue Kit“ (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers isoliert und in 200µl Endvolumen aufgenommen.

3.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, für Klonierungsreaktionen und für die Genotypisierung transgener Mäuse wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988).

3.1.5.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen

Standard-PCR-Protokoll für Klonierungen eines Fragmentes

100-200ng Plasmid-DNA
5µl 5 x GoTaq[®] Flexi Buffer [Promega]
5µl dNTPs (1,25mM)
1,5µl MgCl₂ (25mM)
1,3µl DMSO
0,5µl Primer 1 (50pmol/µl)
0,5µl Primer 2 (50pmol/µl)
0,2µl Pfu-DNA-Polymerase (5U/µl) [Promega]
ddH₂O auf 25µl

Standard Amplifikationsbedingungen

(1) initiale Denaturierung 94°C, 5 min
(2) Denaturierung 95°C, 1min
(3) Primeranlagerung 60°C, 1min
(4) Polymerisation 72°C, 1min pro kb Amplifikat
(5) finale Polymerisation 72°C, 5min
Anzahl der Zyklen (Wdh. der Schritte 2-4): 35

3.1.5.2 Genotypisierung transgener Mäuse

Standard-PCR-Protokoll für die Genotypisierungen

1µl DNA (~500ng genomische DNA)
5µl 5 x GoTaq[®] Flexi Buffer [Promega]
5µl dNTPs (1,25mM)
1,5µl MgCl₂ (25mM)
1,3µl DMSO
0,5µl Primer 1 (50pmol/µl)
0,5µl Primer 2 (50pmol/µl)
(0,5µl Primer 3 (50pmol/µl))
0,2µl GoTaq[®] DNA-Polymerase (5U/µl) [Promega]
10µl (9,5µl) ddH₂O

Bedingungen für die Amplifikation

Genotyp	Primer	PCR-Bedingung
BAX	BAXIN5R BAXEx5F NeoR/BAX	(1) initiale Denaturierung 94°C, 5 min (2) Denaturierung 95°C, 1min (3) Primeranlagerung 62°C, 1min (4) Polymerisation 72°C, 1min 30sec (5) finale Polymerisation 72°C, 7min Anzahl der Zyklen (Wdh. der Schritte 2-4):31
BCL-2	BCL-2 rp1 BCL-2 rp2 BCL-2 fp1	(1) initiale Denaturierung 94°C, 3 min (2) Denaturierung 94°C, 45sec (3) Primeranlagerung 58°C, 45sec (4) Polymerisation 72°C, 2min (5) finale Polymerisation 70°C, 10min Anzahl der Zyklen (Wdh. der Schritte 2-4):36
Prnp^{o/o}	P3 P10 P3'NC	(1) initiale Denaturierung 95°C, 5 min (2) Denaturierung 95°C, 45sec (3) Primeranlagerung 62°C, 45sec (4) Polymerisation 72°C, 1min (5) finale Polymerisation 72°C, 5min Anzahl der Zyklen (Wdh. der Schritte 2-4):35
NSEHa	Ha3F4 MoHa217	(1) initiale Denaturierung 95°C, 5 min (2) Denaturierung 95°C, 45sec (3) Primeranlagerung 64°C, 45sec (4) Polymerisation 72°C, 1min 30sec (5) finale Polymerisation 72°C, 5min Anzahl der Zyklen (Wdh. der Schritte 2-4):35

3.1.6 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von Plasmiden und mit PCR erzeugten DNA-Fragmenten wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen verwendet, die an spezifischen, meist 4–8 bp langen Erkennungssequenzen schneiden. Die Kombination von Puffern und Enzymen erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Fermentas oder NEB).

Standard-Reaktionsansatz

1-2µg Plasmid-DNA oder 20µl PCR-Amplifikat
2µl 10 x Reaktionspuffer
2µl 10 x BSA
5-20U Restriktionsendonuklease(n)
ddH₂O auf 20µl

Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte, soweit vom Hersteller für bestimmte Enzyme nicht anders angegeben, für 1,5-6 Stunden bei 37°C.

3.1.7 Elektrophoretische Auftrennung der DNA

(Sambrook et al., 1989)

Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA wurden Agarosegele unterschiedlicher Prozenze (0,8-1,5%) hergestellt. Die Agarose wurde hierbei in TAE-Lösung gelöst, in der Mikrowelle aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 50°C in die Gelschlitten gegossen. Das auspolymerisierte Gel wurde in einer Laufapparatur (BioRad) mit TAE-gefüllter Laufkammer eingesetzt, die DNA-Proben aufgetragen und abhängig vom Agarosegehalt des Gels bei 80-180V elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das Gel mit Ethidiumbromid (1µg/ml) gefärbt und die DNA-Fragmente mit UV-Licht detektiert.

3.1.8 Reinigung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA

Zur Reinigung von PCR-Produkten, Plasmid-DNA und Ligationsreaktionen sowie zur Umpufferung von Restriktionsansätzen wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll verwendet.

3.1.9 Ligation

Die Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen verdaut (s.o.) und mit Hilfe des „Gel Extraction Kit“ von Qiagen aus Agarosegelen extrahiert. Die Ligation von Insert-DNA erfolgte unter Einsatz der T4-DNA-Ligase (Fermentas), welche die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxylende und dem 5'-Phosphatende von DNA-Molekülen katalysiert.

Standard 20µl Reaktionsansatz

50-400ng Vektor DNA
Verhältnis 1:1 bis 3:1 (Molaritäten) von Insert-DNA zu Vektor-DNA
2µl 10 x Buffer für T4-DNA-Ligase (Fermentas)
2-5U T4-DNA-Ligase (Fermentas)
ddH₂O auf 20µl

Die Reaktionen wurden 16°C bei RT über Nacht inkubiert und anschließend kompetente E.coli-Bakterien transformiert (s.o.).

3.1.10 Sequenzanalyse von DNA

Die Sequenzanalyse von DNA wurde nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode von Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Dabei wurden DNA-Fragmente mittels dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) synthetisiert und deren Länge durch den Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (ddNTPs) terminiert. Die Abfolge der fluoreszenzmarkierten, durch Kapillarelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente, wurden in einem Sequenzierautomat („ABI Prism™ Sequence-Analyzer“, Perkin-Elmer Applied Biosystems) durch einen Laser detektiert. Mittels eines Computerprogramms (Multiscan 100ES, Sony) wurde aus den erhaltenen Daten die DNA-Sequenz der Fragmente errechnet.

Standardprotokoll des BigDye Terminator Sequencing Kit

Reaktionsansatz:

2µl DNA (100-200ng Plasmid-DNA)
1µl BigDye Terminator Ready Reaction Mix (BDT)
1µl Primer (5pmol/µl)
1µl 2,5 x Sequenzierpuffer (200mM Tris-HCL, pH 9,0; 5mM MgCl₂)

Synthese der DNA:

- (1) initiale Denaturierung 95°C, 5min
- (2) Denaturierung 96°C, 30 sec
- (3) Primeranlagerung 50°C, 15sec
- (4) Polymerisation 60°C, 4min

Anzahl der Zyklen (Wdh. der Schritte 2-4): 25

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Passagieren und Kultivieren eukaryotischer Zelllinien

Die Kultivierung eukaryotischer Zelllinien erfolgte in geeignetem Medium (Optimem1, Glutamax 1 Medium + 10% inaktiviertes FCS (Biochrom)) bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Feuchtigkeit. Bei ca. 70%iger Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dafür wurden die Zellen nach dem Waschen mit PBS ca. 1min mit 5ml ATV-Lösung (Trypsin 0,5mg/ml) versetzt und das Trypsin wieder abgenommen. Die Platten wurden dann für 3min bei 37°C inkubiert und durch anschließende Zugabe von 10ml Medium die Zellen vom Flaschenboden abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden 1:10 verdünnt wieder in Zellkulturflaschen kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl mit der Zählkammer nach Neubauer

Die Anzahl der Zellen wurde mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. 15µl Zellsuspension wurde hierfür mit 15µl Trypanblau gemischt, um lebende von toten Zellen zu unterscheiden. Dieser Farbstoff dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol ein und färbt die Zellen tiefblau. Die Zellzahl aller vier Großquadrate wurde bestimmt und die Mittelwerte davon gebildet. Die endgültige Zellzahl pro ml Zellsuspension kann mit folgender Formel errechnet werden:

Mittelwert der Zellen aller vier Großquadrate x Verdünnungsfaktor x 10⁴ = Zellzahl pro ml

3.2.3 Transiente Transfektion von Eukaryotenzellen

Für eine transiente Genexpression in den Zellen wurde die Calciumphosphat-Transfektion von Plasmid-DNA verwendet. Hierfür wurden am Tag vor der Transfektion 10⁶ Zellen auf 10cm Kulturschalen ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Vor der Transfektion wurde das Medium noch einmal gewechselt und durch equilibriertes Medium (CO₂ gesättigt und vorgewärmt) ersetzt. Für die Transfektion wurden 15µg der entsprechenden Plasmid-DNA mit 50µl 2,5M CaCl₂ versetzt und mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 500µl gebracht. Dieses DNA-CaCl₂-Gemisch wurde langsam und tröpfchenweise zu 500µl 2 x HBS pipettiert und für 30min bei RT inkubiert. Das entstandene DNA-CaCl₂-Präzipitat wurde dann langsam auf die Zellen gegeben und für 8h bei 37°C inkubiert. Nach einem erneuten Mediumwechsel wurden die Zellen für 8h mit 10mM

Natriumbutyrat behandelt, um die Expressionsrate durch Stimulation des CMV-Promotors der eingefügten Plasmide zu erhöhen. Nach dieser Behandlung wurden die Zellen erneut mit frischem Medium versorgt.

3.2.4 Fluorescence activated cell sorting (FACS)

Bei der FACS-Analyse werden mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Proben bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen, wie z.B. die Expression von Oberflächen- bzw. intrazellulären Molekülen, auf Einzelzellebene analysiert.

Für die Analyse der Mausseren wurden die transfizierten Zellen (s.o.) zuerst mit 10ml PBS gewaschen, anschließend mit 5ml PBS/20mM EDTA für 2min bei 37°C inkubiert und gesammelt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen dann für 5min bei 1300rpm zentrifugiert und in einer Konzentration von 10^6 Zellen pro ml in FACS Buffer (10mM EDTA pH 8,0; 2% FCS; 0,1% Natriumazid in PBS) resuspendiert. Jeweils 10^5 Zellen wurden auf die FACS-Röhrchen verteilt, der Primäantikörper dazugegeben und für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 3ml FACS-Buffer gewaschen, indem sie abwechselnd bei 1300rpm für 5min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet gevortext wurde. Die einstündige Inkubation mit dem Zweitantikörper (FITC-gekoppelt) erfolgte bei 4°C in 100µl FACS Buffer in der Verdünnung 1:100, welcher direkt auf das Zellpellet gegeben wurde. Es folgten zwei Waschschrte und die Zugabe von 250µl FACS-Buffer für die Messung im FACS-Gerät.

3.2.5 Herstellung von Zellysaten

Die transfizierten Zellen wurden einmal in PBS gewaschen, gesammelt und 5min bei 1300rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 1ml PBS resuspendiert und nochmals für 5min bei 2000rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde 200µl Lysispuffer (50mM Tris-HCL, pH 7,5; 150mM NaCl; 0,5% Triton X; 0,5% Natriumdeoxychololat in PBS) auf das Pellet gegeben und für 5min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation für 1min bei 1000rpm wurde der Überstand gesammelt und bei -20°C gelagert.

3.2.6 Behandlung von ScN2a-Zellen mit Mausserum

Für die Untersuchung von Immunseren auf den Einfluss der Prionenreplikation *in vitro*, wurden mit Scrapie infizierte Zellen (ScN2a) mit den entsprechenden Seren behandelt.

Hierfür wurden 10^5 Zellen pro well (6well Platte) ausplattiert und über Nacht wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und 3-5 μ l des zu untersuchenden Mausserums dazugegeben. Die Zellen wurden anschließend für 5 Tage bei 37°C kultiviert und danach einer Zellyse unterzogen. Dafür wurde das Medium abgenommen und 65 μ l Lysispuffer (s.o.) direkt auf die Zellen gegeben. Die Platte wurde dann für 5min auf Eis inkubiert, die Zellen für 3min bei 5000rpm abzentrifugiert und die Proteinkonzentration des Überstandes mittels Bradford (s.u.) bestimmt und im Westernblot analysiert.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Gehirnhomogenaten

Für die Herstellung von 10% Gehirnhomogenaten wurde das entnommene Gehirn gewogen und die 10-fache Menge an Homogenisierungspuffer (0,5% Deoxycholat; 0,5 Igepal in PBS mit Proteaseinhibitor) zugegeben. Mit einer Spritze (18G-25G Kanülen) wurde das Gehirn soweit zerkleinert bis eine homogene Masse entstanden war. Der Proteingehalt des Homogenats wurde mit Hilfe des Bradfords bestimmt.

3.3.2 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.

3.3.3 Proteinase-K Verdau

Für die Unterscheidung der zellulären Form und der pathogenen Form des Prion-Proteins wurde üblicherweise ein Proteinase-K Verdau durchgeführt. Dabei wurden 100 μ g Gesamtprotein (aus Gehirnhomogenaten bzw. Zellysaten) mit 2 μ g Proteinase-K (Roche) versetzt und für 30min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von entsprechender Menge 5 x Westernblot Probenpuffer wurden die Proben vor der Analyse für 10min bei 95°C erhitzt.

3.3.4 SDS-PAGE Elektrophorese

Denaturierte Proteine wurden entsprechend ihres Molekulargewichtes über SDS-Gele aufgetrennt (Laemmli, 1970). Für die Elektrophorese wurden hierfür 12,5% Glycin-Gele der Firma Biozym verwendet und die Auftrennung für 1h bei 35mA im SDS-Probenpuffer (25mTris, 200mM Glycin, 0,1% SDS) durchgeführt.

3.3.5 Westernblot, Immunodetektion

Um Proteine spezifisch mit Antikörpern nachweisen zu können, wurden die Gele zunächst auf eine PVDF Membran, die vorher in Methanol aktiviert wurde (10min), geblottet (1,5 Std., 350mA). Danach wurde die Membran über Nacht mit 5% Milchpulver in TBST abgesättigt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte in 5% Milchpulver in TBST für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen für je 10 Minuten in TBST wurde der sekundäre Antikörper (Peroxidase-gekoppelt) für ebenfalls 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Entwicklung der Membran in ECL-Reagenz entsprechend den Herstellerangaben (Pierce, Rockford) wurde diese nochmals viermal für je 10 Minuten mit TBST gewaschen.

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die Bestimmung spezifischer Antikörper in den Seren immunisierter Tiere wurde der ELISA benutzt. Hierfür wurden 96-well-Flachbodenplatten mit jeweils 50ng rekombinantem Prion-Protein (Maus-oder Hamster-PrP) in 100ul PBS über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag mit 5% Milchpulver und 0,1% Tween bei 37°C für zwei Stunden abgesättigt. Die Immunsereen wurden in unterschiedlichen Verdünnungen in Assay Solution (PBS, 1% BSA, 01% Tween) auf die Platte aufgetragen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte sechsmal mit Waschpuffer (PBS + 0,1% Tween, 300µl/well) gewaschen und mit dem jeweiligen Detektionsantikörper (IgGesamt, HRP-gekoppelt) für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten sechs Waschschritte bevor TMB als Peroxidase-Substrat verwendet wurde. Die Farbreaktion wurde nach 10 Minuten mit 50µl 1M H₂SO₄ abgestoppt und die Farbintensität photometrisch bei 450nm bestimmt.

Für die Konkurrenzexperimente wurden die Seren vor Auftragen auf die Platte mit 50-100ng rekombinantem Maus-bzw. Hamster-Prion-Protein für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert

3.4.2 Präparation von Knochenmarkszellen

Für die Gewinnung von dendritischen Zellen wurden die Humera, Femora und Tibien der zu untersuchenden Mäuse freipräpariert und von Fettgewebe und Sehnen befreit. Die Knochen wurden für ca. 3 Minuten in 100% Ethanol desinfiziert und danach das Knochenmark mit einer Kanüle (10ml Spritze, 27G-Kanüle) mit Medium (RPMI 1640) herausgespült. Die erhaltenen Zellen wurden für 5 Minuten bei 1500rpm zentrifugiert (3×10^5 Zellen/well, 24well-Platte) und für acht Tage kultiviert, wobei das Medium jeweils an Tag drei und sechs gewechselt wurde

3.4.3 Proliferationsanalyse

Die Proliferation von Lymphozyten in kultivierten Zellen kann anhand einer CFSE-Färbung (carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester) gemessen werden. CFSE diffundiert passiv in die Zellen und ist nicht fluoreszent bis die Acetatgruppe von intrazellulären Esterasen geschnitten wird. Die dabei entstandene Succinimidylester-Gruppe reagiert mit intrazellulären Aminen und bildet damit fluoreszente Konjugate. Nicht konjugiertes Reagent und Nebenprodukte diffundieren passiv ins Medium und werden ausgewaschen. Die Färbung bleibt in den Zellen während der Zellteilung erhalten und wird an die Tochterzellen weitergegeben, wobei die Intensität der Färbung abnimmt. Durch Abnahme der CFSE-Färbung ist also die quantitative Bestimmung der Zellteilungsrate möglich.

Für diese Arbeit wurde die spezifische Proliferation der CD4- und CD8-positiven T-Zellen in Milz und Lymphknoten der immunisierten Tiere untersucht. Hierfür wurden die Milz und periphere Lymphknoten (s.u.) aus den Mäusen entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Zellen wurden mit $2,5 \mu\text{M}$ CFSE gefärbt und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. In Konzentrationen von 10^6 Zellen in einem Volumen von 2ml pro well wurden die Zellen in Kultur genommen und mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ Protein (Maus-PrP, Hamster-PrP oder Ovalbumin) restimuliert. Jeweils an Tag 4, 8 und 11 wurden die Zellen im FACS auf Proliferation von CD8- und CD4-positiven Lymphozyten analysiert.

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Betäubung der Mäuse

Für die Immunisierungsexperimente, die Inokulationen und die retroorbitale Blutentnahme erfolgte die Betäubung der Tiere mittels Inhalationsnarkose. Die Narkose wurde mit 4-5 Vol% Isofluran eingeleitet, welche dann für die Erhaltung auf 3 Vol % Isofluran + Sauerstoff (1 l/min) erniedrigt wurde.

Für länger andauernde Anästhesien wurde den Tieren eine Kombination von Ketamin (75mg/kg Körpergewicht, Sigma, München) und Xylazinhydrochlorid (Rompun, 75mg/kg Körpergewicht, Sigma, München) in PBS intraperitoneal (100µl) verabreicht. Ketamin wirkte hierbei vor allem als Narkotikum, und Rompun, das auch anästhetische Wirkung besitzt, als Muskelrelaxanz.

3.5.2 Injektionen von rekombinantem Prion-Protein

Die Proteinimmunisierungen erfolgten subkutan mit jeweils 50µg Protein und 10µg CpGs-1826. Die verwendeten Proteine (PrP, PrP-P30 und Ova) wurden hierfür zuerst in 1%iger Essigsäure gelöst und die Proteinlösung mit 150mM KCL und 15mM NaOH auf einen pH von ca. 4,5 eingestellt. Für die Injektionen wurden die Mäuse kurzzeitig narkotisiert und das Protein-Adjuvanz-Gemisch in die Nackenhautfalte appliziert. Das Injektionsvolumen betrug 100µl.

3.5.3 Retroorbitale Blutentnahme und Serumgewinnung

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion des retrobulbären Venenplexus. Hierfür wurden Heparinbeschichtete Mikro-Haematokritröhrchen (Hartenstein) verwendet. Das Blut wurde direkt nach der Entnahme in Röhrchen (Mikrotainer, BD, USA) überführt und für 10 Minuten bei 8000rpm zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde bei -20°C gelagert.

3.5.4 Bioassay zur Bestimmung der Infektiösität

Die Inokulation zum Nachweis von Infektiösität erfolgte mit Herstellung von Gehirnhomogenaten (1%) der immunisierten und infizierten *NSEHa-Prmpo/o* Tiere, die anschließend intrazerebral in *PrmpTg(SHaPrP)³⁹²²*-Mäuse injiziert wurde.

3.5.5 Organentnahme und Herzpunktion

Die Versuchstiere wurden mittels zervikaler Dislokation unter Narkose getötet und in Rücken- oder Seitenlage fixiert. Der Brustkorb wurde geöffnet und die rechte Herzkammer mit einer Kanüle (26G, 1ml Spritze) angestochen und das Blut entnommen. Danach wurde die Bauchhöhle geöffnet, die Milz entnommen und anschließend das Gehirn heraus präpariert.

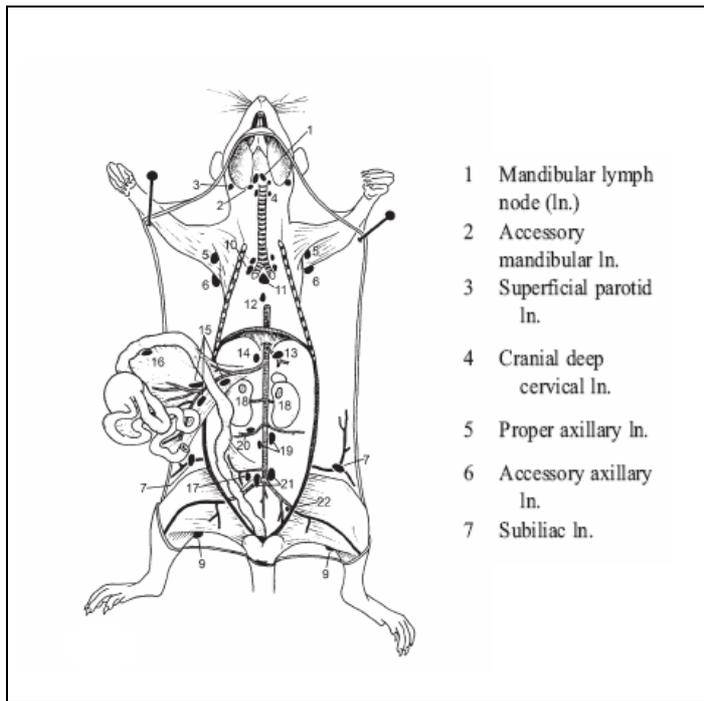


Abbildung 10. Schematische Zeichnung der Lage verschiedener Lymphknoten in der Maus. Die peripheren Lymphknoten 1-7 wurden aus den Tieren heraus präpariert und für die Proliferationsanalyse von CD4- und CD8-positiven Zellen verwendet (Van den Broeck et al., 2006)

Für Genotypisierungen wurden etwa 0,5-1cm Schwanzgewebe abgetrennt und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Für die Proliferationsanalyse (s.o.) von CD4- und CD8-positiven Zellen wurden den Tieren verschiedenen Lymphknoten entnommen. Es handelte sich hierbei um die peripheren Lymphknoten des Kopf- und Nackenbereiches (Lymphknoten 1-7, Abb. 10 (Van den Broeck et al., 2006)).

3.5.6 Transplantation von neuroektodermalem Gewebe

Die Transplantation von neuroektodermalem Gewebe aus BCL-2 bzw. BAX-Spendertieren wurde nach Standardmethode durchgeführt (Isenmann et al., 1996). Nach Präparation des neuroektodermalem Gewebe aus Embryonen wurde das Transplantat mit einer 25G-Kanüle in einem Volumen von 30µl in das Gehirn von anästhesierten *Prnp^{0/0}*-Empfängertieren injiziert. Für die Operation wurde ein stereotaktischer Rahmen (Narishige, Tokio, Japan) verwendet,

um die Exakte Position des Transplantats zu gewährleisten. Das Transplantat wurde 2,5mm rechtsseitig zum Bregma und 3,5mm unter die Dura in das Caudoputamen bzw. Seitenventrikel gesetzt.

3.6 Immunhistochemische Methoden

3.6.1 Präparation von Organen zur histologischen Untersuchung

Das frisch entnommene Organ wurde abhängig von der Fragestellung fixiert oder eingefroren.

3.6.1.1 Einfrieren und Herstellung von Gefrierschnitten

Das Organ wurde mit ausreichender Menge Tissue-Tek bedeckt und sofort auf Trockeneis tiefgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden sie bei -20° bzw. bei -80°C gelagert.

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden Schnitte bei -20°C Objekttemperatur und mit einer Schnittdicke von 10µm im Kryostaten angefertigt. Die auf dem Objektträger aufgenommenen Schnitte wurden vor der Färbung bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

3.6.1.2 Fixieren und Herstellen von Paraffinschnitten

Die Organe wurden direkt nach der Entnahme in 4 % igem Formalin gelagert. Aus den paraffineingebetteten Präparaten wurden am Mikrotom 5 µm-dünne Schnitte angefertigt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Entparaffinierung erfolgte nach zweimal 10-minütiger Inkubation der Schnitte in Xylol mittels einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils zweimal 5 Minuten in 100%, 96% und 70% EtOH).

3.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Zur Färbung wurden die Paraffinschnitte nach der Entparaffinierung für 10min in die Hämalaunlösung gelegt und anschließend für 10min unter fließendem Wasser gespült. Es folgte die Färbung mit Eosin für ca. 5min. (abhängig von der erwünschten Farbtiefe). Zur Entwässerung wurden die Präparate zuerst kurz in 96% iges EtOH getaucht und anschließend kurz mit 100% EtOH gespült. Vor dem Eindecken (in Entellan) wurden die Schnitte nochmals für 20min in Xylol getaucht.

3.6.3 Glial fibrillary acidic protein-Färbung („Saures Gliafaserprotein“, GFAP)

Für diese Färbung wurden die Schnitte zuerst entparaffiniert (s.o.). Um die Bindungsstellen für das Protein (GFAP) freizusetzen, wurden die Schnitte mit Citratpuffer behandelt und für 5 Minuten in der Mikrowelle gekocht. Danach wurden die Schnitte in TBS für 10 Minuten abgekühlt und anschließend mit ddH₂O gewaschen. Danach wurde die endogene Peroxidase mit H₂O₂ inaktiviert und die Schnitte mit Ziegenserum blockiert. 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 gefärbt.

3.6.4 MAP-2 und Synaptophysin-Färbung

Beide Färbungen erfolgten im Institut für Pathologie, Universität Würzburg automatisiert und unter Standardbedingungen.

3.6.5 Paraffin-Embedded-Tissue (PET) Blot

Der Nachweis von PrP^{Sc} erfolgte mittels der PET-Blot Technik anhand bekannter Protokolle (Schulz-Schaeffer et al., 2000). Gewebeschnitte (5-6µm) wurden auf eine Nitrozellulosemembran aufgezogen und über Nacht trocknen gelassen. Am nächsten Tag wurden sie nach Standardprotokoll entparaffiniert und entwässert, wobei im letzten Entwässerungsschritt zusätzlich das nichtionische Tensid Polysorbate 20 (Tween 20) in einer Endkonzentration von 0,1% in ddH₂O zugefügt wurde. Nach einem 1stündigen Waschschrift in TBST wurden die Proben für 8 Stunden bei 55°C mit Proteinase-K behandelt (150µg/ml), anschließend in 3M Guanidine für 10 Minuten denaturiert und in 5% Milchpulver für 1 Stunde blockiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (1:500, SAF84, in 1% Milchpulver) erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die Detektion am nächsten Tag wurde mit einem, mit alkalischer Phosphatase-gekoppelten Zweitantikörper (Donkey anti-mouse IgG AP), in der Verdünnung 1:1000 durchgeführt und nach Anweisung der Hersteller (BCIP/NBT, Sigma) entwickelt.

3.6.6 Histoblot

Wie die PET-Blot Technik für Paraffinschnitte eignet sich der Histoblot für den Nachweis von PrP^{Sc} auf Gefrierschnitten (Taraboulos et al., 1992). Die Schnitte wurden auf eine Nitrozellulosemembran aufgenommen und vor dem Trocknen (mind. 2 Stunden, RT) kurz in Lysispuffer getaucht. Nach einem Waschschriff (TBST, 1 Stunde) erfolgte die Proteolyse mittels Proteinase-K (100µg/ml) für 4 Stunden bei 37°C. Anschließend wurde dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen und die Proben für 10 Minuten in Denaturierungslösung getaucht. Vor dem Blocken in 5% Milchpulver (mind. 1 Stunde) wurden die Schnitte nochmals für dreimal 10 Minuten in TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (3F4, 1:1000, Chemicon) erfolgte bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Proben zuerst dreimal für je 10 Minuten in TBST gewaschen, 5 Minuten in 1% Milchpulver geblockt und dann für 1 Stunde mit dem Sekundärantikörper (Donkey anti Mouse IgG-AP, 1:1000, in 1% Milchpulver) inkubiert und nochmals dreimal für 10 Minuten in TBST gewaschen. Die Entwicklung erfolgt nach Anweisung des Herstellers mit BCIP/NBT (Sigma). Zum Schluss wurden die Zellulosemembranen kurz in ddH₂O getaucht, getrocknet und zur Analyse auf einen Objektträger geklebt.

3.6.7 TUNEL-Färbung („TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling“)

Der Nachweis von apoptotischen Zellen erfolgte mittels des „In situ cell death Kit“ (Roche) nach Anweisung des Herstellers. Hierfür wurden die Paraffinschnitte nach Standardmethoden entparaffiniert und anschließend in mit 20mM Citratpuffer (pH 6,0) für 5 Minuten in der Mikrowelle aufgeköcht. Zum Abkühlen wurden die Proben für 10 Minuten in ddH₂O gestellt. Das Blocken erfolgte für 30 Minuten in 0,1M Tris-HCL (pH 7,5) in 3% BSA und 20% FCS im Gesamtvolumen von 150µl pro Objektträger. Nach Inkubation des Primärantikörper (TUNEL Reaction Mix, Roche) für eine Stunde bei 37°C im Dunkeln wurden die Proben 2 Mal in PBS gewaschen und dann in einem speziellen Fluoreszenz-Medium (fluorescence mounting medium, Dako) eingedeckt.

3.6.8 Aktivierte-Caspase-3 Färbung

Die Färbung erfolgt auf Gefrierschnitten. Hierzu wurden die Proben kurz bei Raumtemperatur auftauen gelassen und danach für 5 Minuten in 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach drei Waschschriffen für je 10min in PBS wurden die endogenen Peroxidasen mit 0,6% iger H₂O₂-

Lösung für 15min inaktiviert und danach nochmals je dreimal für 10min in PBS gewaschen. Vor der Inkubation des ersten Antikörpers (0,2µg/ml aktivierte Caspase-3, 4°C, Über Nacht, R&D Systems) wurden die Schnitte für 30min in 5% BSA/PBS geblockt. Danach folgte noch einmal ein Waschschrift in PBS für 10min und die Inkubation des Zweitantikörpers (Goat anti-rabbit IgG (H+L) 1:200) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Entwicklung der Schnitte erfolgte nach Anweisung des Herstellers (Vectastain ABC Reagenz, Vector/Linaris, DAB, Sigma).

4 ERGEBNISSE

4.1 Immunisierungsstrategie gegen Prionenerkrankungen im Mausmodell

In diesem Teil der Arbeit wurde die Frage untersucht, ob es möglich ist mittels aktiver Immunisierung eine schützende Antikörperantwort gegen das Prion-Protein in Mäusen zu induzieren. Da es sich beim Prion-Protein um ein körpereigenes Protein handelt, ist es aufgrund der Selbsttoleranz sehr schwierig in wildtypischen Tieren eine Antikörperantwort zu induzieren (Aucouturier et al., 2000). Um dieses Problem zu umgehen wurden für die Experimente Mäuse verwendet (Abb.11), welche auf dem PrP-Knockout-Hintergrund (*Prnp^{0/0}*-Tiere, Bueler et al., 1993) das Hamster-Prion-Protein (HaPrP) unter der Kontrolle des Neuronenspezifischen Enolase Promotors (NSE), ausschließlich auf Neuronen exprimieren (Race et al., 1995). Das Protein wird also weder im Thymus noch in der Körperperipherie exprimiert, dort, wo es zum Aufbau der Selbsttoleranz kommt. Hamster und Maus-Prion-Protein zeigen eine hohe Sequenzhomologie und unterscheiden sich in zwölf Aminosäuren. Durch die Verwendung von rekombinantem Maus-Prion-Protein als Immunisierungsvakzine sollte die Selbsttoleranz der Mäuse umgangen werden. Zusätzlich wurde eine Versuchsgruppe mit einem Maus-Prion-Protein Fusionskonstrukt behandelt, welches mit einem T-Helferepitop des Tetanus-Toxins fusioniert wurde (P30). Von diesem aus den Aminosäuren 947-967 des Tetanus-Toxins bestehende Epitop P30 ist bekannt, dass es zu unspezifischer Aktivierung von T-Lymphozyten führen kann. Für eine wirksame Induktion einer Antikörperimmunantwort nach Immunisierung mit einem Peptid ist es notwendig, neben der Präsentation geeigneter B-Zell-Epitope, über T-Zell-Epitope auch die Aktivierung von T-Helferzellen zu gewährleisten (Good et al., 1987; Leclerc et al., 1987; Sinigaglia et al., 1987). Solche T-Zell-Epitope sind fähig an MHCII-Moleküle auf der Oberfläche von Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) zu binden und mit den T-Zell-Rezeptoren in einem trimolekularen Komplexes zu interagieren (Babbitt et al., 1985). Proteine oder Peptide mit fusionierten T-Zell-Epitopen können somit die Immunogenität von B-Zell-Epitopen erhöhen (Francis et al., 1987).

In diesem Abschnitt der Arbeit werden die Ergebnisse der Proteinimmunisierung dargestellt und hierbei die einzelnen Immunisierungsgruppen miteinander verglichen. Die induzierten Antikörper wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf ihre Fähigkeit untersucht, die Vermehrung von PrP^{Sc} zu inhibieren und Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu nehmen.

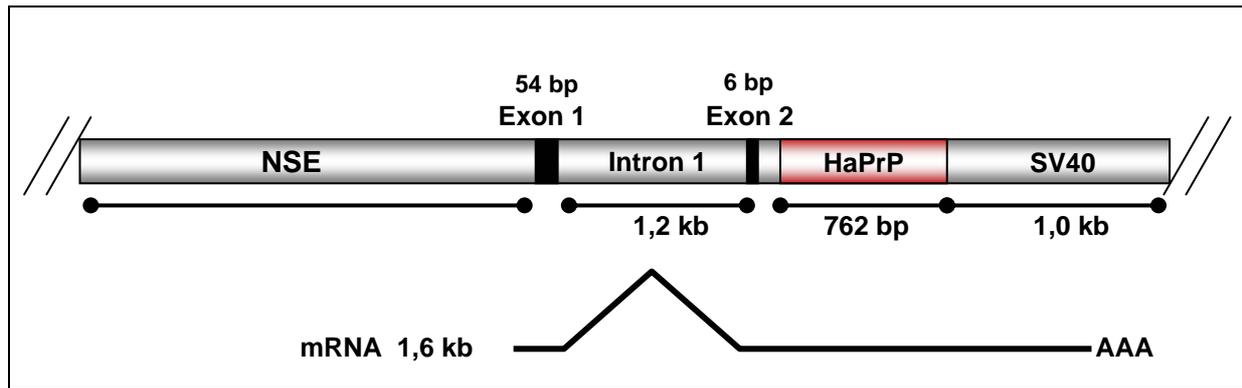


Abbildung 11. Schematische Darstellung des *NSEHaPrP*-Transgens.

Die 1kb-umfassende cDNA des Hamster-PrPs (Robakis et al., 1986; Rubenstein et al., 1986) wurde hinter den Neuronen-spezifischen-Enolase (NSE) Promotor kloniert. Die Transkriptionseinheit besteht aus 54 bp des Exon 1, 6 bp von Exon 2 und 762 bp des Hamster-PrPs. Das Polyadenylierungssignal ist in der SV40 DNA lokalisiert. (Race et al., 1995).

4.1.1 Immunisierung mit rekombinantem PrP und dem Fusionsprotein PrP-P30

Für die aktiven Immunisierungsexperimente wurden zwei Proteine verwendet. Das aus *E.coli* rekombinant hergestellte Maus-Prion-Protein (rek.PrP) und das aus Maus-Prion-Protein und dem T-Helferepitop des Tetanustoxin P30 bestehende Fusionsprotein PrP-P30. Das T-Helferepitop besteht aus einer kodierenden Sequenz von 21 Aminosäuren, welche zwischen die Codons 223 und 224 der Sequenz des Prion-Proteins eingefügt wurde (Nitschke et al., 2007). Für die Immunisierungsexperimente wurden jeweils sieben *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäuse sechsmal entweder mit 50µg rekombinantem Maus-Prion-Protein oder dem Fusionsprotein subkutan (s.c.) immunisiert. Als Negativkontrolle diente eine Gruppe von Tieren, die entweder s.c. 50µg Ovalbumin erhielten oder nicht immunisiert wurden. Die Tiere waren zu Beginn der Versuche ca. 12 Wochen alt. Nach der dritten Immunisierung wurden die Tiere mit 3 log LD₅₀ des Hamsterprionenstamms Sc237 (DeArmond et al., 1993) intraperitoneal infiziert. Ab der vierten Immunisierung (3. boost) wurde den Mäusen in Kombination mit dem jeweiligen Protein zusätzlich 10µg Cytidyl-guanyl Oligodeoxynukleotid-1826 (Krieg, 2002) verabreicht (Abb. 12). Für diese methylierten CpG-Motive wurde gezeigt, dass sie *in vivo* die Reifung von APCs begünstigen und in Mäusen eine starke T-Zell-Antwort induzieren können (Krieg, 2002) und die Immunogenität der Impfpoteine verbessern.

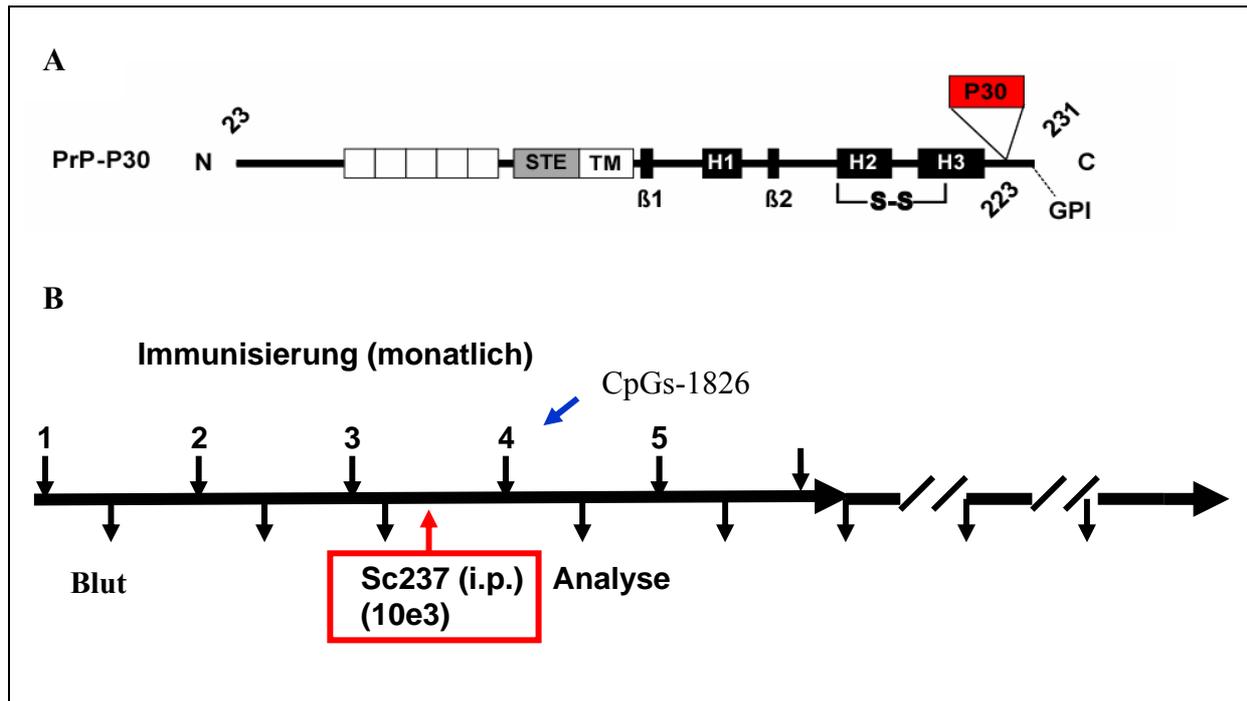


Abbildung 12. Schematische Sequenzdarstellung der verwendeten Proteine (Aminosäuren 23-231) für die Immunisierung (A) und das Immunisierungsschema (B). Die Tiere wurden sechsmal mit 50µg PrP, PrP-P30 oder Ovalbumin immunisiert. Den Mäusen wurde 10 Tage nach jeder Immunisierung retroorbital Blut für die Antikörperbestimmung entnommen und nach der dritten Immunisierung mit dem Hamsterprionenstamm Sc237 intraperitoneal infiziert. Ab der vierten Immunisierung wurde zusätzlich CpGs-1826 als Adjuvanz verabreicht. H1-H3 = α -Helices 1-3, β 1, β 2 = β -Faltblattstrukturen 1-2, STE = Stop-Transfer-Effektorsequenz, TM = Transmembrandomäne, P30 = T-Helferepitop, GPI = Glykosylphosphatidylinositol-Anker.

4.1.2 Rekombinantes PrP-und PrP-P30-induziertes Maus-Immuneserum ist spezifisch für Hamster-bzw. Maus-Prion-Protein

Zur Überprüfung der Immunogenität der verwendeten Proteine wurde den Tieren jeweils zehn Tage nach jeder Immunisierung retroorbital Blut entnommen und die Seren mittels ELISA auf spezifische Antikörper sowohl gegen Maus- als auch gegen Hamster-Prion-Protein untersucht (Abb. 13). Schon nach der zweiten Immunisierung (1.boost) wurden hohe Antikörpertiter bei einer Serumverdünnung von 1:3200 gegen das Maus-Prion-Protein (A) gemessen, die sich nach jeder weiteren Immunisierung erhöhten. Bei der Analyse der Mittelwerte der Antikörperkonzentration konnten hinsichtlich der Gesamt-Immunglobulin-Konzentration (IgGesamt) keine Unterschiede zwischen der mit rekombinanten PrP immunisierten Gruppe und der Gruppe, die zusätzlich das P30 Epitop erhielten, detektiert werden.

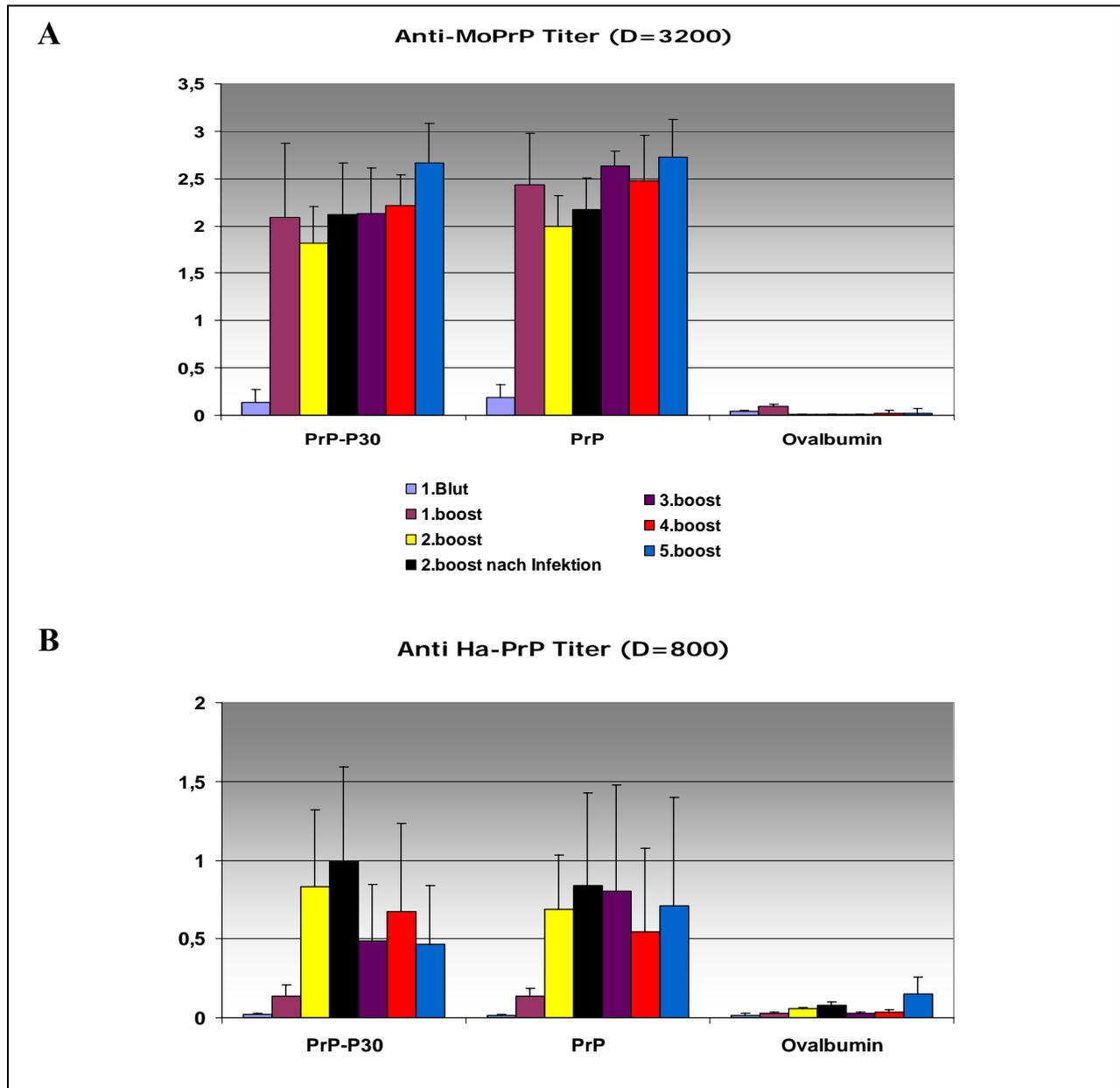


Abbildung 13. Gesamt Immunglobulin-Titer in den Seren der immunisierten *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäuse. Dargestellt sind die Gesamt-Immunglobulin-Titer gegen Maus- (A) bzw. Hamster-PrP^C (B) in den Seren nach sechs Proteinimmunisierungen mit rek.PrP und PrP-P30. Die Graphiken zeigen die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen (n=7) in der Serumverdünnung 1:3200 gegen Maus-PrP^C und 1:800 gegen Hamster-PrP^C mit Standardabweichung.

Im Gegensatz zu Maus-PrP-spezifischen Antikörpern konnten signifikante Antikörpertiter in einer Serumverdünnung von 1:800 gegen das Hamster-Prion-Protein (B) erst nach der dritten Immunisierung detektiert werden. Auch hier erhöhten sich die Antikörpertiter mit jeder weiteren Immunisierung. Unterschiede zwischen den mit rek.PrP bzw. PrP-P30 immunisierten Gruppen konnten auch hier nicht gefunden werden.

Da die Antikörperkonzentrationen in den Seren der Tiere in den einzelnen Gruppen stark unterschiedlich waren, wurde die Antikörperkonzentration mittels Endpunkttitration bestimmt (Alcorn and Pascho, 2000). Als Endpunkt wurde dabei die Verdünnung der Seren bestimmt, bei dem die optische Dichte bei 450 nm (OD_{450}) im ELISA bei einem Wert zwischen 0,3 und 0,4 lag. Die graphische Darstellung der Titerendpunkte ist Abbildung 14 zu entnehmen. Nach fünfmaliger intraperitonealen Immunisierung der Hamster-transgenen Mäusen mit rek.PrP bzw. PrP-P30 konnten spezifische Anti-PrP Titer in einzelnen Tieren bis zu einer Serumverdünnung von 1:50000 gegen Hamster-PrP (A) bzw. 1:1280000 gegen Maus-PrP (B) erzielt werden (siehe auch Tabelle 3). In jeder der immunisierten Gruppen gibt es so genannte Non-Responder gegen das Hamster-Protein, einzelne Tiere, die nach Immunisierung keine bzw. nur schwache spezifische Antikörper in ihren Seren aufweisen. Im Gegensatz dazu wurde kein Non-Responder hinsichtlich der Antikörperreaktivität gegen das Maus-Protein gefunden.

Ein wesentlicher Faktor für eine passende Immunantwort ist die Stimulation unterschiedlicher T-Zell-Subpopulationen. Ob es zu einer vorherrschend zellvermittelten oder humoralen adaptiven Immunantwort kommt, hängt von der Differenzierung von CD4-positiven T-Zellen in T_{H1} und T_{H2} -Zellen ab (Panus et al., 2000). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Gabe von CpG-Motiven als Adjuvanz bei einer Immunisierung zusätzlich die Immunantwort verstärken und sie durch präferentielle Induktion einer T_{H1} -Antwort qualitativ modifizieren kann (Rosset et al., 2004; Spinner et al., 2007; Wildbaum et al., 2002).

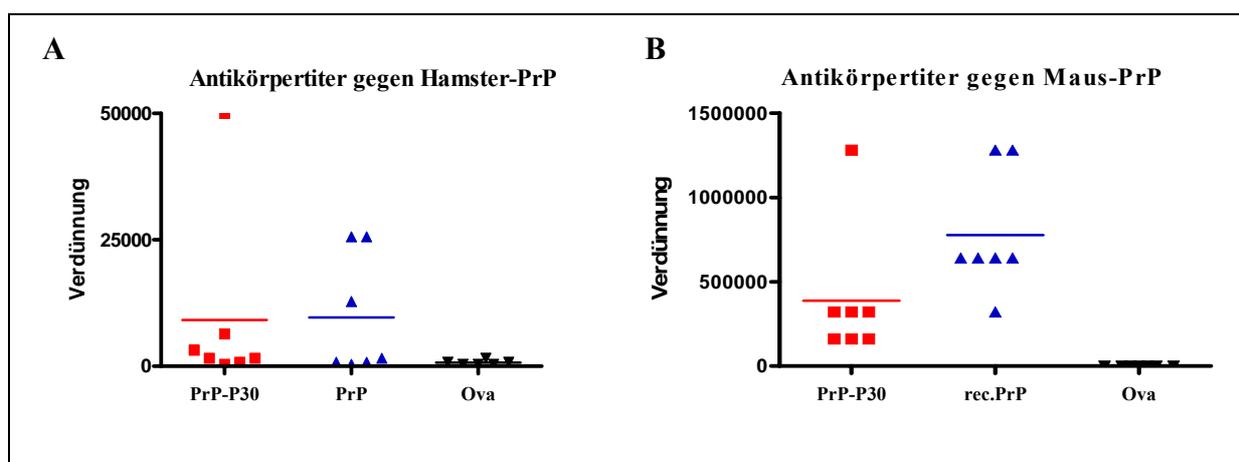


Abbildung 14. Endpunkttitration der Seren immunisierter *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäuse.

Dargestellt sind Hamster- (A) bzw. Maus-spezifische (B) Anti-PrP^C Antikörpertiter nach der sechsten Immunisierung. ■ = *NSEHa-Prnp^{0/0}* immunisiert mit PrP-P30, ▲ = *NSEHa-Prnp^{0/0}* mit rek.PrP immunisiert, ▼ = mit Ova-behandelte *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäuse.

Tier	A) Endpunkte gegen Hamster-PrP			B) Endpunkte gegen Maus-PrP		
	PrP-P30	rek.PrP	Ova	PrP-P30	rek.PrP	Ova
1	50 000	1600	400	320 000	640 000	100
2	12 800	25 000	800	160 000	1280 000	200
3	3200	800	400	1280 000	1280 000	800
4	6400	12 800	200	160 000	320 000	400
5	6400	400	400	320 000	640 000	100
6	1600	25 000	800	160 000	640 000	800
7	15 000	800	200	320 000	640 000	400

Tabelle 3. Bestimmung der spezifischen Anti-PrP-IgG-Antikörper einzelner immunisierter *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäuse. Die Spezifität der Seren der mit PrP-P30 und rek.PrP-immunisierten Mäuse wurde mittels Endpunkttitration im ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Anti-Hamster-PrP^C- (A) und Anti-Maus-PrP^C- (B) spezifischen Endpunkte der Seren.

Die Verwendung des CpG-Motivs 1826 erfolgte ab Beginn der vierten Immunisierung. Deshalb sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob das verwendete Adjuvanz einen Einfluss auf die T_{H1}/T_{H2} Polarisierung der Immunantwort hatte. Die Immunsereen der *NSEHa-Prnp^{0/0}* Mäuse wurden auf die Subtypen IgG1 (T_{H2}-Antwort) und IgG2a (T_{H1}-Antwort) untersucht (Abb.15). Die Ergebnisse zeigten, dass nach der Immunisierung mit rek.PrP und PrP-P30 sowohl IgG1 als auch IgG2a Antikörper im Serum der Tiere nachweisbar waren. Sowohl ohne Verwendung eines Adjuvanz (3.boost) als auch nach Gabe von CpGs-1826 als Immunstimulator (4.boost) überwiegte im Serum der Anteil an Antikörper vom Subtyp IgG1, was auf eine vorwiegend humorale Immunantwort hindeutet. Die zusätzliche Injektion der CpGs brachte somit keine qualitative Veränderung in der Immunantwort.

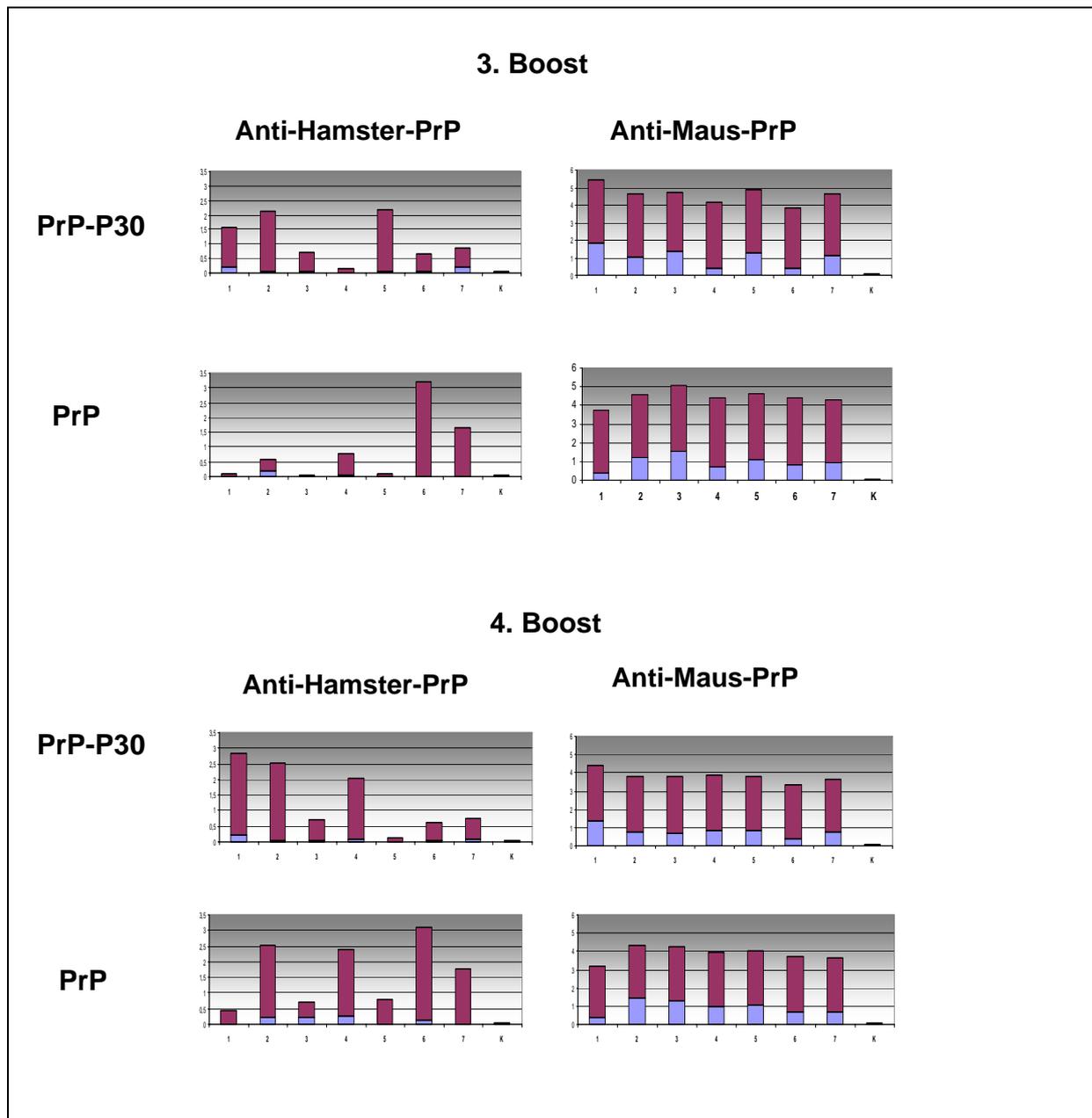


Abbildung 15. Anti-Hamster bzw. Anti-Maus Immunglobulinsubtypen in *NSEHa-Prnp^{0/0}*- Mäusen nach Immunisierung mit rek.PrP und PrP-P30. Dargestellt sind die Antikörpertiter einzelner Tiere der verschiedenen Immunisierungsgruppen nach der vierten bzw. fünften Immunisierung (3. bzw. 4.boost). Die Seren wurden 1:400 verdünnt. Für die Detektion wurde anti-Maus IgG1 (—) und anti-Maus IgG2a (—) verwendet.

Um die Spezifität der in den Seren enthaltenen Antikörper zu bestimmen, ist ein ELISA oft nicht ausreichend. Seren können unter Umständen unspezifisch an verschiedene Moleküle und Oberflächen binden. Es war deshalb notwendig zu untersuchen, ob die induzierten Antikörper in der Lage sind in gelöster Form vorliegendes Prion-Protein zu binden.

Um die mittels ELISA erhaltenen Daten zu verifizieren, wurde zusätzlich ein kompetitiver ELISA durchgeführt (Coleman et al., 1986). Bei dieser Methode wurde das spezifische Antigen (Hamster-PrP oder Maus-PrP) an der Oberfläche einer Festphase fixiert. Vor der

Zugabe der Seren wurden diese zuvor mit dem jeweiligen Antigen vorinkubiert, um die in den Seren enthaltenen Antikörper abzusättigen. Als Kontrollwerte dienten Ansätze, bei denen vorher kein freies Antigen zugesetzt wurde. Die Spezifität der Antikörper ließ sich somit aus den Differenzwerten abschätzen. Für die Konkurrenzexperimente wurden nur die Seren der Tiere verwendet, die im ELISA eine messbare Konzentration von PrP-spezifischen Antikörpern aufwiesen. Wie Tabelle 4 aufzeigt war es möglich, bei allen untersuchten Tieren die Maus-spezifischen Antikörper mit Maus-Prion-Protein zu inhibieren. Im Gegensatz dazu war die spezifische Absättigung von Hamster-spezifischen Antikörpern mit Hamster-PrP nur bei einem Tier aus der Gruppe der mit PrP-P30 immunisierten Tiere möglich. Eine Kreuzreaktivität von Hamster-bzw. Maus-spezifischen Antikörpern konnte bei insgesamt zwei bzw. vier Tieren beobachtet werden, wobei die Konkurrenz in der PrP-P30 Gruppe erfolgreicher war als in den Tieren, die nur das rekombinante Maus-Prion-Protein ohne das T-Helferepitop erhielten.

Antigen	Vorinkubation mit freiem Antigen	PrP-P30 immunisierte Tiere <i>[Erfolgreiche Konkurrenz/ Gesamtzahl getesteter Tiere]</i>	rek. PrP immunisierte Tiere <i>[Erfolgreiche Konkurrenz/ Gesamtzahl getesteter Tiere]</i>
Maus-PrP	Maus-PrP	6/6	5/5
Maus-PrP	Hamster-PrP	2/6	0/5
Hamster-PrP	Maus-PrP	3/6	1/5
Hamster-PrP	Hamster-PrP	1/6	0/5

Tabelle 4. Spezifitätsnachweis der Seren für Maus- und Hamster-PrP mittels Kompetitivem ELISA. Jedes Serum wurde in einer Verdünnungsreihe mit je 100µg von rek. Maus-bzw. Hamster-PrP vorinkubiert. Alle Seren zeigten eine spezifische Bindung an Maus-PrP, wobei nur eins von elf getesteten Seren spezifisch durch Hamster-PrP kompetitiert werden konnte.

4.1.3 Klonierung eines Expressionsvektors für die spezifische Expression von Hamster-Prion-Protein

Für die Analyse der Antikörper in Bezug auf die Bindung an die nativen Formen des Prion-Proteins wurde ein Expressionsvektor benötigt, der die Hamster-Form des Proteins exprimiert. Als Grundlage für die Herstellung diente der eukaryotische Expressionsvektor pAdMd-CMV-PrP, welcher die kodierende Region des murinen Prion-Proteins unter der Kontrolle des humanen CMV-Promotors enthält. Für den Austausch der Maus- gegen die Hamster-Sequenz wurde aus einer Hamster-transgenen Maus (Tg(SHaPrP)3922) Blut entnommen und die DNA daraus isoliert (Scott et al., 1993). Mittels PCR wurde die kodierende Region für das Hamster-Prion-Protein aus dem Genom herausamplifiziert und über eine BamHI und MfeI-Schnittstelle in den zuvor geschnittenen Vektor kloniert (Abb. 16). Durch Sequenzanalyse wurde die korrekte Klonierung überprüft und bestätigt.

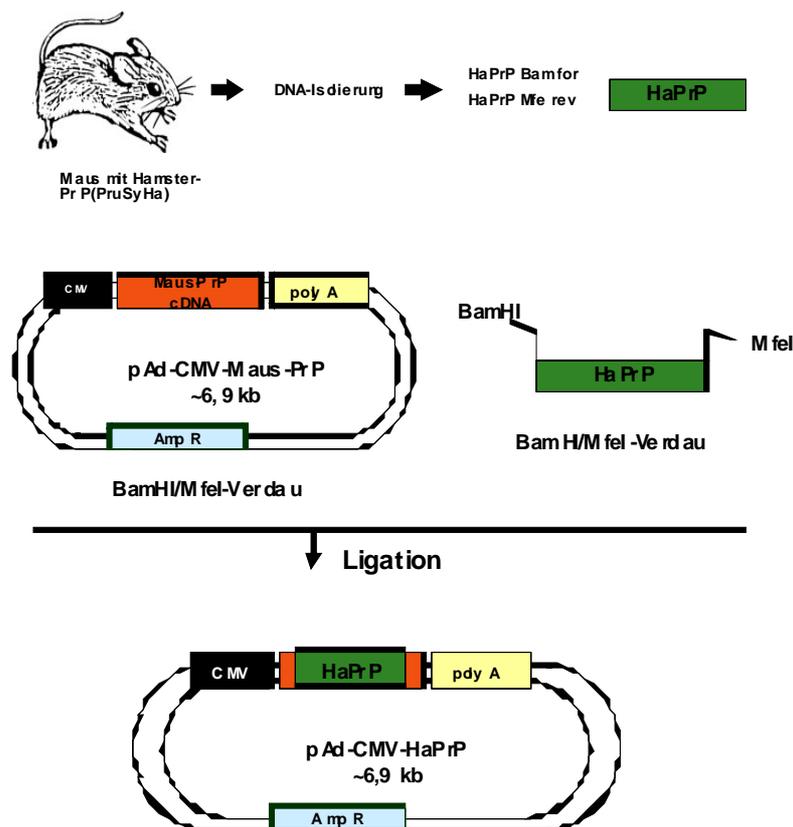
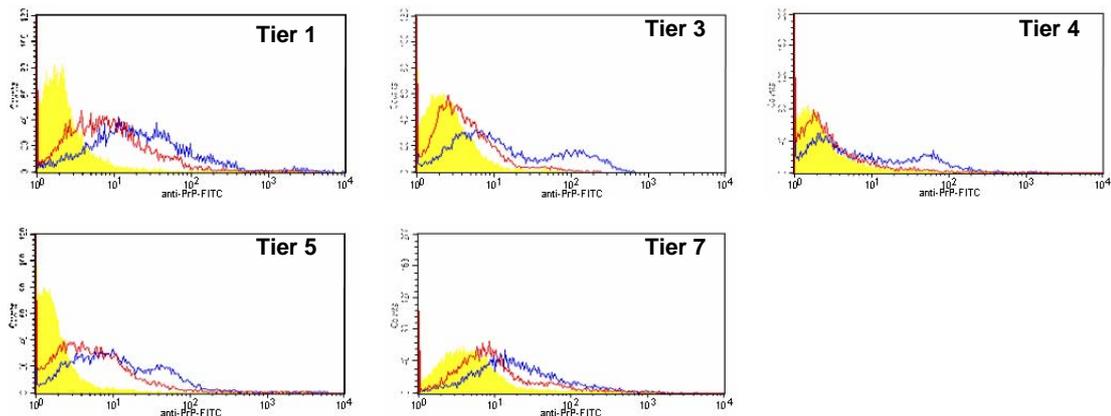


Abbildung 16. Klonierungsschema für den Austausch der murinen Sequenz des PrP-Gens gegen die Hamster-Region. Mit der DNA einer Hamster-PrP-exprimierenden Maus (Tg(SHaPrP)3922) wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt und die Hamster-PrP-Sequenz daraus amplifiziert. Über eine BamHI und MfeI-Schnittstelle wurde die Maus-Sequenz aus dem Vektor herausgeschnitten und dafür die Hamster-Sequenz eingefügt.

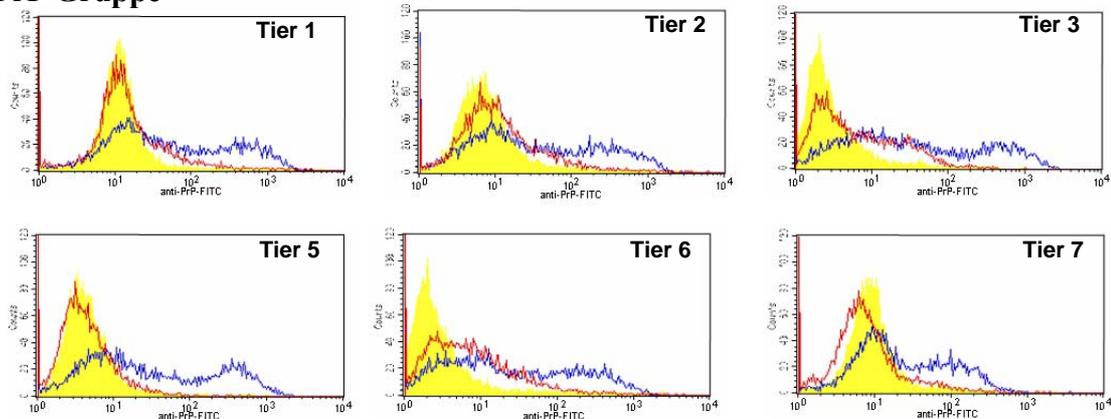
4.1.4 Nachweis der Spezifität der Anti-PrP Antikörper mittels FACS-Analyse

In den vorangehenden Versuchen wurde gezeigt, dass es möglich war, anti-PrP Antikörper in den Hamster-transgenen Tieren zu induzieren. Da bei der ELISA-Methode rekombinantes Protein für den Nachweis verwendet wurde, stellte sich die Frage, ob die Antikörper in den Seren auch in der Lage waren natives Protein zu detektieren. Für diese Bestimmung und den Nachweis der Spezifität der Anti-PrP Antikörper auf natives Hamster-bzw. Maus-Prion-Protein wurden humane 293T-Zellen mit den zuvor klonierten Expressionsvektoren pAd-CMV-Maus-PrP bzw. -Hamster-PrP transfiziert. Da 293T-Zellen keine endogene Expression von PrP^C aufweisen, sind diese Zellen für eine Transfektion mit PrP-exprimierenden Vektoren geeignet. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit einem LacZ-exprimierenden Vektor transfiziert wurden. Die Seren der immunisierten Mäusen wurden im Verhältnis 1: 50 verdünnt und zu den zuvor transfizierten Zellen gegeben. Als sekundärer Antikörper wurde anti-Maus-IgGesamt verwendet. Abb. 17 zeigt die FACS-Analyse der Seren nach der sechsten Immunisierung (5.boost). Alle getesteten Seren zeigen eine spezifische Bindung an die Zellen, die die murine Form des Prion-Proteins exprimieren (blaue Kurve), im Vergleich zur Bindung an die Zellen, die β -Galaktosidase exprimieren (gelb gefüllte Kurve). Eine spezifische Bindung an Zellen die das Hamster-Prion-Protein exprimieren, konnte hingegen nur bei 4 der 11 getesteten Seren nachgewiesen werden, wobei die Stärke der Bindung innerhalb der Gruppen stark variierte. Die Seren der Tiere 1 und 5 der mit PrP-P30 immunisierten Gruppe zeigen eine starke und signifikante Bindung, während bei den Tieren 3, 4 und 7 nur eine schwache bzw. keine Bindung an die native Form des Hamster-Proteins nachweisbar war (A, PrP-P30 Gruppe). In der Gruppe der mit rek.PrP-immunisierten Tieren zeigten Tier 3 und 6 eine starke Bindung an Hamster-PrP während die Tiere 1, 2, 5 und 7 nur minimale Bindungsaffinitäten gegen die Hamster-Form des Proteins aufwiesen (B, rek.PrP-Gruppe). Als Negativkontrolle dienten die Seren der Tiere, die mit Ovalbumin immunisiert wurden (C, Kontrollen, Ova Tier 3 und 4). Diese Seren zeigen keine Bindung an die transfizierten 293T-Zellen, unabhängig vom verwendeten Konstrukt. Als Positivkontrolle wurden die transfizierten Zellen mit dem monoklonalen Antikörper 6H4 inkubiert, welcher sowohl das murine als auch das Hamster-Protein erkennt (C, Positivkontrolle).

A) PrP-P30 Gruppe



B) PrP Gruppe



C) Kontrollen

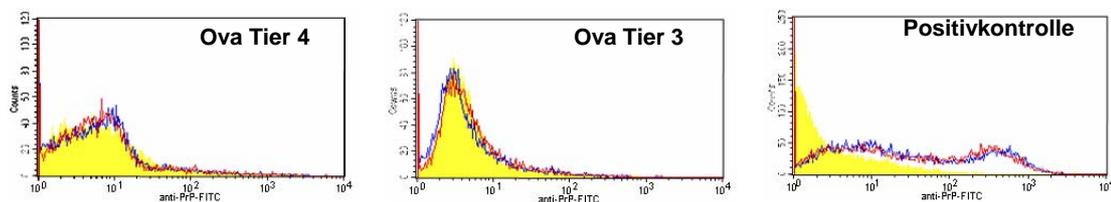


Abbildung 17. Bindung von Anti-PrP-spezifischen Antikörpern an 293T-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Gezeigt ist die spezifische Bindung von mit Maus- (—) bzw. Hamster-PrP (—) transfizierten 293T-Zellen durch Antikörper in Seren von PrP-P30- (A) und rek.PrP- (B) immunisierten Tieren. Alle getesteten Seren (1:50 verdünnt) zeigen eine spezifische Bindung an Maus-PrP, während nur 4 von 11 immunisierten Tiere eine signifikante Bindung an die Hamster-Form des Prion-Proteins aufweisen (A, B). Als Kontrolle dienten sowohl Anti-PrP-negative Seren aus mit Ovalbumin immunisierten Tieren, sowie der monoklonale Anti-PrP-Antikörper 6H4 (C).

4.1.5 Nachweis der Spezifität der Anti-PrP Antikörper mittels Westernblot

Im vorangegangenen Versuch konnte gezeigt werden, dass die Antikörper in den Seren einzelner immunisierter Tiere die zelluläre Form des Hamster-bzw. Maus-Prion-Proteins auf 293T-Zellen binden können. Im Folgenden soll nun gezeigt werden, ob diese Antikörper auch

in der Lage sind die zelluläre Form des Prion-Proteins im Westernblot zu detektieren. Hierfür wurden 10%ige Gehirnhomogenate von PrP-Knockout Mäusen (*Prnp^{0/0}*) hergestellt sowie Homogenate von wildtypischen C57BL/6-Mäusen und Hamsterhirnen. Alle getesteten Seren zeigten eine spezifische Bindung an Wildtyp-Hirnhomogenat, wie beispielhaft mit Tieren der einzelnen Immunisierungsgruppen in Abb. 18 (Spuren 2), gezeigt. Von elf getesteten Seren zeigten allerdings nur drei Tiere im Westernblot eine spezifische Bindung an die Hamster-Form des Prion-Proteins (Spuren 3). Keines der Seren wies eine unspezifische Bindung an das Homogenat einer PrP-Knockout-Maus auf (Spuren 1), welches als interne Negativkontrolle diente. Die Spezifität der Seren wurde weiterhin durch ein fehlendes Signal bei Verwendung von Seren von mit Ovalbumin immunisierten Mäusen bestätigt (B, Ova). Als Positivkontrolle diente der monoklonale Antikörper 6H4, welcher sowohl das Hamster- (B, 6H4) als auch das Maus-Prion-Protein (nicht gezeigt) im Westernblot detektiert.

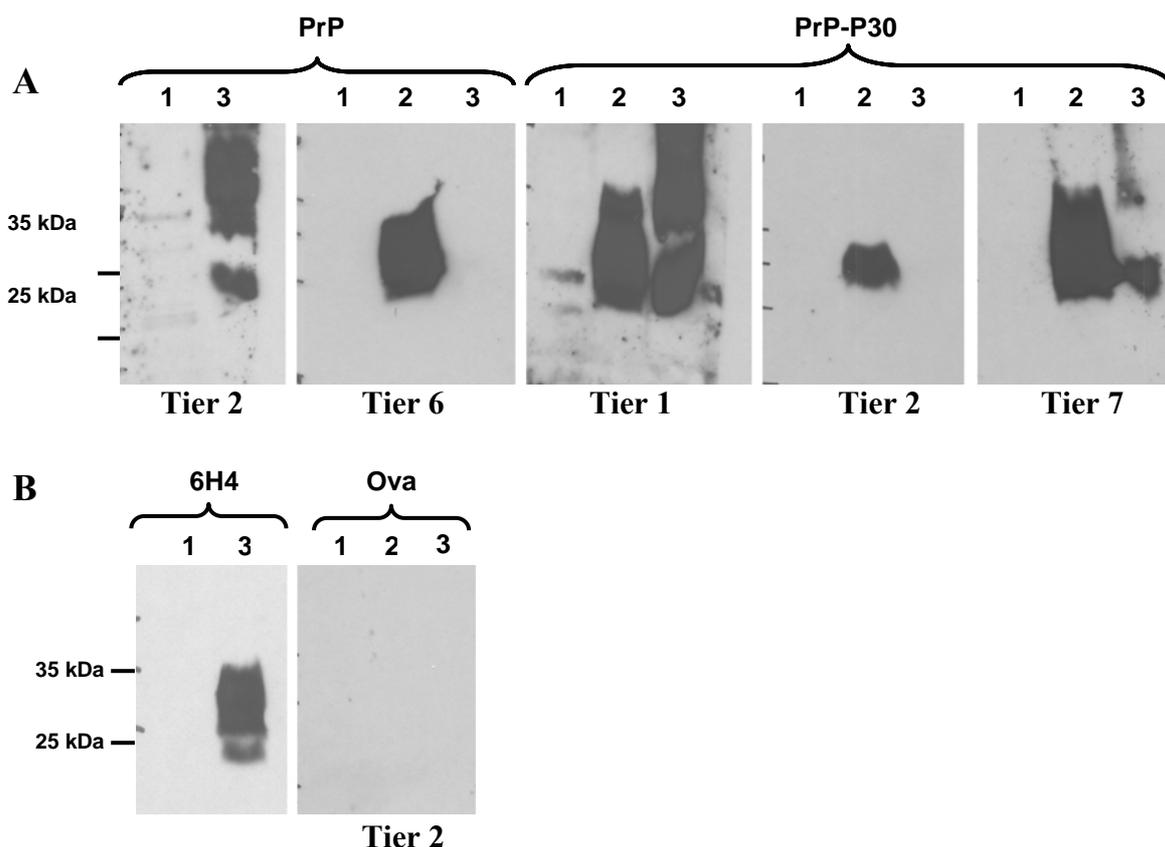


Abbildung 18. Bindung der Seren an PrP^C im Westernblot. A) Nachweis der PrP^C-Spezifität verschiedener Seren. Alle getesteten Seren zeigen eine spezifische Bindung an Maus-PrP (C57BL/6), wobei die Antikörper von nur drei Seren eine spezifische Detektion von Hamster-PrP im Westernblot zeigen (Spuren 3). Als Kontrolle diente der monoklonale Anti-PrP-Antikörper 6H4 und ein Serum einer mit Ovalbumin immunisierten Maus (B). Auftrag der Gehirnhomogenate: 1) *Prnp^{0/0}*, 2) C57BL/6, 3) Hamster

4.1.6 Rekombinantes PrP- und PrP-P30-induziertes Maus-Immunsersum ist funktionell aktiv und inhibiert die PrP^{Sc}-Biogenese in lebenden Zellen

Es wurde gezeigt, dass die Anti-PrP-Antikörper der immunisierten Mäuse natives Maus-PrP erkennen. Nun wurde die Fähigkeit der induzierten Antikörper untersucht, die pathogene Form des Prion-Proteins PrP^{Sc} zu binden und somit *in vitro* Einfluss auf die Replikation und Akkumulation von PrP^{Sc} zu nehmen. Hierfür wurden Zellen einer murinen Neuroblastoma-Zelllinie (ScN2a-Zellen), welche die pathogene Form von Maus-PrP (PrP^{Sc}) tragen, mit Seren der immunisierten Tiere in der Verdünnung 1:1000 behandelt und nach fünf Tagen Kultivierung im Westernblot auf den Gehalt von PrP^{Sc} untersucht (Abb. 19). Zur Unterscheidung von zellulärem PrP (PrP^C) und der pathogenen Form PrP^{Sc} wurden die Zellen einem Proteinase-K- (PK) Verdau unterzogen. PrP^C wird durch einen PK-Verdau vollständig abgebaut während PrP^{Sc} eine partielle Resistenz gegenüber PK aufweist.

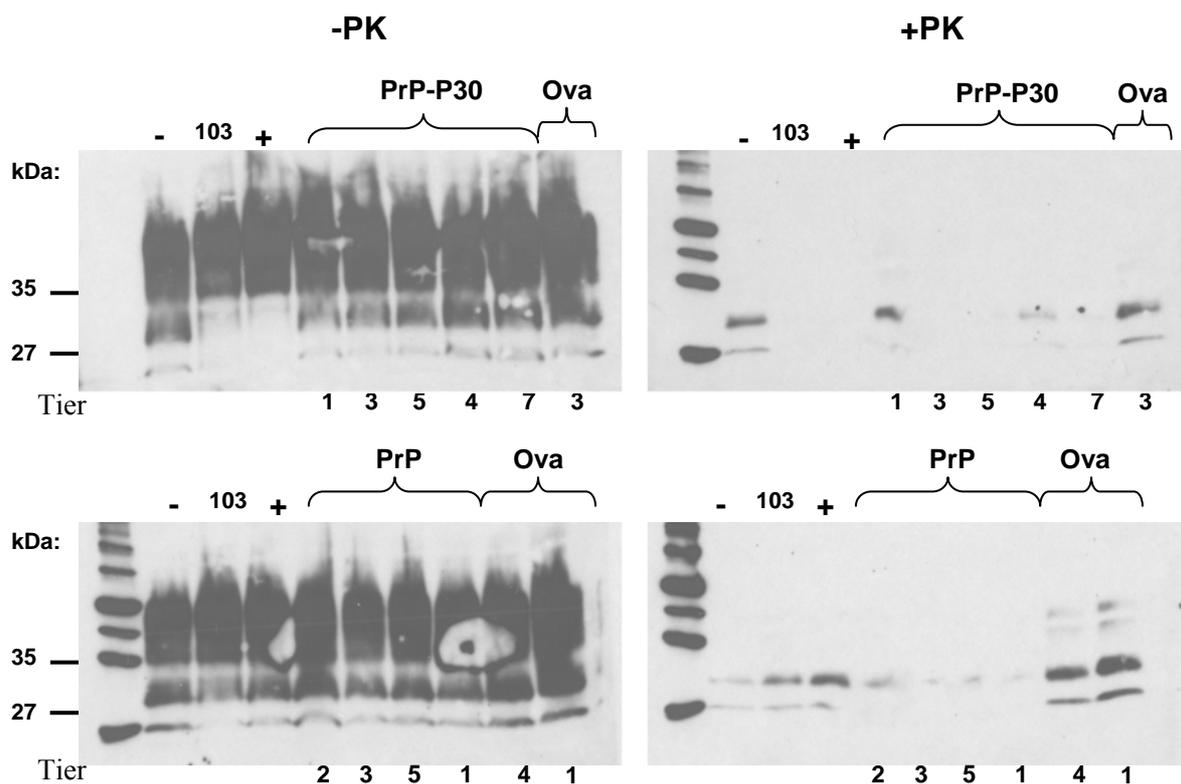


Abbildung 19. Reduktion des PrP^{Sc}-Gehaltes von ScN2a-Zellen durch Anti-PrP Antikörper in den Seren der immunisierten Tiere. Zur Detektion des PrP^{Sc}-Gehaltes wurden alle Lysate mit Proteinase K behandelt (+PK). Die Zellen wurden einmal mit einer 1:1000 Verdünnung der Seren behandelt, für fünf Tage kultiviert und anschließend im Westernblot analysiert (150µg Protein pro Spur). Als Positivkontrolle wurde der Antikörper 103 und ein Anti-PrP-positives Mausserum (+, Serum aus *Prnp*^{o/o}-Mäusen, die mit rek.PrP immunisiert wurden) verwendet. Als Negativkontrolle dienen unbehandelte Zellen (-) und Seren von Tieren, die mit Ovalbumin (Ova) immunisiert wurden. Die Detektion erfolgte mit dem polyklonalen Kaninchenserum SA2124 (1:5000).

Als Ladekontrolle dienten dabei unverdaute Zellysate (-PK). Die Signalintensität von unbehandelten Zellen (-) wurden als negative Referenz verwendet. Zellen, die mit dem monoklonalen Anti-PrP-Antikörper 103 behandelt wurden, dienten als Positivkontrolle. Von diesem Antikörper ist bekannt, dass er die Fähigkeit besitzt, die Prionenreplikation in der verwendeten Zelllinie zu inhibieren. Es war möglich PrP^{Sc} in unbehandelten ScN2a-Zellen zu detektieren, was eine konsistente Produktion des pathogenen Proteins durch die mit dem Mausprionenstamm RML-infizierten ScN2a-Zellen bestätigt (Abb. 19 -). Die Behandlung der Zellen mit dem Antikörper 103 führte zu einer verminderten bzw. vollständigen Hemmung der PrP^{Sc}-Replikation. Alle untersuchten Seren der mit rek.PrP immunisierten Versuchsgruppe (Tier 1, 2, 3, 5) waren in der Lage, den PrP^{Sc}-Gehalt der Zellen zu reduzieren, wie man durch den Vergleich der mit Ovalbumin immunisierten Gruppe erkennen kann. Die Zellen, die mit Serum aus der mit Ovalbumin-immunisierten Gruppe behandelt wurden, zeigen eine starke Bande in der erwarteten Größe. Die Inhibierung der PrP^{Sc}-Biogenese kann also nicht auf unspezifische Serumkomponenten zurückgeführt werden. Aus der Gruppe der mit PrP-P30 immunisierten Tiere zeigten drei Tiere eine vollständige Hemmung der Prionenreplikation (Tier 3,5 und 7), während andere Seren nur eine partielle bzw. keinen Einfluss auf den PrP^{Sc}-Gehalt der Zellen aufwiesen (Tier 1, 4). Diese Ergebnisse korrelieren mit der Höhe der erreichten Endpunkte gegen das Maus-PrP im ELISA. Alle Tiere, die einen Endpunkt von 320000 oder höher gegen Maus-PrP im ELISA erreichten, zeigten in Zellkultur einen deutlichen Einfluss auf die Prionenreplikation (Tabelle 5).

Tier	PrP-P30 (Inhibition der Prionenreplikation <i>in vitro</i>)	rek.PrP (Inhibition der Prionenreplikation <i>in vitro</i>)
1	320 000 (+/-)	640 000 (+)
2	320 000 (-)	1280 000 (+)
3	1280 000 (+)	1280 000 (+)
4	160 000 (+/-)	320 000 (+)
5	320 000 (+)	640 000 (+)
6	320 000 (-)	640 000 (+)
7	320 000 (+)	640 000 (+)

Tabelle 5. Vergleich der Endpunkte gegen Maus-PrP im ELISA und Fähigkeit der Immunsereen die Prionenreplikation in ScN2a-Zellen zu inhibieren. Die erreichten Antikörpertiter korrelieren mit der Fähigkeit auf die Prionenreplikation in Zellkultur Einfluss zu nehmen. Dabei zeigten alle Seren, die im ELISA einen Endpunkt von 320000 oder höher erreichten, auch *in vitro* eine spezifische Reduktion im PrP^{Sc}-Gehalt der Zellen (Einfluss auf Prionenreplikation *in vitro*: + = stark, +/- = partiell, - = keine Inhibierung).

4.1.7 Immunisierung mit PrP-P30 verlängert die Inkubationszeit nach Infektion mit Hamster-Prionen

Die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebene Immunisierungsstrategie zeigt, dass spezifische Anti-PrP-Antikörper (Anti-Maus und Anti-Hamster) in dem verwendeten Mausmodell induziert werden konnten. Obwohl die verwendeten Tiere das Hamster-Prion-Protein nicht im lymphoretikulären System exprimieren, sind sie über den intraperitonealen Weg mit Prionen infizierbar (Race et al., 2000). Um zu überprüfen, ob die Anti-PrP^C-Immunglobuline in den Tieren nach einer Infektion mit Prionen eine schützende Wirkung zeigen und zur Verzögerung bzw. Verhinderung der Krankheit führen, wurde eine *in vivo* Infektionsstudie durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere nach der dritten Immunisierung mit einer Infektionsdosis von 3logLD₅₀ des Hamsterprionenstamms Sc237 intraperitoneal infiziert. Dieser Stamm zeigt in der verwendeten transgenen Mauslinie *NSEHa-Prnp^{0/0}* eine variable Inkubationszeit und führt bei nichtbehandelten Tieren zwischen Tag 184 und Tag 312 zum Tode (Race et al., 2000). Nach Infektion mit Hamsterprionen erhielten die Tiere drei weitere Immunisierungen und wurden alle zwei Tage auf typische klinische Scrapie-Symptomatik wie Ataxie, allgemeine Bewegungsstörungen und Gewichtsverlust untersucht. Jeweils ein Tier aus der mit PrP-P30- (Tier 6) und mit rek.PrP-immunisierten Versuchsgruppe (Tier 4) wurde aufgrund allgemeiner gesundheitlicher Probleme vorzeitig ohne Auftreten typischer Scrapie-Symptome aus der Analyse herausgenommen.

Trotz signifikanter Anti-Hamster- und Anti-Maus-PrP-spezifischer Antikörper im Serum der mit rek.PrP-immunisierten Tiere zeigen diese im Vergleich zur mit Ovalbumin-immunisierten Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied in den Inkubationszeiten (Abb. 20, $p = 0.51$, Logrank Test). Die Tiere wurden durchschnittlich am Tag 337,5 (rek.PrP-Gruppe) bzw. Tag 368 (Ova-Gruppe) nach Infektion aufgrund von Krankheitssymptomen getötet und analysiert. Beide Immunisierungsgruppen zeigten innerhalb der Gruppen eine starke Variation der Inkubationszeiten von 68 bzw. 162 Tagen. Im Gegensatz dazu zeigten Tiere, die mit dem Fusionsprotein PrP-P30 immunisiert wurden sowohl im Vergleich zu der mit Ovalbumin immunisierten Kontrollgruppe als auch zu der Gruppe, die mit rek.PrP immunisiert wurden, eine signifikant verlängerte Inkubationszeit von durchschnittlich 488 gegenüber 368 bzw. 337,5 Tagen nach Infektion ($p = 0.0056$ und $p = 0.0111$, Logrank Test). 547 Tage nach Infektion wurde der Versuch beendet. Eine Maus der PrP-P30-Versuchsgruppe (Tier 3) war zu diesem Zeitpunkt ohne phänotypische Auffälligkeiten. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die individuellen Inkubationszeiten in den einzelnen Immunisierungsgruppen.

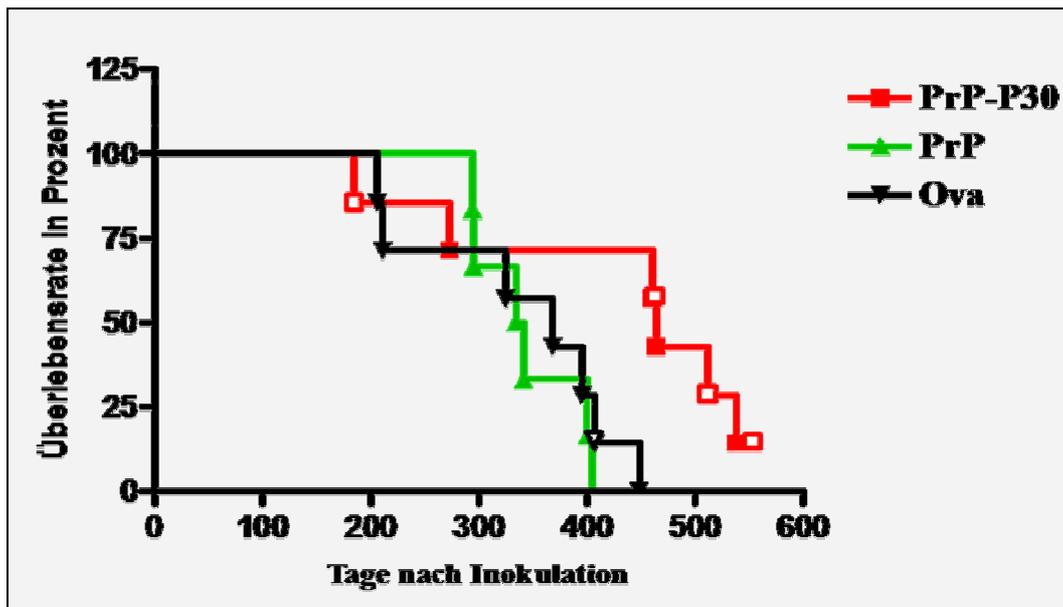


Abbildung 20. Die Immunisierung mit dem Fusionsprotein PrP-P30 führt zu verlängerter Inkubationszeit von infizierten *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Tieren. Drei Gruppen von *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäusen immunisiert mit PrP-30 (—), rek.PrP (—) oder Ovalbumin (—) wurden mit 3logLD₅₀ infektiösen Einheiten des Hamsterprionenstamms Sc237 intraperitoneal inokuliert. Jedes Symbol bezeichnet ein individuelles Tier der einzelnen Immunisierungsgruppen, das zu dem jeweiligen Zeitpunkt getötet wurde. Je ein Tier aus der Gruppe der mit PrP-P30 (Tier 6) und mit rek.PrP immunisierten Tiere (Tier 4) mussten vorzeitig aufgrund allgemeiner gesundheitlicher Probleme aus dem Versuch genommen werden (nicht dargestellt). Die offenen Symbole kennzeichnen Tiere, bei denen kein PrP^{Sc} im Gehirn nachgewiesen werden konnte.

Inkubationszeiten (in Tagen) der <i>NSEHa-Prnp^{0/0}</i> -Mäuse nach Infektion mit Sc237 und Immunisierung			
Tier	PrP-P30	rek.PrP	Ova
1	460	294	448
2	273	334	206
3	547	400	368
4	464	[152]	407
5	512	341	325
6	[184]	405	211
7	538	295	395
Mittelwerte	488	337,5	368
Standardabweichung	215	68	162

Tabelle 6. Individuelle Inkubationszeiten der immunisierten und inokulierten *NSEHa-Prnp^{0/0}* Mäuse. Dargestellt sind die Inkubationszeiten (Tage nach Infektion) der einzelnen Tiere innerhalb der verschiedenen Immunisierungsgruppen mit Mittelwerten und Standardabweichung. Die Zahlen in Klammern bezeichnen die Tage, an denen Tiere aufgrund allgemeiner gesundheitlicher Probleme (keine Scrapie-Symptome) aus dem Versuch genommen wurden. An Tag 547 nach Infektion wurde der Versuch beendet. Ein Tier der PrP-P30 immunisierten Gruppe (Tier 3) war zu diesem Zeitpunkt klinisch gesund (kursiv).

4.1.8 Die Immunisierung mit PrP-P30 führt zur Reduktion des PrP^{Sc}-Gehaltes im Gehirn der mit Prionen-infizierten Tiere

4.1.8.1 PrP^{Sc}-Gehalt im Gehirn der immunisierten und infizierten Tieren mittels Westernblot-Analyse

Um die Menge des im Verlauf der Scrapie-Infektion entstandenen PrP^{Sc} zum terminalen Zeitpunkt zu bestimmen, wurde von den immunisierten bzw. nicht-behandelten Tieren 10%ige Hirnhomogenate in PBS hergestellt und im Westernblot analysiert (Abb. 21). Mit einem Teil der Probe wurde ein Proteinase-K-Verdau durchgeführt, um die zelluläre Form von der pathogenen Form des Prion-Proteins unterscheiden zu können. Die Detektion erfolgte mit dem monoklonalen Anti-Hamster-PrP-Antikörper 3F4 in der Verdünnung 1:5000.

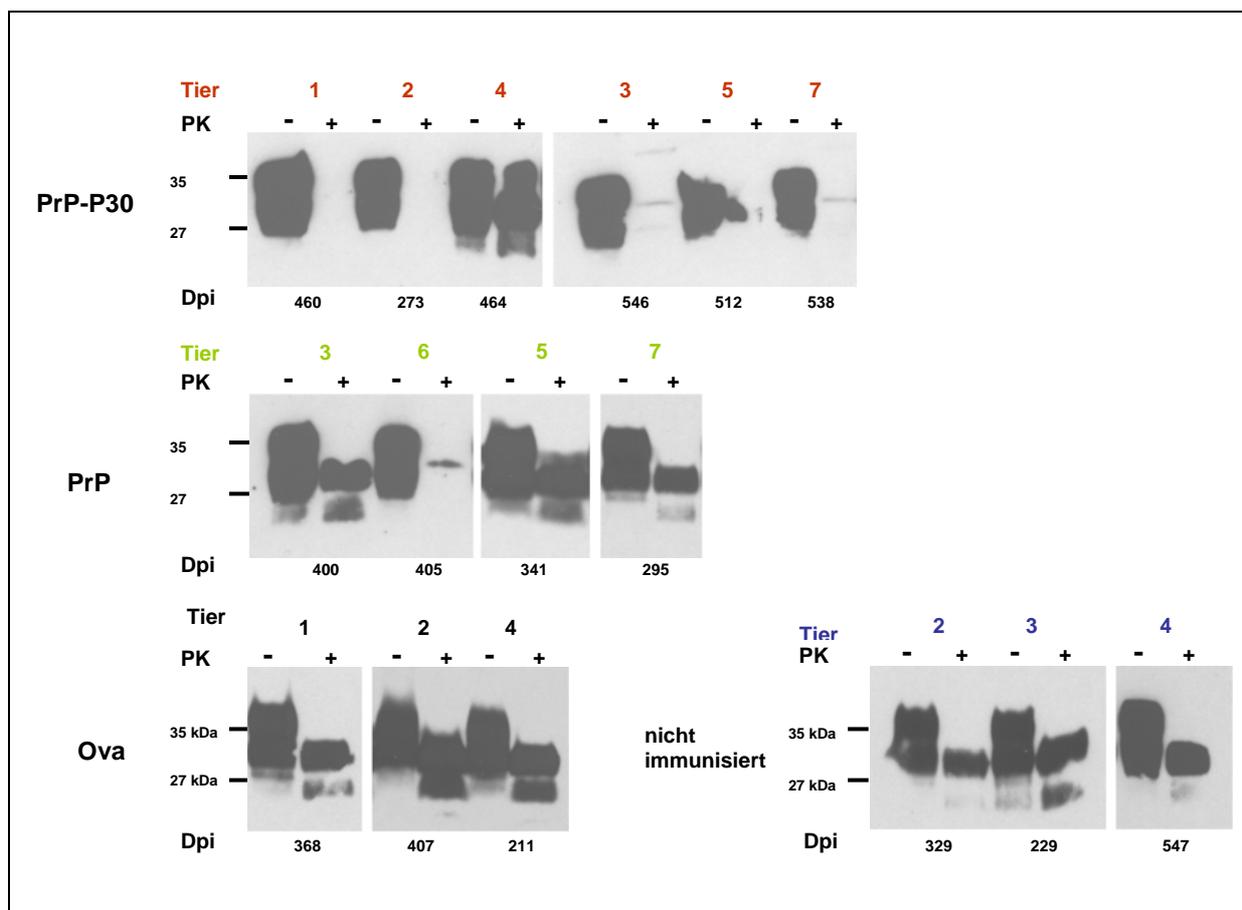


Abbildung 21. PrP^{Sc}-Nachweis in Hirnhomogenaten der inokulierten und immunisierten Mäuse bzw. in Kontrolltieren mittels Westernblot. Aufgetragen sind je 100µg unverdaute (PK -) und mit Proteinase-K verdaute (PK +) 10%ige Gehirnhomogenate der einzelnen Tiere der verschiedenen Immunisierungsgruppen. In den Tieren 1,2,3 und 7 der PrP-P30 Versuchsgruppe ist kein PrP^{Sc}-Signal detektierbar. Im Gegensatz dazu konnte in der rek.PrP-Gruppe und den Kontrollgruppen in allen Tieren die pathogene Form des Prion-Proteins nachgewiesen werden.

Alle unverdauten Proben (100µg) zeigten nach der Durchführung des Westernblots die charakteristischen Banden des Prion-Proteins mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 35 kDa (Abb. 21, unverdaute Proben, PK -). In allen untersuchten Tieren der Kontrollgruppen, die Ovalbumin erhielten bzw. nicht immunisiert wurden, war es außerdem möglich nach Verdau der Proben (100µg) die pathogene Form PrP^{Sc} zu detektieren, wie exemplarisch in Abb. 21 von je drei Tieren gezeigt. Im Gegensatz dazu war es in der mit PrP-P30 immunisierten Versuchsgruppe in nur zwei der sechs untersuchten Homogenate möglich (Tiere 4 und 5), das pathogene Protein nachzuweisen. Diese Tiere zeigten Inkubationszeiten von 464 bzw. 512 Tagen. In den Tieren 1,2,3 und 7 hingegen konnte unabhängig von den Inkubationszeiten kein deutliches Signal von PrP^{Sc} im Westernblot detektiert werden. Auch in der mit rek.PrP-immunisierten Versuchsgruppe war es in einem Tier (Tier 6) nicht möglich ein PrP^{Sc}-Signal im Gehirn nachzuweisen.

4.1.8.2 Nachweis des PrP^{Sc}-Gehaltes in den Gehirnen immunisierter Tiere mittels Histoblot

In den Gehirnen von mit PrP-P30- und rek.PrP- immunisierten Tieren war es teilweise nicht möglich, die pathogene Form des Prion-Proteins mittels Westernblot zu detektieren. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden von ausgewählten Tieren Gehirnschnitte angefertigt und mittels Histoblot auf den Gehalt von PrP^{Sc} analysiert. Diese Technik kombiniert eine hochsensitive PrP^{Sc}-Detektion mit der Erhaltung von anatomischen Strukturen. Unfixiertes, gefrorenes Hirngewebe wurde hierzu auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen, getrocknet und einem Proteinase-K-Verdau unterzogen. Proteinase-K resistentes PrP^{Sc} wurde durch Guanidinhydrochlorid denaturiert und mit dem monoklonalen Anti-Hamster-PrP-Antikörper 3F4 detektiert. Die Methode des Histoblots ist sensitiver als herkömmliche Immunoblot-Verfahren und somit für die Verifizierung der erhaltenen Westernblot-Resultate geeignet. Abb. 22 zeigt die Histoblot-Analyse der ausgewählten Tiere der verschiedenen Versuchsgruppen aus coronaren bzw. sagittalen Gehirnschnitten. Konsistent mit den erhaltenen Westernblot-Resultaten wurden auch mit der Histoblot-Technik nur in den Tieren PrP^{Sc} nachgewiesen, die schon ein detektierbares Signal im Westernblot aufzeigten. Die Kontrollgruppen mit nicht-immunisierten Tieren und mit Ovalbumin immunisierten Tieren zeigen alle einen deutlichen Gehalt an PrP^{Sc} in unterschiedlichen Bereichen des Gehirns. Die Stärke des erhaltenen Signales ist dabei innerhalb der einzelnen Gruppen variabel. Die Expression von PrP^{Sc} ist vor allem in Bereichen der grauen Substanz, im Thalamus, Hypothalamus und in Bereichen des zerebralen Kortex detektierbar.

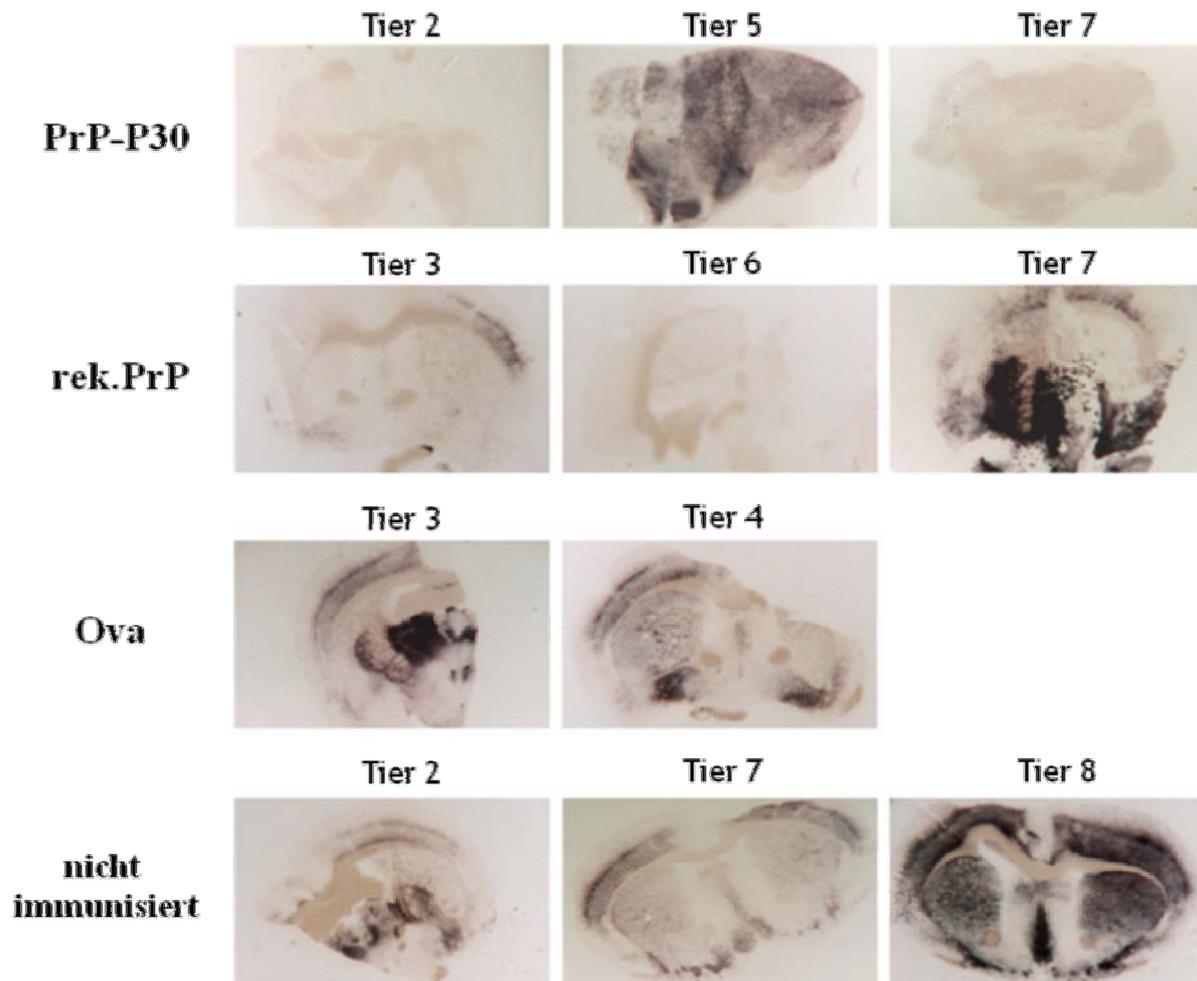


Abbildung 22. PrP^{Sc}-Nachweis in den Gehirnen infizierter und immunisierter NSEHa-Prnp^{o/o} Mäuse. Für die Histoblots wurden gefrorene Gehirngewebsschnitte auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und einem Proteinase K-Verdau unterzogen. In zwei von drei Mäusen der mit PrP-P30-immunisierten Gruppe und einem Tier der mit rek.PrP immunisierten Versuchsgruppe konnte kein PK-resistentes PrP^{Sc} detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde in allen Kontrolltieren (nicht-immunisiert bzw. mit Ova-immunisierte Tiere) im Gehirn z.T. sehr starke PrP^{Sc}-Akkumulierung beobachtet.

4.1.8.3 Bestimmung der Infektiösität infizierter und immunisierter Tiere mittels Bioassay

Der Bioassay bezeichnet einen biologischen Nachweis, bei dem die Übertragbarkeit und die Infektiösitätsmenge durch eine Infektion auf Prionensensitive Empfängertiere gemessen werden. In diesem Versuch wurden weitere Hamster-transgene Mäuse (Tg(SHaPrP)3922) verwendet (Weissmann et al., 1998), welche die zelluläre Isoform des Hamster-Prion-Proteins stark überexprimieren (Raeber et al., 1997; Scott et al., 1989; Scott et al., 1993). Die

Inokulierung mit Hamster Prionen führt in diesen Tieren nach 50-75 Tagen zum Tode. Von ausgewählten Tieren der immunisierten und infizierten Versuchsgruppen (PrP-P30, rek.PrP und Ova) wurden 1%ige Hirnhomogenate in PBS hergestellt und 30µl intrazerebral in die Indikatormäuse injiziert.

Die Transmission von nicht-immunisierten Kontrollmäusen führte zur terminalen Erkrankung nach durchschnittlich 62 ± 1 Tagen ($n=2$) (Abb. 23). Die Indikatorgruppe, welche ein Hirnhomogenat von mit Ovalbumin-immunisierten Mäusen (Tier 3) erhielten, starben nach 61 ± 2 Tagen ($n=2$). 2 Gruppen von Tg(SHaPrP)3922-Indikatormäusen, welche Gehirnhomogenate von PrP-P30 immunisierten Versuchstieren erhielten, wurden an Tag 115 nach Infektion getötet, zeigten aber zu diesem Zeitpunkt keine klinischen Symptome (dargestellt als Tag 115, PrP-P30, Tiere 2 und 7, Abb. 23). Die Indikatormäuse, welche mit dem Homogenat aus Tier 5 der PrP-P30 Gruppe infiziert wurden, starben nach 67 ± 3 Tagen ($n=3$). Die Infektiösität innerhalb der einzelnen Gruppen, die zum terminalen Stadium der Tiere führten, zeigten keinen Unterschied im Hinblick auf die unterschiedlichen Immunisierungsproteine.

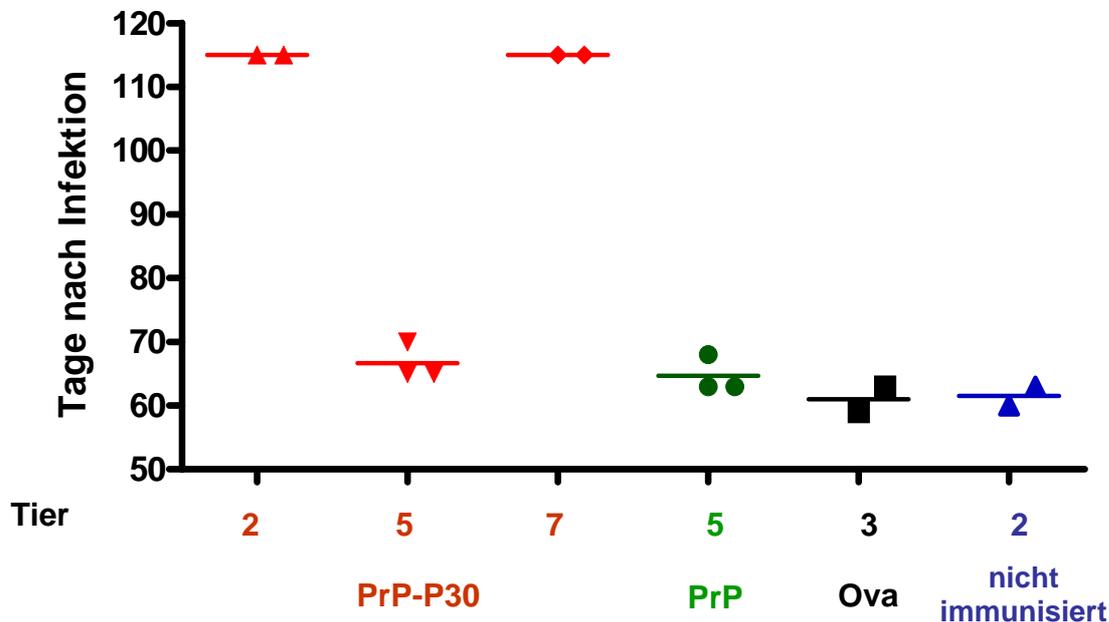


Abbildung 23. Bioassay mit Hirnhomogenat von Scrapie-infizierten, immunisierten Hamster-transgenen Mäusen. Alle Indikatortiere, die mit 1%igen Hirnhomogenaten der mit rek.PrP- und Ova-immunisierten Tiere sowie Homogenat von nicht-immunisierten Tiere injiziert wurden, starben nach Inkubationszeiten zwischen 59 und 70 Tagen. Tg(SHaPrP)3922-Tiere, welche mit dem Homogenat der Tiere 2 und 5 der PrP-P30 Gruppe infiziert wurden, entwickelten die Krankheit im gesamten Beobachtungszeitraum nicht.

4.1.9 Analyse der T-Zell-Immunantwort nach Immunisierung mit rekombinantem PrP und dem Fusionsprotein PrP-P30

In den vorangehenden Experimenten wurden *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäuse mit dem rekombinanten Maus-Prion-Protein und dem Fusionskonstrukt PrP-P30 immunisiert. Es war damit möglich, spezifische Antikörper sowohl gegen Maus-PrP als auch gegen Hamster-PrP zu induzieren. Diese Immunsereen waren in der Lage *in vitro* die Akkumulation von PrP^{Sc} zumindest teilweise zu inhibieren und konnten natives PrP detektieren. Nach Inokulation mit dem Hamsterprionenstamm Sc237 zeigte sich allerdings, dass nur die Gruppe, die mit dem Fusionskonstrukt PrP-P30 behandelt wurden, eine Verlängerung in der Inkubationszeit aufwies. Auf humoraler Ebene, d.h. in der Höhe der spezifischen Anti-Maus bzw. Anti-Hamster-Antikörpertiter konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede erkannt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine zweite Gruppe von *NSEHa-Prnp^{0/0}*-transgenen Tieren mit den zwei Proteinen immunisiert, die wieder auf die humorale Immunantwort in der Zellkultur, und zusätzlich auf zellulärer Ebene untersucht wurden. Zum Zeitpunkt der Vakzinierung waren die Tiere ca. 12 Wochen alt. Im Gegensatz zur ersten Gruppe wurden die Tiere schon mit der ersten Immunisierung das Adjuvanz CpGs-1826 verabreicht. Die Mäuse erhielten insgesamt sechs Immunisierungen s.c. mit je 50µg Protein plus 10µg CpGs-1826 im Abstand von sechs Wochen. Jeweils nach sieben Tagen wurden den Tieren Blut entnommen und die Seren analysiert.

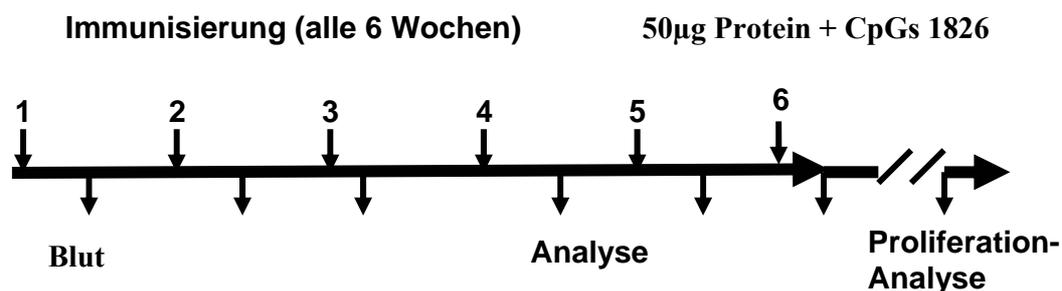


Abbildung 24. Übersicht über den Immunisierungsverlauf der zweiten Gruppe von mit rek.PrP und PrP-P30 immunisierten *NSEHa-Prnp^{0/0}*. Gruppen von 8 Tieren wurden jeweils mit 50µg Protein und 10µg CpGs-1826 im Abstand von sechs Wochen subkutan immunisiert. Jeweils sieben Tage nach Injektion wurde den Tieren Blut entnommen und die Seren auf Anti-PrP^C-Antikörper untersucht. Als Negativkontrolle dienten Tiere, die Ovalbumin erhielten. Nach der sechsten Immunisierung wurden die Tiere getötet und Milz- und Lymphknotenzellen für die Proliferationsanalyse (Hilchey and Bernstein, 2007) verwendet.

4.1.10 Die Immunseren sind hochspezifisch für Maus- und Hamster-Prion Protein

Die Ergebnisse der ELISA-Analysen der Seren nach der fünften Injektion sind in Abb. 25 grafisch dargestellt. Alle ELISA-Analysen wurden, wie im Methodenteil beschrieben mit dem Streptavidin-ELISA-System unter gleichen standardisierten Bedingungen durchgeführt. Positiv wurden die Seren gewertet, die bei den entsprechenden Verdünnungen mindestens den dreifachen Wert der Kontrollgruppe (Ovalbumin-immunisierte Tiere) erreichten. Sowohl mit rek.PrP-als auch mit PrP-P30 vakzinierte Tiere wiesen in ihren Seren hohen Titer gegen Maus-PrP und Hamster-PrP auf (Abb. 25 A und C). So ergaben die Seren aller Tiere, die mit rek.PrP immunisiert wurden, im ELISA gegen das Hamster-Prion-Protein Absorptionen von über 1,0 bei einer Serum-Verdünnung von 1:800, wobei die durchschnittliche Absorption bei 2,1 lag. Bei den mit PrP-P30 vakzinierten Tiere wurde bei 5 Tieren in der gleichen Serumverdünnung eine Absorption von >1,0 gemessen.

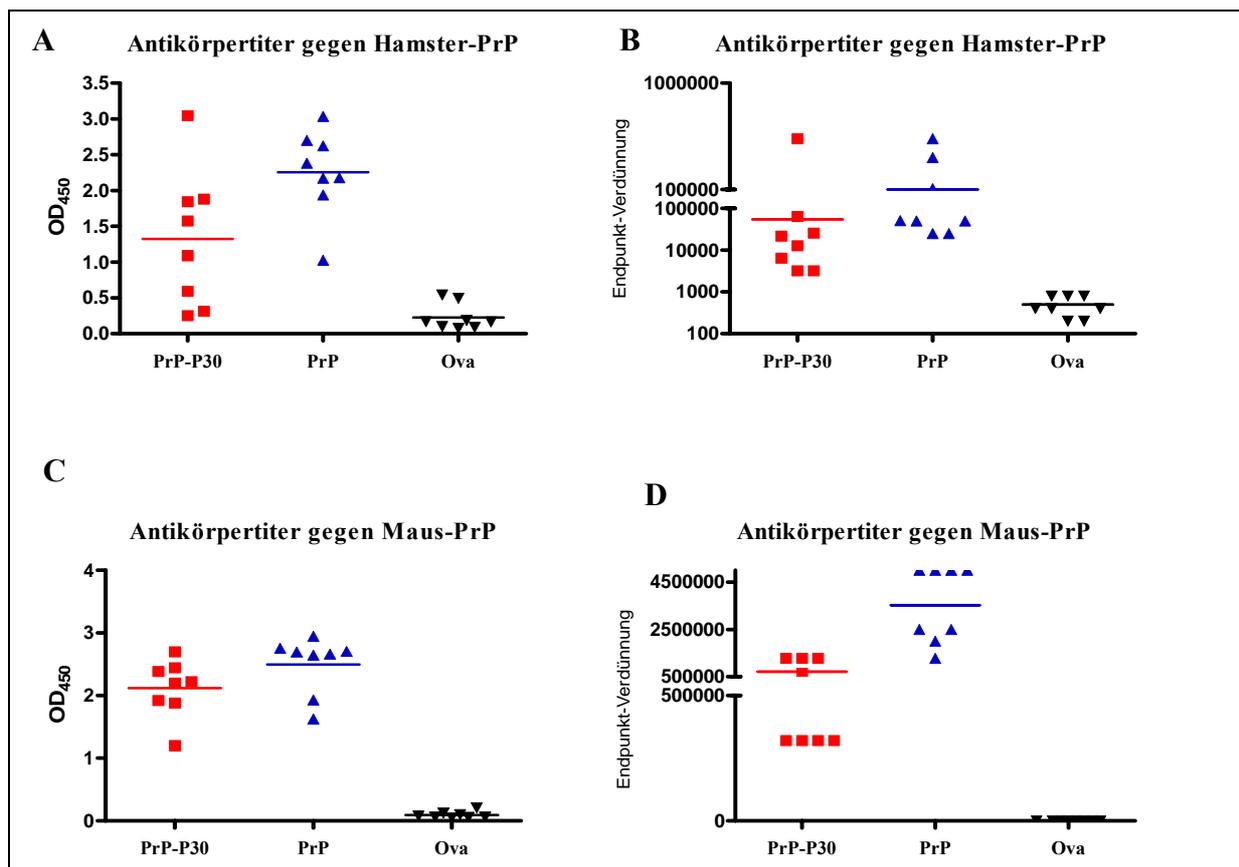


Abbildung 25. Humorale Immunantwort gegen Maus- und Hamster-PrP in den Seren mit rek.PrP- und PrP-P30 immunisierten *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäusen. Dargestellt sind die Titer in den Seren in der Verdünnung 1:800 gegen Hamster-PrP und 1:10000 gegen Maus-PrP (A und C). Mit der Endpunktbestimmung (B und D) konnten ca. 20fach höhere Anti-Maus-PrP als Anti-Hamster-PrP Titer bestimmt werden. (■ = *NSEHa-Prnp^{0/0}* mit PrP-P30 immunisiert, ▲ = *NSEHa-Prnp^{0/0}* immunisiert mit rek.PrP, ▼ = mit Ova immunisierte *NSEHa-Prnp^{0/0}*).

In drei Tieren dieser Gruppe wurde bei dieser Analyse Optische Dichten (ODs) von $>0,7$ gemessen, d.h. in 37,5% dieser Versuchsgruppe konnten keine spezifischen Anti-Hamster-PrP-Antikörper nachgewiesen werden (A). Im Hinblick auf die Induktion Maus-PrP-spezifischer Antikörper lag die Erfolgsquote deutlich höher (C). In allen Seren der mit rek.PrP-immunisierten Gruppe konnten Titer von über 1,0 OD erreicht werden (\emptyset 2,5) und auch in den PrP-P30 Versuchstieren wurden in allen untersuchten Tieren Antikörpertiter höher als 1,0 gemessen (\emptyset 2,1). Die Seren wurden hierfür 1:10000 verdünnt, d.h. es wurde in beiden Gruppen ca. 13fach höhere Anti-Maus-Titer als Anti-Hamster-Titer erreicht. Für eine exaktere Analyse der Immunseren wurden zusätzlich die spezifischen Endpunkte der Hamster-bzw. Maus-PrP-spezifischen Antikörper bestimmt (Abb. 25 B und D). In der Untersuchung wurden Anti-Hamster-PrP-spezifische Antikörper bis zu einer Verdünnung von 1:500000 erreicht, wobei der Durchschnittswert bei 1:100000 für die mit rek.PrP-immunisierten Tiere und 1:80000 bei den mit PrP-P30 vakzinierten Tieren lag. In beiden Gruppen war die Stärke der Immunantwort sehr heterogen wobei es Tiere gab, die nur einen Endpunkt von ca. 1:1500 aufwiesen. Der Titer der Anti-Maus-Antikörper im Endpunkt lag gegenüber den Hamster-Werten deutlich höher. Die rek.PrP-Gruppe erreichte im Durchschnitt Endpunkte von 3000000, wobei in einzelnen Tieren Endpunkte von bis zu 5000000 erreicht wurden. Ähnliche Werte wurden in den mit PrP-P30 immunisierten Tieren beobachtet. Hier lag die Durchschnittsverdünnung der Seren bei 1:500000, was ein 10 fach höherer Wert als für Maus-PrP darstellt. Insgesamt zeigte sich, dass die Immunisierung mit rek.PrP ca. 2-5 fach höhere spezifischere Antikörper in den Seren generierten als die Immunisierung mit dem Fusionskonstrukt PrP-P30. Wie in der ersten Immunisierungsgruppe wurden auch die Immunseren dieser neuen Versuchsgruppen auf Spezifität gegenüber Hamster- und Maus-Prion-Protein durch Konkurrenzexperimente untersucht. Wie unter 4.1.2. beschrieben, wurden die Seren vor Inkubation auf mit Prion-Protein (Hamster-PrP bzw. Maus-PrP) beladenen Mikrotiterplatten mit rekombinantem Protein vorinkubiert. Durch dieses Vorgehen wurden spezifische Anti-PrP-Antikörper in den Seren abgesättigt und die messbare Optische Dichte (OD) im ELISA dadurch erniedrigt. Als positive Konkurrenz wurden die Seren gewertet, die eine mindestens 25%ige Reduktion der Signale im direkten Vergleich zu den mit PBS inkubierten Seren aufwiesen. Abb. 26 zeigt exemplarisch die Auswertung der Spezifität im Serum einer mit PrP-P30 immunisierten Maus nach der vierten Immunisierung. Dieses Tier zeigt eine Reduktion des Hamster-spezifischen Titers nach Vorinkubation des Immunserums mit Hamster-PrP um 75%, bei Vorinkubation mit Maus-PrP um 45% (Abb. 26 A). Auch die Maus-PrP-spezifischen Antikörper in dem Serum konnten durch Präabsorption

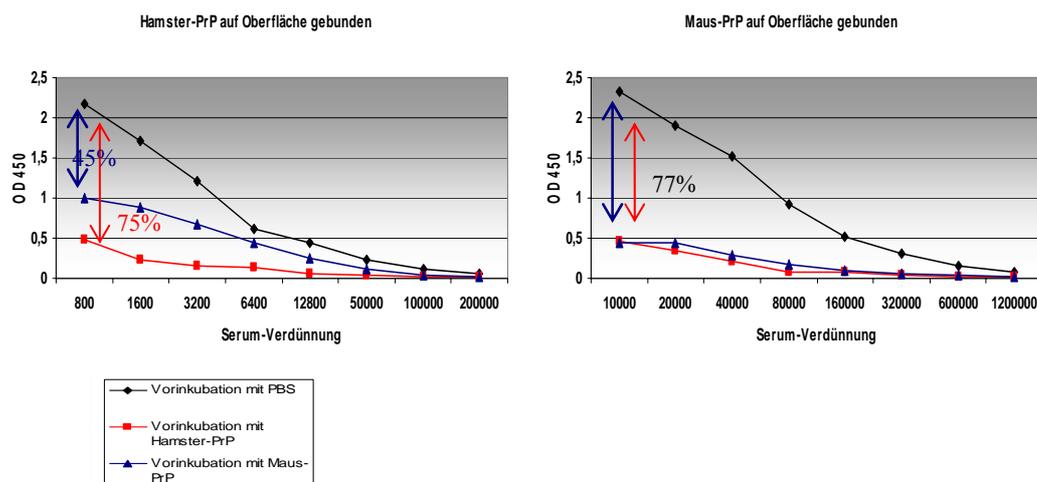


Abbildung 26. Konkurrenz des Immunserums eines mit PrP-P30 immunisierten *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Tieres. Sowohl die Vorinkubation mit Hamster-PrP als auch mit Maus-PrP führten zur Reduktion der Hamster-PrP-spezifischen Titer (linke Abb.) und der Maus-PrP-spezifischen Titer (rechte Abb.) um bis zu 75%.

mit rekombinantem Maus- oder Hamster-PrP abgesättigt werden, was durch eine Reduktion der Antikörpertiter von 77% für beide Proteine zu erkennen war (Abb. 26 B). In Tabelle 7 ist die Auswertung aller durchgeführten Serumneutralisationen der beiden Immunisierungsgruppen zusammengefasst. Der Versuch wurde nur für die Tiere durchgeführt, die im ELISA gegen das Hamster-PrP bei einer OD von 450 einen Titer von 0,7 oder höher erreichten. Die Spezifität sowohl der Anti-Maus als auch der Anti-Hamster-Antikörper konnten in 12 (für Maus-PrP, 75%) bzw. 11 (für HaPrP, 69%) der Seren durch die Konkurrenzexperimente bestätigt werden. Dabei zeigten fünf bzw. zwei der untersuchten Mausseren kreuzreaktive Antikörper gegenüber den artunterschiedlichen Proteinen.

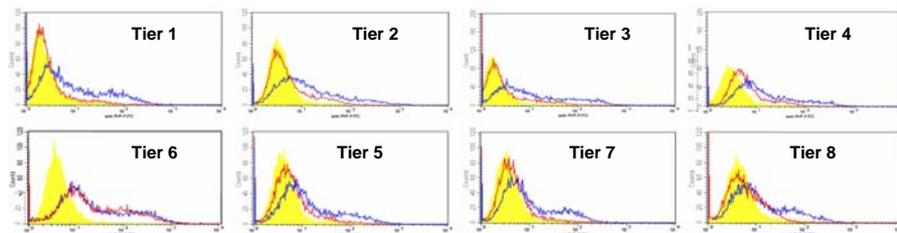
Antigen auf Oberfläche	Vorinkubation mit freiem Antigen	Mit PrP-P30 immunisierte Tiere [Erfolgreiche Konkurrenz/ Gesamtzahl getesteter Tiere]	Mit rek.PrP immunisierte Tiere [Erfolgreiche Konkurrenz/ Gesamtzahl getesteter Tiere]
Maus-PrP	Maus-PrP	6/8	6/8
Maus-PrP	Hamster-PrP	2/8	3/8
Hamster-PrP	Maus-PrP	2/8	0/8
Hamster-PrP	Hamster-PrP	5/8	6/8

Tabelle 7. Auswertung der Konkurrenzexperimente mittels ELISA. 75% bzw. 69% der immunisierten Tiere zeigten für Maus-PrP bzw. Hamster-PrP spezifische Antikörper in den Seren, da sie durch Vorinkubation mit den entsprechenden Proteinen abgesättigt werden konnten. Die Konkurrenz wurde mit Seren nach der vierten Immunisierung durchgeführt.

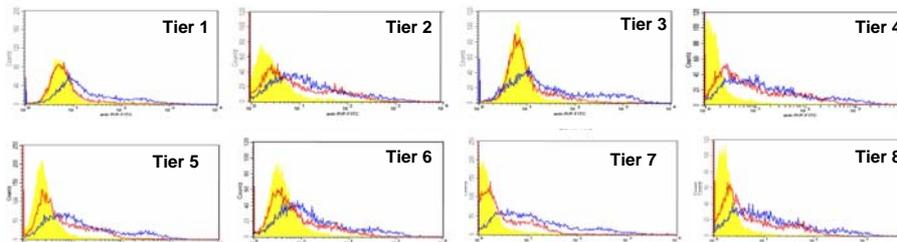
4.1.11 Bestimmung der Spezifität mittels FACS-Analyse

Auch die Seren dieser Immunisierungsgruppen wurden auf die Spezifität gegen natives Hamster-PrP bzw. Maus-PrP getestet (Abb. 27). Hierfür wurde die Immunsere mit 293T-Zellen inkubiert, die transient Maus- (blaue Linie) bzw. Hamster-PrP (rote Linie) an der Oberfläche exprimieren. Die Zellen wurden dafür entweder mit dem Hamster-Prion-Protein exprimierenden Vektor pAdMd-HaPrP bzw. dem Maus-Prion-Protein exprimierenden Vektor pAdMd-MoPrP transfiziert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit pAdMd-LacZ transfiziert wurden und somit eine Expression von β -Galaktosidase aufwiesen.

A) PrP-P30 Gruppe



B) PrP Gruppe



C) Kontrollen

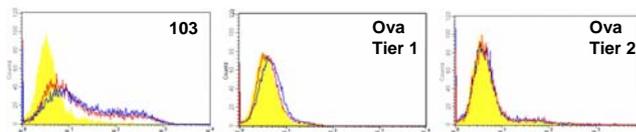


Abbildung 27. Spezifität der Immunsere gegen Hamster- (—) und Maus-PrP (—) auf der Oberfläche von 293T-Zellen im FACS. Alle mit PrP-P30 (A) und rek.PrP-immunisierten Tiere (B) zeigten eine deutliche Bindung an natives Maus-Prion-Protein, wobei nur einzelne Tiere eine Bindung an natives Hamster-PrP aufwiesen. Als Kontrollen dienten Seren von Mäusen, die mit Ovalbumin behandelt wurden (C, Ova) und der monoklonale Anti-PrP Antikörper 103. Gezeigt sind die Ergebnisse nach der fünften Immunisierung in Serumverdünnungen von 1:50.

Alle Immunsere der untersuchten Tiere zeigten eine Verschiebung der Histogramm-Kurven spezifisch für Maus-PrP-exprimierende Zellen zu höheren Intensitäten im Vergleich zu β -Galactosidase-exprimierende Zellen, was auf Bindung der Antikörper an natives Maus-PrP schließen lässt. Im Gegensatz dazu wiesen 12 von 16 Tieren (75%) eine spezifische Bindung

an Hamster-PrP exprimierende Zellen auf. Wie in den Neutralisationsversuchen unterschieden sich hierbei die Seren zwischen und innerhalb der einzelnen Immunisierungsgruppen, wobei mit rek.PrP-immunisierte Mäuse einen höheren Prozentsatz an Hamster-PrP-positiven Signalen aufwiesen als die Tiere, die mit dem Fusionsprotein PrP-P30 vakziniert wurden (7 von 8 bzw. 5 von 8). Auch lagen die Signalintensitäten in der rek.PrP-Gruppe im Vergleich zu den PrP-P30-Tieren deutlich höher. Die Spezifität gegenüber Hamster-PrP im FACS korreliert dabei nur bedingt mit den erhobenen ELISA-Daten (siehe Tabelle 8). So gibt es innerhalb der mit PrP-P30 immunisierten Gruppe Tiere, die im ELISA hohe Endpunkte erreichten, aber im FACS keine Spezifität gegenüber Hamster-PrP aufwiesen (PrP-P30 Gruppe, Tier 1, 3 und 7).

Tier	Endpunkttiter gegen Hamster-PrP (Spezifität im FACS)		Endpunkttiter gegen Maus-PrP (Spezifität im FACS)	
	PrP-P30	rek.PrP	PrP-P30	rek.PrP
1	64000 (-)	50000 (-)	32000 (+++)	1280000 (+++)
2	3200 (+)	25000 (+++)	1280000 (+++)	2500000 (+++)
3	6400 (-)	200000 (+)	320000 (+++)	5000000 (+++)
4	3200 (+)	100000 (+++)	1280000 (+++)	2000000 (+++)
5	12800 (+++)	50000 (+++)	320000 (+++)	5000000 (+++)
6	300000 (+)	25000 (++)	1280000 (+++)	5000000 (+++)
7	128000 (-)	300000 (++)	320000 (+++)	5000000 (+++)
8	256000 (+)	100000 (+++)	6400000 (+++)	2500000 (+++)

Tabelle 8. Vergleich der erreichten Endpunkttiter im ELISA mit der Spezifität der Seren im FACS. Alle Immunsereen zeigen im FACS eine spezifische Bindung an natives Maus-PrP, wohingegen die Bindung an Hamster-PrP nur teilweise nachzuweisen ist. Die Höhe der Endpunkttiter korreliert dabei nur teilweise mit den FACS-Daten (PrP-P30 Gruppe). (Stärke der Bindung an PrP^C im FACS: +++ = sehr starke Bindung, ++ = starke Bindung, + = schwache Bindung, - = keine Bindung an natives PrP^C im FACS).

4.1.12 Spezifität der Immunsereen im Westernblot

Im vorangegangenen Versuch wurde bestätigt, dass die Antikörper in den Immunsereen der behandelten Hamster-transgenen Mäuse in der Lage waren, die native Form des Maus-PrP zu binden und zumindest einige Seren die zelluläre Form des Hamster-Prion-Proteins auf 293T-Zellen erkannten. Jetzt sollte wie im Ansatz zuvor überprüft werden, ob diese Antikörper auch in der Lage sind die zelluläre, denaturierte Form des Prion-Proteins im Westernblot zu erkennen. Für die Analyse wurden nur Seren der Tiere verwendet, die im ELISA gegen das Hamster-PrP bei einer Verdünnung von 1:800 eine OD von >1,0 zeigten. Es wurden wieder

10%ige Gehirnhomogenate von PrP-defizienten Mäusen (*Prnp^{0/0}*), Homogenate von wildtypischen C57BL/6-Mäusen und Homogenate von Hamstergehirnen hergestellt. Wie Abb. 28 zu entnehmen, waren alle getesteten Seren in der Lage das Maus-Prion-Protein aus dem Wildtyp-Hirnhomogenat (Spuren 3) zu detektieren, was eine Bestätigung der erhaltenen FACS-Ergebnisse darstellt. Beide Immunisierungsproteine waren in der Lage, Maus-PrP-spezifische Antikörper in den Tieren zu induzieren. Von den getesteten Seren zeigte allerdings nur ein einzelnes Tier im Westernblot eine spezifische Bindung an die Hamster-Form des Prion-Proteins (Spuren 1, Tier 6 aus PrP-P30-Gruppe). Durch die interne Kontrolle, den Auftrag von PrP-Knockout Gehirnhomogenat (Spuren 2), wurden unspezifische Bindungen ausgeschlossen, da in keinem der Experimente ein Signal detektiert werden konnte. Die Spezifität der Seren wurde wiederum durch ein fehlendes Signal bei Verwendung von Seren von mit Ovalbumin immunisierten Mäusen bestätigt (C, Ova). Als Positivkontrolle diente der monoklonale Antikörper 3F4, welcher spezifisch das Hamster-Prion-Protein im Westernblot detektiert (C, 3F4).

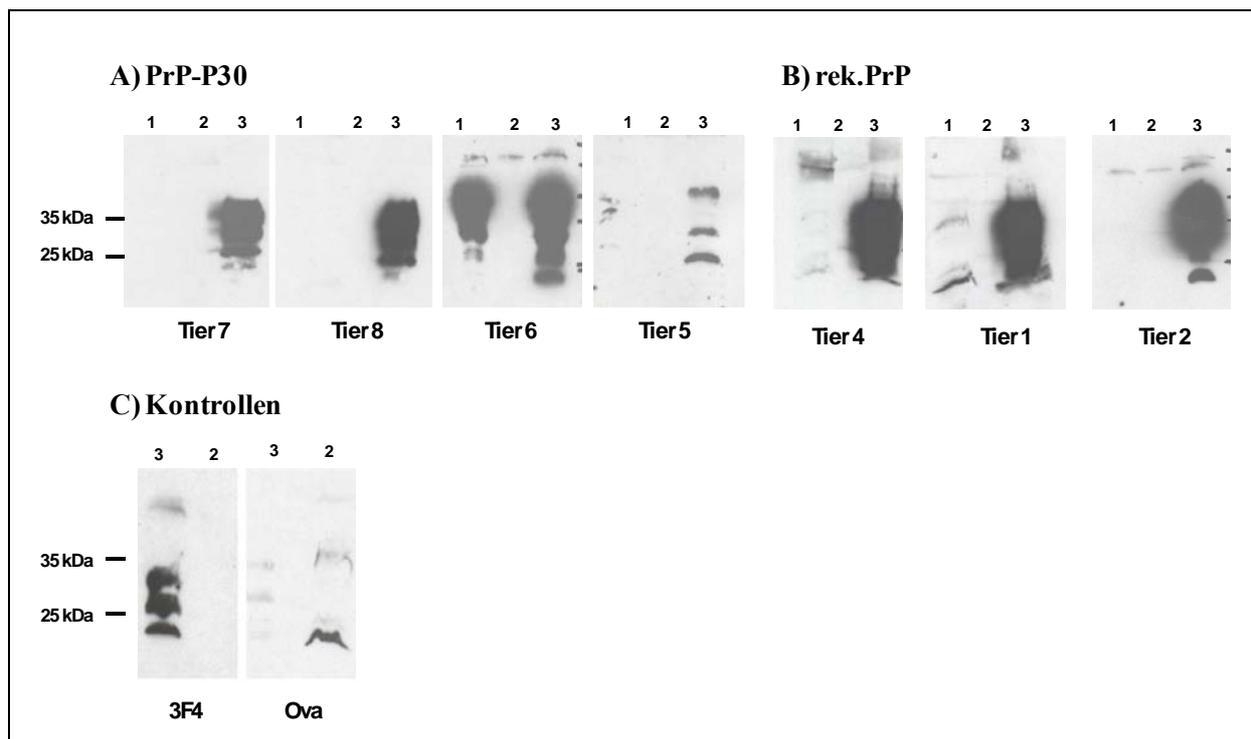
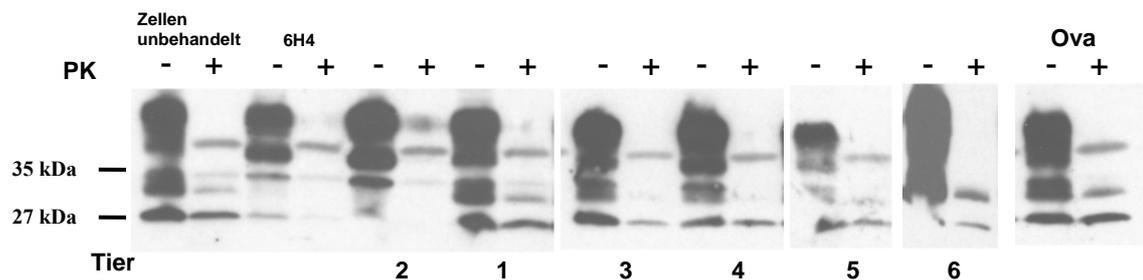


Abbildung 28. Westernblotanalyse ausgewählter Immunsereen für die Spezifität gegenüber Hamster- und Maus-Prion-Protein. Aufgetragen wurden jeweils 150µg Gesamtprotein aus 10%igen Hamster-Gehirnhomogenaten (Spuren 1), Hirnhomogenate aus PrP-defizienten Mäusen (Spuren 2) und Homogenate aus C57BL/6-Tieren (Spuren 3). Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:1500 aufgetragen. Alle untersuchten Seren zeigten eine spezifische Bindung an Maus-PrP, jedoch konnte nur bei einem Tier aus der PrP-P30-Gruppe eine Bindung an Hamster-PrP nachgewiesen werden (Tier 6).

4.1.13 Die Immunsereen sind in der Lage die PrP^{Sc} Akkumulation *in vitro* zu inhibieren

Im nächsten Schritt wurde wieder die Fähigkeit der Anti-PrP-Immunsereen untersucht, die Prionenreplikation in mit Scrapie-infizierten Zellen (ScN2a-Zellen) zu hemmen. Die Zellen wurden hierfür fünf Tage lang mit den Seren der immunisierten Mäuse behandelt (Verdünnung 1:1500) und der PrP^{Sc}-Gehalt nach erfolgter Westernblot-Analyse qualitativ bestimmt, wobei jeweils 100µg Gesamtprotein aufgetragen wurde. Die in Abbildung 29 dargestellten Ergebnisse wurden mehrere Male reproduziert und bestätigt. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit Seren von mit Ovalbumin-behandelten Tieren unter den gleichen Bedingungen inkubiert bzw. unbehandelte Zellen mit aufgetragen. Der monoklonale Anti-PrP-Antikörper 6H4 diente als Positivkontrolle und wurde in einer Konzentration von 1µg zu den Zellen gegeben. Die Wirkung dieses Antikörpers auf die Prionenreplikation wurde bereits in anderen Studien gezeigt (Enari et al., 2001; Heppner et al., 2001).

A) PrP-P30



B) PrP

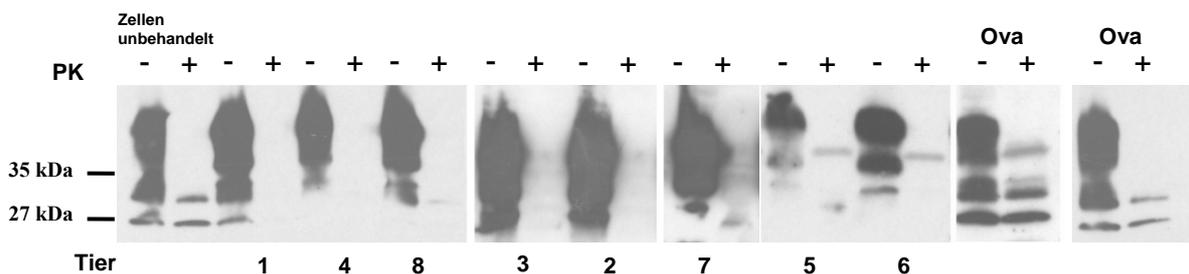


Abbildung 29. Reduktion der PrP^{Sc}-Akkumulation in ScN2a-Zellen durch Anti-PrP Antikörper aus den Immunsereen mit PrP-P30 (A) und rek.PrP-immunisierten Tieren (B). Die ScN2a-Zellen wurden für fünf Tage mit den Seren behandelt und im Westernblot analysiert (100µg Gesamtprotein). Als Positivkontrolle wurde der Antikörper 6H4 verwendet und als Negativkontrolle Seren aus mit Ova-behandelten Tieren sowie unbehandelte Zellen. Zur Detektion des PrP^{Sc}-Gehaltes wurden alle Zellysate mit Proteinase K behandelt und neben unverdauten Lysaten aufgetragen (+PK, -PK). Die Analyse erfolgte mit dem polyklonalen Antikörper SA2124 in der Verdünnung 1:5000.

Insgesamt wurden 14 Seren getestet, wobei nur sechs Seren aufgrund mangelnder Verfügbarkeit aus der PrP-P30-Gruppe und alle Seren aus der rek.PrP-Versuchsgruppe verwendet wurden. Von den 14 Immunsereen hatten 9 einen starken Einfluss auf die PrP^{Sc}-Akkumulation, was einer Erfolgsquote von 64% entspricht. Auch hierbei dominierten die Seren aus der rek.PrP-Gruppe, von denen alle eine Hemmung auf die Replikation zeigten. Aus der Gruppe der mit PrP-P30 vakzinierten Tier hingegen zeigte nur ein einzelnes Tier (Abb. 29 A, Tier 2) eine deutliche und signifikante Abnahme im Gehalt von PrP^{Sc} im Vergleich zu den durchgeführten Kontrollen (Zellen unbehandelt, Ova, Abb. 29 A und B).

4.1.14 Einfluss der Proteinimmunisierung auf die Proliferation von T-Lymphozyten

Vor der Analyse der spezifischen Proliferation von T-Zellen nach *in vitro* Stimulierung mit Hamster- und Maus-PrP sollte zuerst untersucht werden, ob die rekombinanten Proteine einen direkten Einfluss auf die Differenzierung von Dendritischen Zellen (DCs) ausüben. Hierfür wurden Monozyten aus dem Knochenmark einer C57BL/6 Maus in Gegenwart von entweder Hamster- oder Maus-PrP (10µg) und rek.GM-CSF (5 ng/ml) für 7-8 Tage kultiviert. Die daraus resultierenden DC-Populationen wurden in einer FACS-Analyse untersucht (Abb. 30).

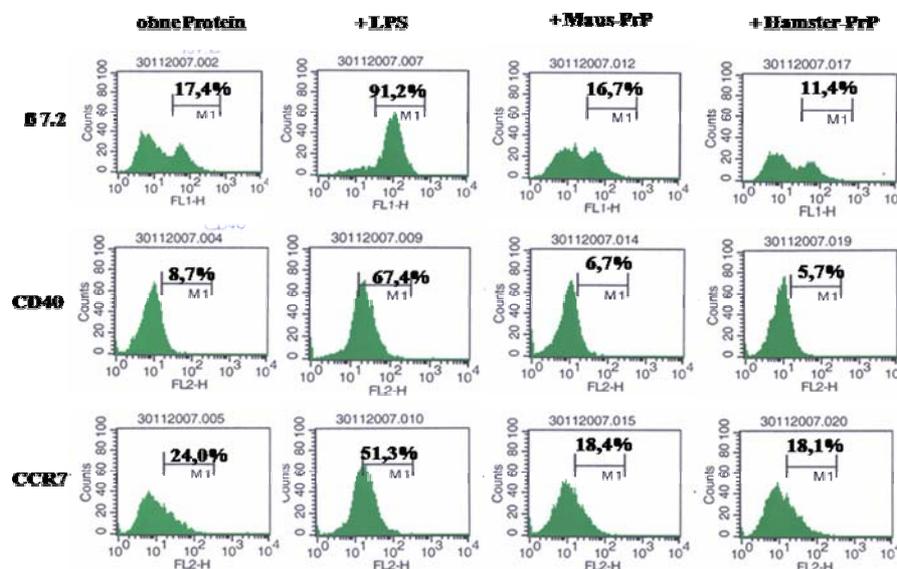


Abbildung 30. Einfluss von Maus- und Hamster-PrP auf die Differenzierung von dendritischen Zellen. Es wurde der Einfluss der Prion-Proteine auf die Fähigkeit Dendritische Zellen (DCs) aus Knochenmark-Vorläuferzellen zu generieren, untersucht. Die Knochenmark-Kulturen wurden 8 Tage in Gegenwart von Maus- oder Hamster-PrP (je 10 µg) und IL-4 (1 ng/ml) inkubiert, wobei ein Teil der DCs für 24 h mit LPS (1 µg) aktiviert wurde. Anschließend wurde der DC-Phänotyp über die Expression der Oberflächenmarker β 7.2, CD40 und CCR7 in einer FACS-Analyse bestimmt.

Beide Präparationen führten zu einer Ausbildung des typischen Phänotyps unreifer DCs ($CD40^{lo}$, $\beta 7.2^{lo}$, $CCR7^{lo}$ ($lo = „low\ expression“$, geringe Expression). All diese Oberflächenmarker wurden nach LPS-Stimulation hochreguliert (+LPS, Abb. 30). Keine Ausdifferenzierung der DCs wurde hingegen nach Zugabe der beiden rekombinanten Prion-Proteine beobachtet (+ Maus bzw. + Hamster-PrP). Nachdem kein unspezifischer Einfluss der Prion-Proteine auf die Entwicklung von DCs beobachtet werden konnte, wurde untersucht, ob eine T-Zellaktivierung, möglicherweise durch verstärkte Antigenaufnahme bzw. -präsentation, durch die Immunisierung mit rek.PrP bzw. PrP-P30 induziert werden kann. Hierzu wurden Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten der immunisierten Tiere isoliert. Diese Lymphozyten wurden mit dem Farbstoff Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester (CFSE) markiert und in Gegenwart von Hamster-PrP bzw. Maus-PrP in einer Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$ kultiviert. Der Anteil der proliferierenden CD4- und CD8-positiven T-Zellen wurde über die Verminderung der Intensität des CFSE-Farbstoffes in einer FACS-Analyse bestimmt (Abb. 31 + 32).

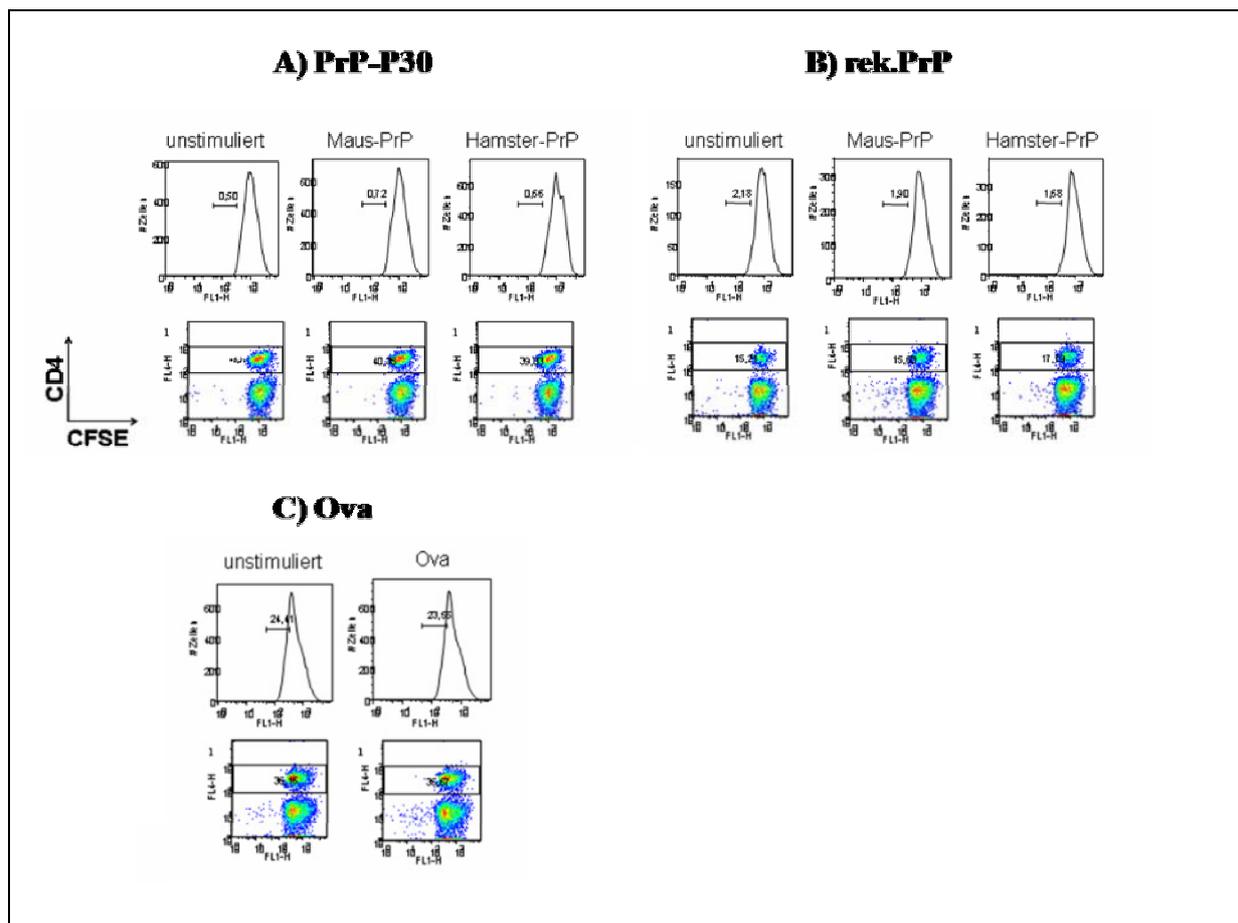


Abbildung 31. Nach *in vitro* Stimulierung mit Hamster-oder Maus-PrP bzw. Ovalbumin kommt es zu keiner spezifischen Proliferation von CD4-positiven Zellen aus den Lymphknoten immunisierter Mäuse.

Dies gab indirekt Aufschluss darüber, ob die eingesetzten Proteine für die Immunisierung von APCs aufgenommen und präsentiert wurden, und dies zu einer Aktivierung der PrP-spezifischen T-Zellen führt. Der Proliferationstest ergab, dass CD4-positive Zellen sowohl aus den Lymphknoten (Abb. 31) als auch aus der Milz der Tiere (Abb. 32), die mit rek.PrP, PrP-P30 und zusätzlich CpGs-1826 immunisiert worden waren, nach spezifischer Stimulation mit den rekombinanten Proteinen keine bzw. nur eine geringe Proliferation aufwiesen. Das gleiche Ergebnis erhielt man bei der Analyse von CD8-positiven T-Zellen. Auch diese wiesen nach der *in vitro* Stimulierung keine signifikante Proliferation auf (nicht gezeigt).

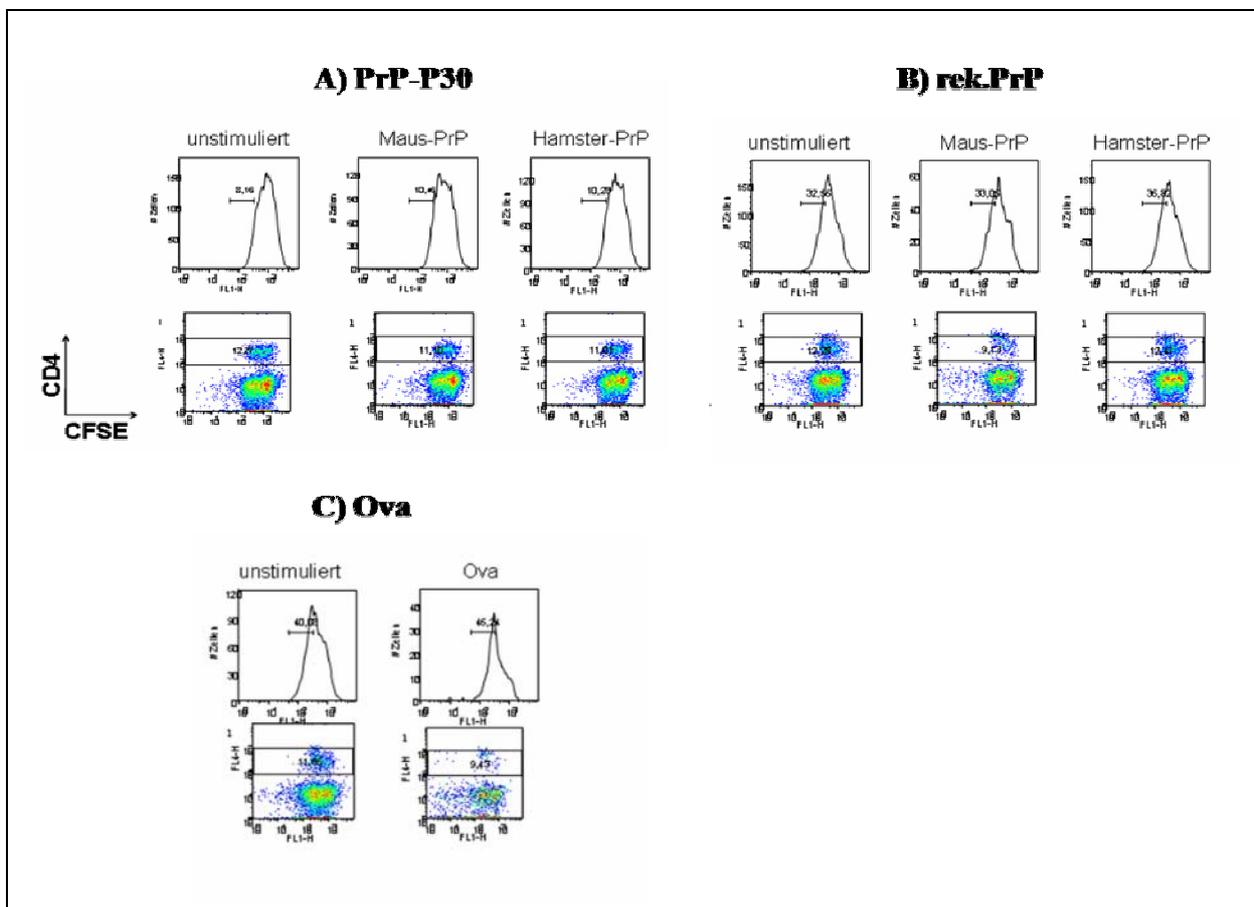


Abbildung 32. Nach *in vitro* Stimulierung mit Hamster-oder Maus-PrP bzw. Ovalbumin kommt es zu keiner spezifischen Proliferation von CD4-positiven Zellen aus den Milzzellen immunisierter Mäuse.

4.2 Analyse der Funktion der apoptotischen Proteine BAX und BCL-2 in der Prionenpathogenese

Eine Infektion mit Prionen führt zu charakteristischen neuropathologischen Veränderungen im zentralen Nervensystem von betroffenen Individuen. Dazu gehören unter anderem spongiforme Veränderungen, die Aktivierung von Mikroglia, die Proliferation von Astrozyten und letztendlich das Absterben von Neuronen (Aguzzi et al., 2007). Die genauen Mechanismen, welche zum Absterben von Neuronen führen, sind noch unbekannt. Allerdings scheinen Apoptosemechanismen bei der Pathologie von Prionenerkrankung involviert zu sein (Sikorska, 2004; Westergard et al., 2007).

Die Proteine BAX und BCL-2 spielen in mitochondrialen apoptotischen Signalvorgängen eine Schlüsselrolle und es wurde gezeigt, dass die Höhe der Expression beider Proteine in Gehirnen von mit Scrapie-infizierten Hamstern verändert ist (Park et al., 2000). Das proapoptotische Protein BAX ist bei einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen involviert und seine Reduktion oder der Verlust von BAX führt zur Abschwächung der Symptome in diesen Krankheiten (Chiesa et al., 2005; Gould et al., 2006; Heitz et al., 2007; Li et al., 2007). Weiterhin wurden durch yeast-Two-Hybrid-Experimente gezeigt, dass die zelluläre Form von PrP an den C-Terminus des BCL-2 Proteins bindet (Kurschner and Morgan, 1995). Diese Interaktion kann der BAX-induzierten Apoptose entgegenwirken (Bounhar et al., 2001).

Das Ziel in diesem Teil der Arbeit war es, die Rolle der apoptotischen Proteine BAX und BCL-2 in der Prionenpathogenese zu untersuchen. Hierfür wurde embryonales Neuroektoderm aus BAX- und BCL-2 Knockout-Mäusen ($BAX^{-/-}$, $BCL-2^{-/-}$) in das Gehirn von $Prnp^{0/0}$ -Mäusen intrazerebral transplantiert und anschließend mit Prionen inokuliert. PrP-defiziente Mäuse ($Prnp^{0/0}$) sind nicht mit Prionen infizierbar und somit ist die Replikation und die Pathologie auf das PrP^C-exprimierende Transplantat beschränkt, während die Empfängertiere klinisch gesund bleiben. Durch immunhistochemische Untersuchungen der Transplantate sollte herausgefunden werden, ob und welchen Einfluss das Fehlen von BAX und BCL-2 auf die Prionenpathogenese besitzt.

4.2.1 Genotypisierung der Embryonen und Transplantation von neuroektodermalem Gewebe

Um den Einfluss der apoptotischen Faktoren BAX und BCL-2 auf die Prionenpathogenese zu untersuchen, wurde neuroektodermales Gewebe von *BAX*- bzw. *BCL-2*-defiziente Embryonen verwendet (Knudson et al., 1995; Veis et al., 1993). Dazu wurden *BAX*^{+/-} und *BCL-2*^{+/-}-Mäuse untereinander zeitlich verpaart und die Embryonen am Embryonaltag 12,5-13,5 gewonnen. Aus den Embryonen wurde mithilfe eines Stereomikroskops das Telencephalon präpariert und von Bindegewebshäuten befreit. Die neuroektodermale Anlage wurde dann in das Caudoputamen bzw. in einen Seitenventrikel von 8-10 Wochen alten *Prnp*^{0/0}-Empfängermäusen transplantiert. Das restliche embryonale Gewebe wurde für die Genotypisierungen verwendet. Es resultierten Embryonen mit folgenden Genotypen: *BAX*^{-/-}, *BAX*^{+/-}, *BCL-2*^{-/-}, *BCL-2*^{+/-} und Wildtyp (WT). Abb. 33 zeigt Beispiele der Genotypisierungen von BAX bzw. BCL-2 neuroektodermalen Geweben. Das für *BAX*-defiziente Allel zeigt im Gel gegenüber dem wildtypischen Allel eine niedrigere elektrophoretische Mobilität.

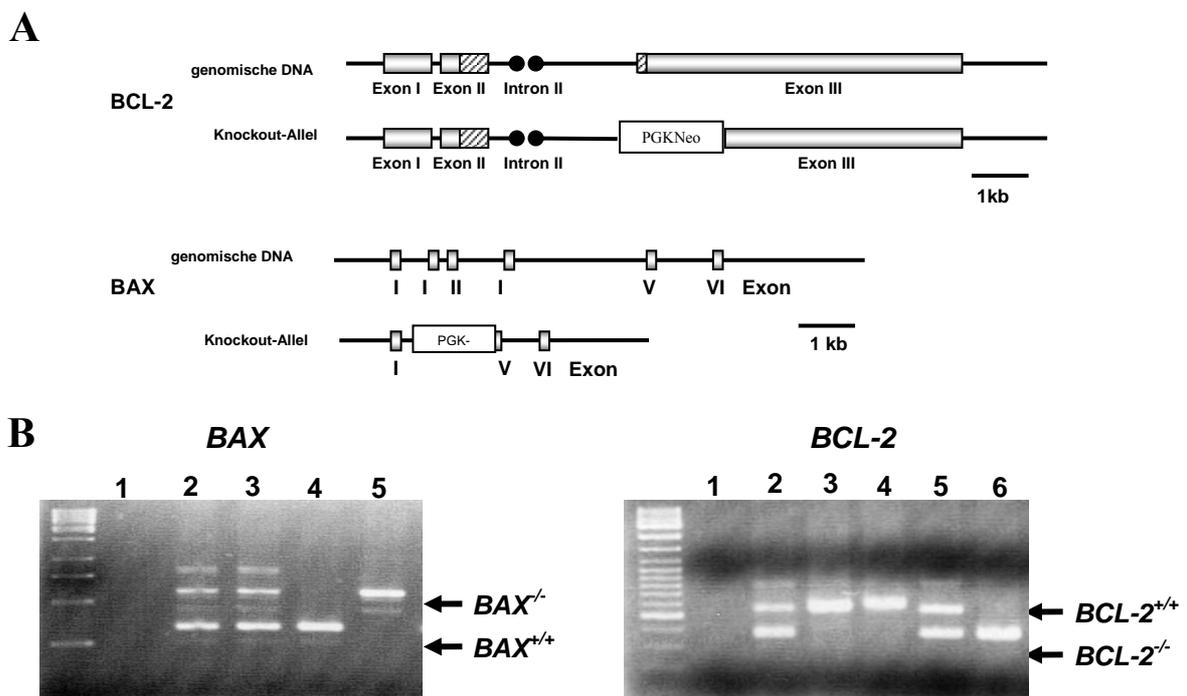


Abbildung 33. PCR-Analyse der Transplantate. A) Schematische Karte der genetischen Loci von *BAX*- und *BCL-2* mit den entsprechenden Knockout-Allelen. B) Ergebnis der *BAX*-Genotypisierungen. Das Knockout-Allel zeigt gegenüber dem Wildtyp-Allel in der Elektrophorese eine niedrigere elektrophoretische Mobilität. 1. Kontrolle, ohne DNA, 2. + 3. *BAX*^{+/-}, 4. Wildtyp, 5. *BAX*^{-/-}. B) Ergebnis der *BCL-2*-Genotypisierungen. Das *BCL-2*-Knockout-Allel zeigt gegenüber dem wildtypischen Allel eine höhere Mobilität im Gel. 1. Kontrolle, ohne DNA, 2. + 5. *BCL-2*^{+/-}, 3. + 4. Wildtyp, 6. *BCL-2*^{-/-}.

Das für BCL-2-defiziente Allel weist eine höhere Mobilität im Gel auf als das für BCL-2 wildtypische Allel (Abb. 33 B). Insgesamt wurden 66 *Prnp^{0/0}*-Mäuse mit neuroektodermalem Gewebe von Embryonen verschiedener Genotypen transplantiert (Tabelle 9). Hiervon waren 10 bzw. 11 Transplantate defizient für das BAX bzw. BCL-2-Allel und 6 bzw. 19 heterozygot für das entsprechende Gen. Als Kontrolle dienten 20 Tiere, die mit wildtypischem neuroektodermalem Gewebe transplantiert wurden.

Genotyp des transplantierten neuroektodermalen Gewebes	<i>BAX^{-/-}</i>	<i>BAX^{+/-}</i>	<i>Wildtyp</i>	<i>BCL-2^{-/-}</i>	<i>BCL-2^{+/-}</i>
Anzahl der erfolgreich transplantierten <i>Prnp^{0/0}</i> -Tiere/ Gesamtzahl der transplantierten Tiere	6/10	1/6	6/20	3/11	6/19

Tabelle 9. Anzahl der mit *BAX*- bzw. *BCL-2* neuroektodermalem Gewebe transplantierten und inokulierten *Prnp^{0/0}*-Tiere.

4.2.2 Seren von transplantierten Empfängertieren zeigen eine spezifische Anti-PrP-Immunantwort

Die Transplantation von PrP^C-exprimierendem Gewebe in *Prnp^{0/0}*-Empfängertiere führt zu einer humoralen Immunantwort (Brandner et al., 1996b). Um die erfolgreiche Transplantation des PrP-exprimierenden, für BAX- bzw. BCL-2-defizienten Gewebes in PrP-Knockout Mäuse zu überprüfen, wurde sechs Wochen nach der Transplantation Blutproben der transplantierten Mäuse genommen und mittels ELISA auf PrP^C-spezifische Antikörper untersucht (Verdünnung 1:250, Abb. 34). Als Positivkontrolle wurde der monoklonale Antikörper 6H4 verwendet, der im Bereich der Helix-1 des Prion-Proteins bindet. Es konnten PrP-spezifische Antikörper innerhalb jeder Gruppe der Tiere, welche Transplantate unterschiedlicher BAX- bzw. BCL-2-Genotypen erhielten, nachgewiesen werden. In 37 der insgesamt 66 transplantierten Tiere (56%) wurden Antikörpertiter erreicht, die bei einer 1:250 Serumverdünnung eine Optische Dichte (OD, 450 nm) von 0,5 oder höher zeigten und welches auf eine erfolgreiche Transplantation des PrP-exprimierenden Gewebes hinwies. Nichttransplantierte *Prnp^{0/0}*-Tiere zeigten keine spezifischen Antikörpertiter gegen das Prion-Protein und dienten als Negativkontrolle. Ebenfalls konnte in 44% der transplantierten Tiere keine PrP-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.

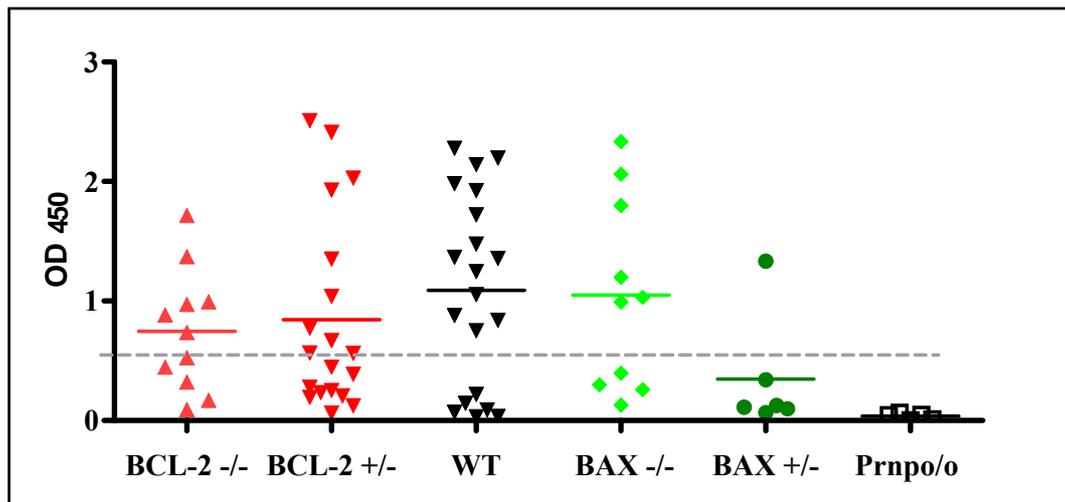


Abbildung 34. Anti-PrP-Titer in Seren von *Prnp^{0/0}*-Mäuse mit PrP-exprimierenden neuroektodermalen Transplantaten. Dargestellt sind Anti-PrP Antikörper im Blut der *Prnp^{0/0}*-Tiere sechs Wochen nach der Transplantation in der Verdünnung 1:250. 56% der transplantierten Tiere zeigten spezifische Anti-PrP-Antikörpertiter im Serum mit einer OD höher als 0,5 (gestrichelte Linie), was auf eine erfolgreiche Transplantation hinweist.

4.1.1 Analyse der Transplantate

70-81 Tage nach der Transplantation wurden erste Gehirne aserviert und die Transplantate histologisch untersucht. Abb. 35 zeigt am Beispiel eines *BAX^{-/-}*-Transplantats die Lage des transplantierten Gewebes im Wirtsgewebe mit Hilfe einer Hämatoxylin-Eosin-(HE) Färbung.

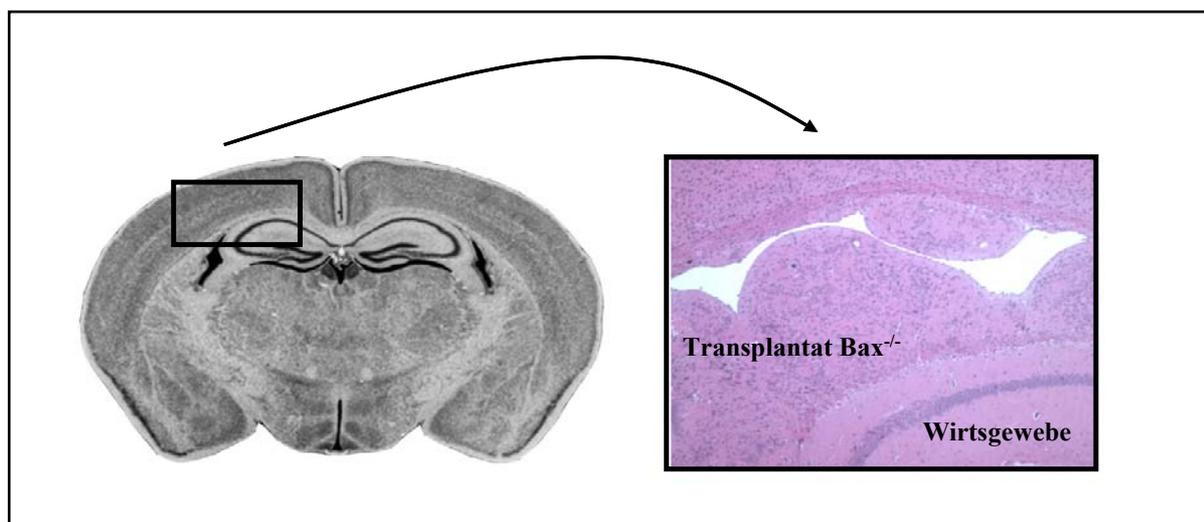


Abbildung 35. Typische Position eines PrP^C-exprimierenden Transplantats im Seitenventrikel des Gehirns einer *Prnp^{0/0}* Empfängermaus. Die Hämatoxylin und Eosin (HE) Färbung dieses *BAX^{-/-}*-Transplantats 70 Tage nach Transplantation zeigt die deutliche Abgrenzung zwischen dem ausdifferenzierten Transplantat und dem umgebenden Wirtsgewebe.

Das neuroektodermale Gewebe ist im Seitenventrikel des *Prnp*^{0/0}-Empfängertieres lokalisiert und zeigt einen Differenzierungs- und Reifungsgrad ähnlich dem umgebenden Gewebe. Lymphozytenansammlungen oder das Auftreten nekrotischen Gewebes wurden nicht beobachtet, welche ein typisches Zeichen von Abstoßungsreaktionen darstellen. Jeweils sechs bis acht Wochen nach der Transplantation wurden die Tiere intrazerebral mit Mausprionen (RML) in einer Konzentration von 7log LD₅₀ inokuliert (Abb. 36). Nach Inkubationszeiten zwischen 206-376 Tagen wurden die Tiere getötet und das Gehirn für histologische Untersuchungen verwendet.

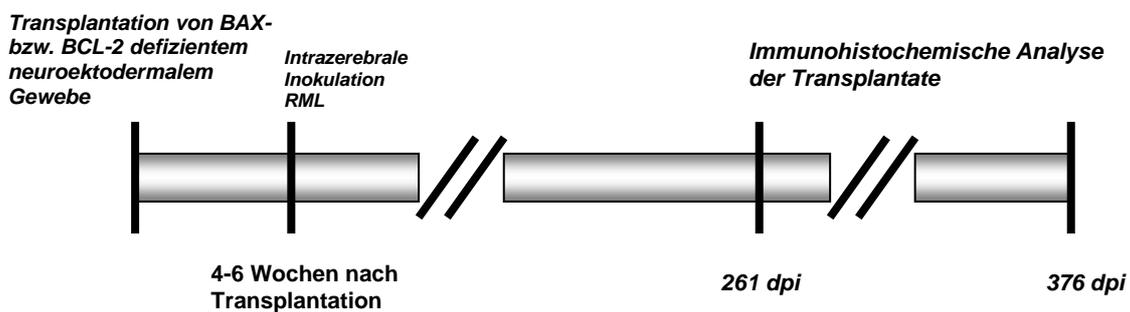


Abbildung 36. Zeitverlauf der Transplantation und Analyse. 4-6 Wochen nach der Transplantation mit *BAX*- und *BCL-2*-defizientem Neuroektoderm wurden die Tiere mit Mausprionen (RML) infiziert und im Zeitraum von 261-376 Tage nach Inokulation immunhistochemisch auf typische Charakteristika der Prionenpathogenese untersucht.

4.1.1.1 Nachweis von PrP^{Sc} in neuroektodermalen Transplantaten

Nach Inokulation wurden die *Prnp*^{0/0} Tiere, welche mit unterschiedlichen *BAX*- bzw. *BCL-2*-defizienten neuroektodermalen Gewebe transplantiert wurden, im Zeitraum zwischen 206-376 Tage nach Infektion mit Prionen analysiert. Die Tiere blieben über den beobachteten Zeitraum klinisch unauffällig. Nach dieser Zeit konnte in Paraffinschnitten des Gehirnes, welche mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurden, in 22 Tieren das Transplantat detektiert werden. Das transplantierte Gewebe konnte hierbei klar von dem Gewebe des Empfängertieres abgegrenzt werden (Abb. 37 A, gestrichelte Linie). Die Mehrzahl der Transplantate wurde im Seitenventrikel oder Caudoputamen der Empfängertiere detektiert. Für den Nachweis von PrP^{Sc} in den neuroektodermalen Transplantaten wurde die Petblot-Technik verwendet. Mit Proteinase-K-Verdau wurde dabei die Ansammlung von PK-resistentem PrP^{Sc} in den betroffenen Bereichen sichtbar gemacht. Die mit RML-inokulierten Transplantate zeigen eine

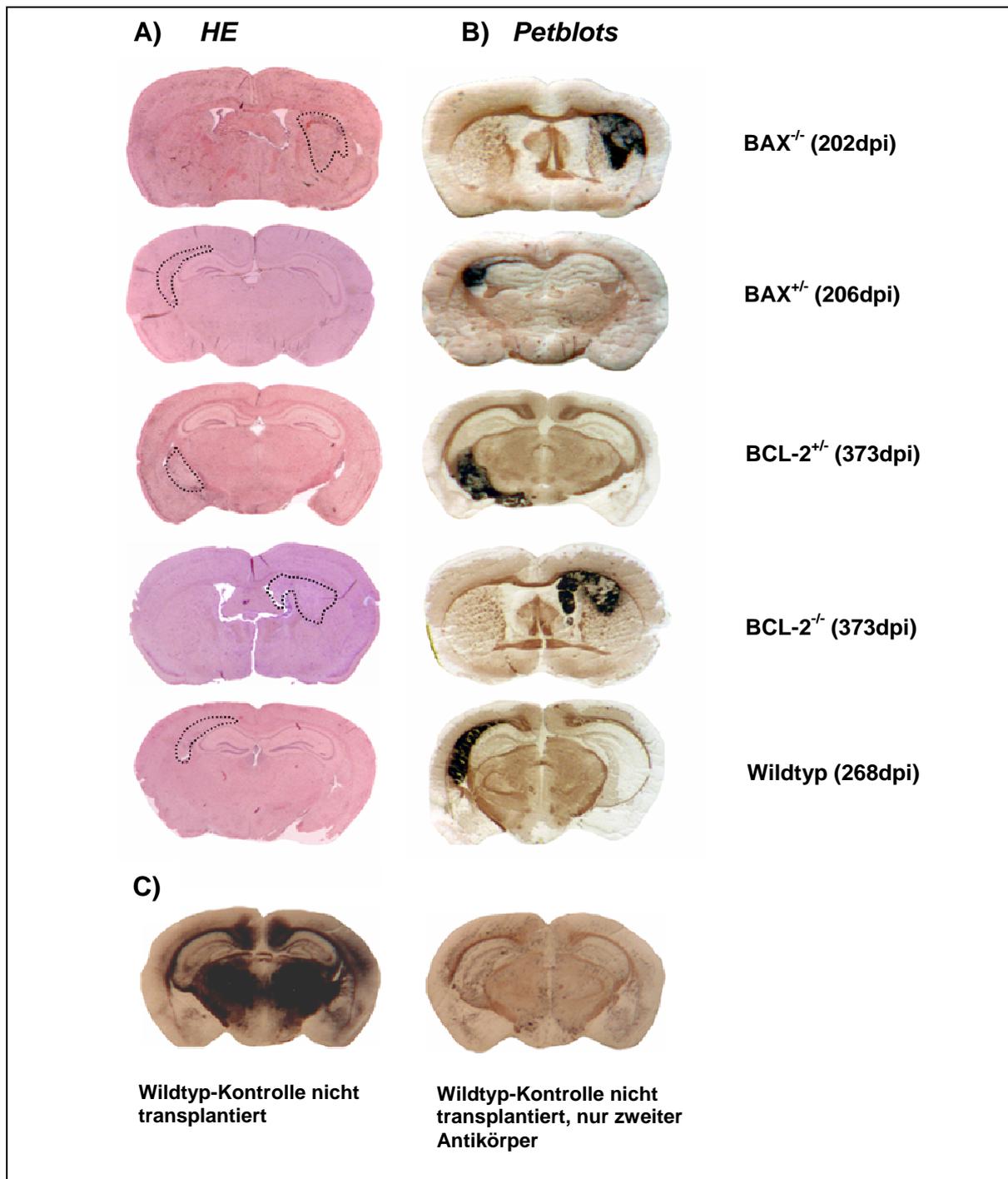


Abbildung 37. Detektion von PrP^{Sc} in transplantiertem neuroektodermalem Gewebe mit der Petblot-Technik A) Paraffinschnitte mit intraparenchymal gelegenen Transplantaten (gestrichelte Linie). B) Petblots der Transplantate nach Proteinase-K Verdau. Die Ablagerung von Proteinase-K resistentem PrP kann in allen Transplantaten der unterschiedlichen BAX und BCL-2 Genotypen nachgewiesen werden. C) Petblot-Kontrollen, Wildtyp (C57BL/6), inokuliert, nicht transplantiert, Proteinase-K verdaut (obere Abb.) und nur mit Zweitantikörper inkubiert (untere Abb.).

starke PrP-Immunreaktivität im Bereich des transplantierten, PrP^C-exprimierenden Gewebes (Abb. 37 B). Hinsichtlich der Stärke der PrP^{Sc}-Akkumulation sind zwischen den einzelnen BAX- und BCL-2 defizienten Transplantaten trotz abweichenden Inkubationszeiten (dpi in

Klammern) keine Unterschiede erkennbar. Als Kontrolle diente ein nicht-transplantiertes, infiziertes, wildtypisches (C57BL/6) Tier. Die Akkumulation von PrP^{Sc} war beim Wildtyp über den gesamten Bereich des Gehirnes zu erkennen. Im Gegensatz zu den transplantierten Tieren kommt es hier zu einer diffusen Färbung von PrP^{Sc} vor allem im Bereich der grauen Substanz (C), konsistent mit der starken Expression von PrP in dieser Region. Als Negativkontrolle wurde ein Folgeschnitt nur mit dem Zweitantikörper inkubiert und führte zu keiner spezifischen PrP^{Sc}-Detektion.

4.1.1.2 Immunhistochemische Analyse der Transplantate

Eine pathogene Eigenschaft von Prionenerkrankung ist das Vorhandensein von spongiformen Veränderungen, welche durch das Auftreten von Vakuolen im Neuropil des ZNS charakterisiert sind. Die auftretenden Vakuolen variieren dabei in ihrer Größe zwischen 20 und 200µm. Obwohl noch nicht bekannt ist, ob diese Vakuolisierung des Neuropils direkt mit neuronalem Zelltod in Zusammenhang steht (Armstrong et al., 2003; Masters and Richardson, 1978) ist das Auftreten von Vakuolen ein Zeichen von neuronalen Veränderungen (Jeffrey et al., 1992). Die Vakuolisierung konnte in den einzelnen infizierten Transplantaten in der HE-Färbung dargestellt werden, wobei die Pathologie auf das Transplantat beschränkt und nur in diesen Bereichen die Zellarchitektur des Gewebes zerstört war (Abb. 38 A, HE in unterschiedlicher Vergrößerung). Abb. 38 zeigt eine Übersicht über die Transplantate der verschiedenen BAX- und BCL-2 Genotypen zu den Zeitpunkten 202 (BAX^{-/-}, BAX^{+/-}), 268 (Wildtyp) und 373 Tagen (BCL-2^{-/-}, BCL-2^{+/-}) nach Inokulation. Nach dieser Zeit entwickelten alle Transplantate intrazerebral infizierter Tiere die typischen histopathologischen Eigenschaften einer schweren Scrapie-Enzephalopathie. Die spongiformen Veränderungen mit dem damit verbundenen Absterben von Neuronen sind in diesem späten Stadium der Krankheit als Spongiose zu bezeichnen. Im Vergleich zu Transplantaten mit wildtypischem Genotyp (B) konnten keine Unterschiede in Hinsicht auf Stärke der spongiformen Veränderung oder Größe der Vakuolen erkannt werden.

Spongiforme Veränderungen im Gehirn sind mit Neuronenverlust und Gliose von sowohl Astrozyten als auch Mikroglia verbunden. Die Analyse der Transplantate zeigt eine starke astrozytäre Gliose, gekennzeichnet durch eine hohe Expression des sauren Gliafaserproteins (GFAP). Im Vergleich des Gewebes ist kein Unterschied innerhalb der Gruppen und zu dem wildtypisch transplantierten Neuroektoderm zu erkennen. Die BAX- und BCL-2 defizienten Transplantate zeigen hierbei keine Unterschiede in Bezug auf die Morphologie des transplantierten Gewebes oder in der Stärke der Astrozytenaktivierung im Vergleich zu

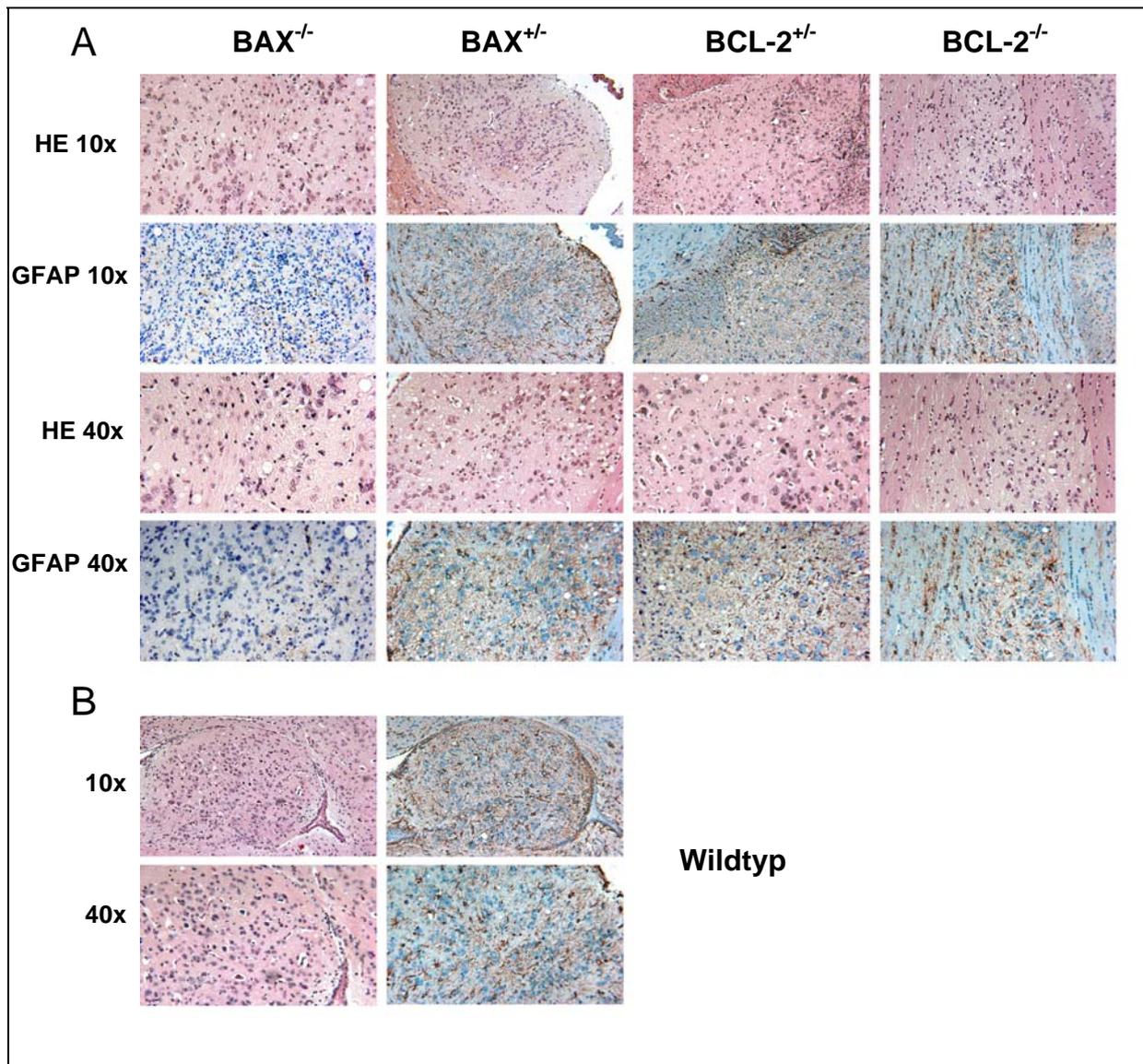


Abbildung 38. Nachweis der Scrapie-Pathologie in den Transplantaten. Zu erkennen ist eine starke Vakuolisierung des Neuropils (HE-Färbung) und GFAP-positive Astrozyten in Scrapie-infizierten neuroektodermalen Transplantaten mit verschiedenen BAX- und BCL-2 Genotypen (A) und transplantiertem Wildtyp-Gewebe als Kontrolle (B). Der Vergleich von BAX- und BCL-2 defizientem Gewebe zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Stärke der Vakuolisierung oder Aktivierung der GFAP-exprimierenden Astrozyten innerhalb der einzelnen Gruppen.

wildtypisch transplantiertem Gewebe (B). In einigen untersuchten Transplantaten konnten Lymphozyten detektiert werden, was auf eine Abstoßungsreaktion hinweist. Die meisten Transplantate zeigten jedoch keine spezifische Infiltration von Lymphozyten ins Gewebe.

4.1.1.3 Normale Differenzierung der neuroektodermalen Transplantate

Um die Integrität der neuroektodermalen Transplantate und die Funktionalität der Neuronen nach Infektion des Gewebes zu untersuchen, wurden die Transplantate auf die Expression von MAP-2 und Synaptophysin untersucht (Abb. 39). Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) und Synaptophysin sind Schlüsselproteine für die Funktion und Morphogenese von Neuronen des Gehirns. MAP-2 wird hierbei vorwiegend in Neuronen exprimiert, wo es für die Stabilität und Strukturbildung von neuronalen Mikrotubuli verantwortlich ist. Die Expression von MAP-2 ist somit ein Marker für neuronale Differenzierung und die Neubildung von Neuriten (Matus, 1991). Synaptophysin ist ein Ca^{2+} -bindendes Protein, welches vor allem in synaptischen Vesikeln der präsynaptischen Nervenendigungen in Vertebraten lokalisiert ist (Wiedenmann et al., 1986). Synaptophysin ist ein zellbiochemischer Marker für die Funktionalität von Nervenendigungen. Wildtyp-Transplantate zeigen normalerweise die für Scrapie charakteristische histopathologische verminderte Synaptophysin-Immunreaktivität zwischen 70- 160 Tage nach Infektion, was den Zeitrahmen der Inkubationszeit für Scrapie darstellt. Sowohl die immunhistochemische Analyse der MAP-2 Expression (Abb. 39 A) als auch die Synaptophysin-Färbungen (Abb. 39 B) zeigten in den unterschiedlichen Transplantaten hingegen eine ausgeprägt granuläre und starke Färbung sowohl innerhalb der Transplantate (gestrichelte Linie in 4x Vergrößerung) als auch im umgebenden Wirtsgewebe. Dabei konnte innerhalb der einzelnen Genotypen, trotz unterschiedlichen Inkubationszeiten von 233 Tagen (*BAX*^{+/-}), 260 Tagen (*BCL-2*^{+/-}), 268 Tagen (*Wildtyp*), 341 Tagen (*BAX*^{+/-}) und 376 Tagen (*BCL-2*^{+/-}), keine Unterschiede in der Stärke der Expression von MAP-2 und Synaptophysin festgestellt werden. Zu den untersuchten Zeitpunkten, die das post-terminale Stadium von Wildtyp-Tieren kennzeichnen, erkennt man zusätzlich deutliche Anzeichen von spongiformen Veränderungen.

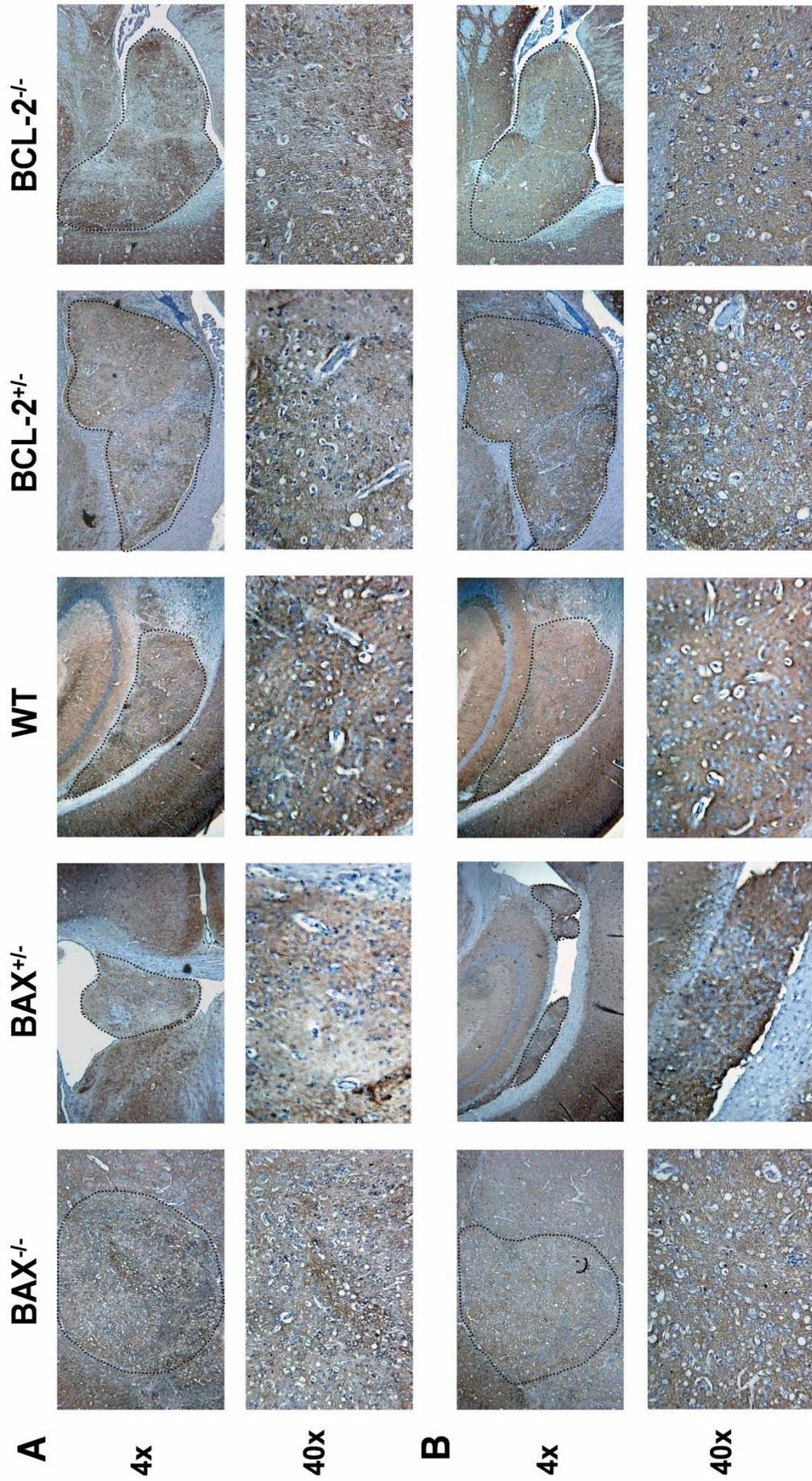


Abbildung 39. Intraventriculär oder intraparenchymal gelegene Transplantate der verschiedenen Genotypen zeigen keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Differenzierung (gestrichelte Linie). Eine starke Immunreaktivität für MAP-2 (A) und Synaptophysin (B) in den verschiedenen Transplantaten ohne signifikanten Unterschied zum umgebenden Wirtsgewebe ist zu erkennen. Die Inokulation mit Prionen führte zu keinem signifikanten Verlust des Neuropils.

4.1.1.4 Die Deletion von BAX oder BCL-2 hat keinen Einfluss auf die Induktion der Apoptose

Um zu untersuchen, ob andere apoptotische Proteine als BAX oder BCL-2 in den durch Prionen-induzierten neuronalen Zelltod involviert sind, wurden Gehirnschnitte der infizierten, transplantierten Tiere auf Immunreaktivität gegen aktivierte Caspase-3 getestet. In den neuroektodermalen Transplantaten defizient für BAX-oder BCL-2 kommt es zu vereinzelter Expression von aktivierter Caspase-3 (Abb. 40 gekennzeichnet durch Pfeile). Im Gegensatz dazu ist in nicht-infizierten Tieren eine Färbung von aktivierter Caspase-3 im Gehirn nicht nachweisbar (Abb. 40, Negativkontrolle). Caspase-3 wird nach Aktivierung normalerweise im gesamten Zellkörper exprimiert und erscheint als Ansammlung von kleinen granulären Körpern innerhalb der Zelle (Abb. 40, Pfeile). Caspase-3-positive Neuronen sind vereinzelt über das gesamte Transplantat nachweisbar und in allen untersuchten BAX-und BCL-2 Genotypen zu finden. Sie sind umgeben von Neuronen, in denen aktivierte Caspase-3 nicht detektierbar ist. Die für den apoptotischen Marker Caspase-3-positiven Neuronen unterscheiden sich untereinander hinsichtlich der Stärke der Caspase-3-Expression. Manche Neuronen zeigen ein nur schwach positives Signal innerhalb des Zytoplasmas (Wildtypisches Transplantat), während der Zellkern negativ auf die Färbung reagiert. In anderen Neuronen ist das Signal stark ausgeprägt und sowohl der Zellkern als auch das Zytoplasma enthält das aktivierte Protein (BAX^{-/-}-Transplantat). Eine andere Morphologie findet sich in dem BCL-2-defizienten Transplantat. Hier kommt es zu granulären Ansammlungen von Caspase-3 positiven Material (BCL-2^{-/-}) verteilt über den gesamten Bereich des Gewebes.

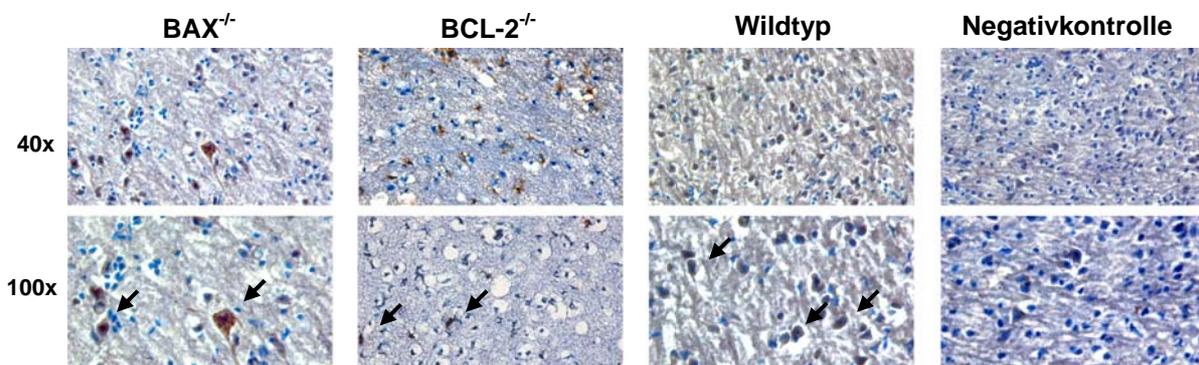


Abbildung 40. Aktivierte Caspase-3 innerhalb der verschiedenen Transplantate. Sowohl in BAX-defizienten als auch in BCL-2-defizienten Transplantaten (in verschiedenen Vergrößerungen, 40x bzw. 100x) zeigen einzelne Neurone eine Immunreaktivität gegenüber aktivierter Caspase-3, welche sich in der Stärke der Expression nicht von wildtypischem Gewebe unterscheidet.

Mit Hilfe des TUNEL-Verfahrens lassen sich die als pathognomisch geltenden DNA-Einzelstrangbrüche apoptotischer Zellen hochsensitiv nachweisen. Durch Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich markierte Einzelstrangbrüche („nicks“) einer apoptotischen Zelle detektieren. Abb. 41 zeigt die Färbung von TUNEL-negativen und TUNEL-positiven Zellen in BAX- und BCL-2-defizienten Transplantaten wobei die Anzahl an TUNEL-positiven Zellen im BCL-2^{-/-} Transplantaten deutlich höher ist als die der BAX-losen. TUNEL-positive Zellen sind in beiden Genotypen über den gesamten Bereich punktuell im Gewebe aufzeigbar und weisen darauf hin, dass diese zerstörten Zellen in die Apoptose eingehen. Zusätzlich zum TUNEL-Nachweis wurden die Gewebsschnitte mit einem Antikörper gegen das Neuronenspezifische nukleäre Protein (NeuN) gefärbt. Dabei handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der als spezifischer Marker für Neuronen sowohl des zentralen wie auch des peripheren Nervensystems gilt. NeuN wird im Zellkern und Zellkörper postmitotischer Neuronen während ihrer Differenzierung exprimiert (Mullen et al., 1992). Zusätzlich zu den TUNEL-positiven Neuronen sind NeuN-positive Neurone in unmittelbarer Umgebung erkennbar, die kein apoptotisches Signal aufweisen. In wildtypisch transplantiertem Gewebe und in Transplantaten heterozygot für BAX- oder BCL-2 ließen sich ebenfalls punktuell TUNEL-positive Zellen nachweisen (Daten nicht gezeigt), mit einer insgesamt vergleichbaren Morphologie.

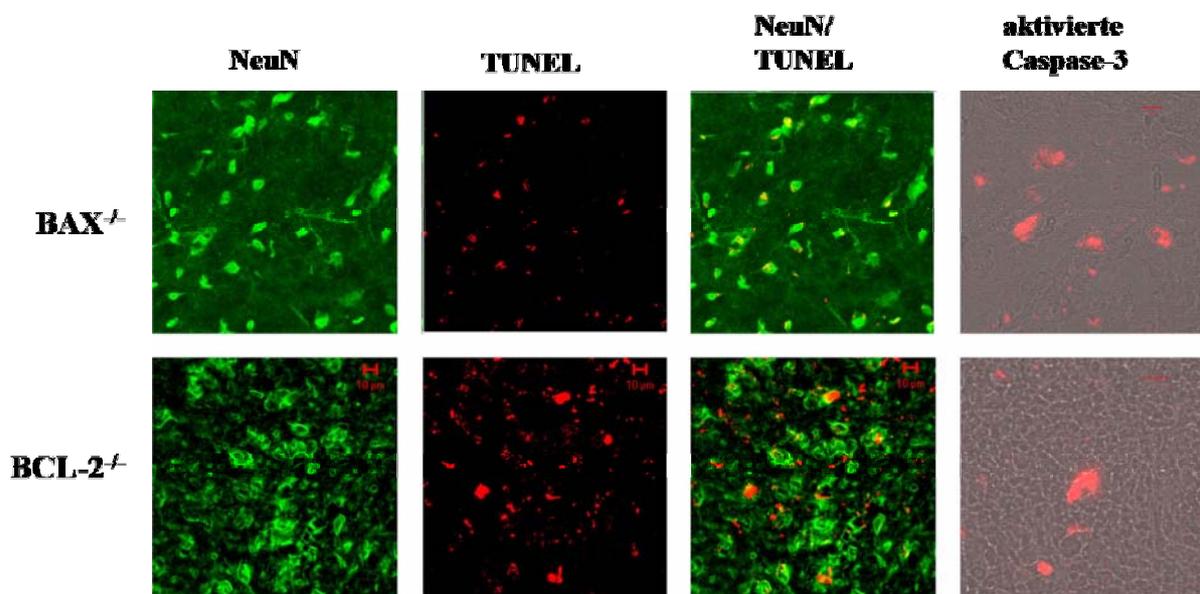


Abbildung 41. Immunhistochemische Analyse von TUNEL-positiven Neuronen und aktivierter Caspase-3 in BAX- und BCL-2-defizienten Transplantaten. Durch Doppelfärbung mit NeuN für Neuronen (grün) sind TUNEL-positiven Zellen (rot) sowohl in BAX- als auch in BCL-2 defizientem Gewebe nachweisbar, wobei der Anteil an TUNEL-positiven Zellen im BCL-2-Transplantat deutlich höher ist. In beiden Genotypen erkennt man zusätzlich aktivierte-Caspase-3 positive Zellen (rot).

Die Gehirnschnitte wurden auch hier wieder auf Immunreaktivität gegenüber aktivierter Caspase-3 untersucht. Caspase-3-positive Zellen waren an roten, im Zytoplasma verstreuten Punkten erkennbar (apoptotischen Körperchen), was mit dem Vorkommen der aktiven Form der Caspase-3 im Zytoplasma zu erklären ist (Abb. 41). Die Schnitte wiesen sowohl einzeln verstreut liegende als auch mehrere, einander unmittelbar benachbart liegende, apoptotische Kerne auf. Die aktivierten Caspase3-positiven Zellen machten insgesamt einen sehr geringen Anteil aus. Beim Vergleich der Genotypen konnten lichtmikroskopisch keine Unterschiede im Hinblick auf die Anzahl aktivierter Caspase-3- positiven Zellen festgestellt werden.

5 DISKUSSION

5.1 Immunisierungsstrategien gegen Prionenerkrankungen im Mausmodell

Prionenerkrankungen sind infektiöse übertragbare neurodegenerative Erkrankungen, die sowohl Tiere als auch Menschen betreffen und für die bis heute weder Therapien noch prophylaktische Maßnahmen existieren. Neben einer Vielzahl von therapeutischen Wirkstoffen, wie Kongorot (Caughey and Raymond, 1993), polyene Antibiotika (Adjou et al., 1999; Adjou et al., 1995), Derivaten von Anthracyclinen (Tagliavini et al., 1997), Porphyrinen (Priola et al., 2000) und verzweigten Polyaminen (Supattapone et al., 2001), die alle in Tierexperimenten zu einer Verlängerung in der Inkubationszeit und zur Reduktion der Infektiösität von Prionen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führten, gibt es inzwischen eine Vielfalt an Untersuchungen, die sich mit dem Einfluss von Antikörpern auf die Vermehrung und Ausbreitung von Prionen beschäftigen. Neben passiven Immunisierungsstrategien (Enari et al., 2001; Heppner et al., 2001; Peretz et al., 2001; Perrier et al., 2004; White et al., 2003), liegt ein bedeutendes Augenmerk der Forschung auf der Entwicklung von aktiven Immunisierungsmöglichkeiten (Gilch et al., 2003; Heppner et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass das Immunsystem bei der Neuroinvasion von Prionen eine wichtige Funktion einnimmt (Klein et al., 1997; Klein et al., 2001; Mabbott et al., 2000), trotzdem wird nach Infektion eines Organismus auf humoraler oder zellulärer Ebene keine Immunantwort gegen das Prion-Protein beobachtet. Dieses Fehlen einer detektierbaren Immunreaktion bei Prionenerkrankungen ist die Folge einer immunologischen Toleranz eines Individuums aufgrund der ubiquitären Expression des körpereigenen Prion-Proteins (Bueler et al., 1993; Kingsbury et al., 1981; Porter et al., 1973). Eine Hauptaufgabe bei der Entwicklung neuer Vakzinierungsstrategien liegt deshalb darin, die immunologische Toleranz zu brechen und somit die spezifische Induktion von Antikörpern zu ermöglichen. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung einer aktiven Immunisierungsstrategie mittels Proteinen gegen das Prion-Protein. Es wurde gezeigt, dass es möglich ist mit der Wahl geeigneter Vakzinen und Adjuvanzen in *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäusen eine PrP-spezifische humorale Immunantwort zu induzieren.

5.1.1 Immunisierung mit rekombinantem Prion-Protein und dem Fusionskonstrukt PrP-P30

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Induktion spezifischer Antikörper mittels Proteinimmunisierung untersucht. Einige Studien zeigen, dass ein starke Vakzine und der Einsatz entsprechender Tiermodelle unabdingbar sind, um eine spezifische Anti-PrP Immunantwort in Mäusen zu induzieren (Gilch et al., 2003; Rosset et al., 2004; Schwarz et al., 2003; Sigurdsson et al., 2002; Souan et al., 2001a). Bis heute gibt es nur eine einzige Arbeit, die nach Immunisierung mit rekombinantem Hamster-PrP in dem Wildtyp-Mausstamm BALB/c messbare Anti-PrP Antikörperkonzentrationen nachweisen konnte (Xiao et al., 2005). Allerdings waren die induzierten Antikörper dabei nicht in der Lage, natives PrP unter nichtdenaturierenden Bedingungen zu erkennen. Im Gegensatz dazu war es in dieser Arbeit möglich, durch die Verwendung des Hamster-transgenen Mausmodells *NSEHa-Prnp^{0/0}* schon ohne Zugabe eines Adjuvanzes, nach Immunisierung mit rekombinantem murinen PrP eine starke humorale Immunantwort in den Tieren zu induzieren (Abb.13). Dabei wurden im ELISA erwartungsgemäß deutlich höhere Anti-PrP^C-Titer gegen die murine Form des Prion-Proteins erzielt als für die Hamster-Isoform. Der Aufbau spezifischer Anti-Hamster-PrP^C Titer wurde durch die Anwesenheit von endogenem Hamster-PrP^Cs in den *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäusen offensichtlich erschwert, was die im Gegensatz zu Anti-Maus-PrP^C ca. 4 bis 8fach niedrigeren Anti-Hamster-PrP^C Titer erklärt. Dies weist darauf hin, dass eine klonale Deletion potentiell autoreaktiver Lymphozyten stattgefunden haben könnte. Wahrscheinlich werden B-Zell-Klone mit der höchsten Affinität gegenüber PrP^C durch Toleranzmechanismen eliminiert, wobei Klone mit niedrigerer Affinität erhalten bleiben. Somit sind B-Zellen allerdings nicht intrinsisch tolerant gegenüber PrP^C und können im Prinzip eine humorale Immunantwort aufbauen. Murines PrP und die Hamster-Isoform weisen in ihrer Sequenz einen Unterschied von 12 Aminosäuren auf und die dadurch auftretenden Strukturunterschiede im Protein könnten zur teilweisen Umgehung der B-Zelltoleranz führen und somit zur Induktion spezifischer Anti-PrP^C-Antikörper. Zusätzlich zur Immunisierung mit rekombinantem PrP wurde eine Gruppe von Tieren mit dem Fusionsprotein PrP-P30 immunisiert. Die im C-terminalen Bereich des Prion-Proteins zusätzlich eingefügten Aminosäuren des Tetanus-Toxins stellen ein bekanntes T-Helferepitop (T_H-Epitop) dar. Dieses P30-Epitop wurde in anderen Studien erfolgreich eingesetzt, um eine Immunantwort gegen körpereigene Antigene zu induzieren (Hertz et al., 2001; Steinaa et al., 2005). In *in vivo*-Experimenten führte der Einbau des P30-Epitops zur erfolgreichen Stimulierung von T-Helferzellen und der entsprechenden B-Zellen und trug somit zur

Erhöhung der Immunogenität von ansonsten nur schwach immunogenen Peptiden bei (Astori and Kraehenbuhl, 1996). Durch die Einführung des T_H-Epitops P30 sollte in dieser Arbeit die Immunogenität des Prion-Proteins verstärkt und die immunologische Toleranz gebrochen werden. Wie die Immunisierung mit rekombinantem PrP alleine, führte die Immunisierung mit dem Fusionsprotein in den Tieren auch ohne Adjuvanz nach drei Behandlungen zu einer starken humoralen Immunantwort. Auch in dieser Gruppe waren deutlich höhere Anti-Maus-PrP-Antikörper als Anti-Hamster-PrP-Antikörper in den Seren nachweisbar. Spezifische Unterschiede in der Höhe der Anti-PrP-Titer innerhalb der einzelnen Immunisierungsgruppen waren dabei nicht ersichtlich. Der Einbau des T-Helferepitops P30 führte also zu keiner erhöhten Anti-PrP-spezifischen humoralen Immunantwort.

Allgemein ist der Erfolg von Proteinimmunisierungen abhängig von der Wahl eines geeigneten Adjuvanz (Bomford, 1998; Freund, 1956; Gupta et al., 1993; Warren et al., 1986). Im Vergleich zur Injektion eines bestimmten Antigens alleine, erlaubt die Verwendung von Antigen mit einem Adjuvanz geringere Mengen des Antigens und kann zu einer deutlichen Erhöhung der induzierten Antikörpertiter führen. Trotz sehr hoher Antikörpertiter schon nach drei Immunisierungen mit den Proteinen alleine, wurde in der ersten Immunisierungsgruppe ab der vierten Injektion zusätzlich das Cytidyl-guanyl Oligodeoxynukleotid- (CpG-ODN) 1826 als Adjuvanz verabreicht. CpGs wurden als Adjuvanz bereits erfolgreich in der Entwicklung von Tumorstoffen zur Stimulation der Immunantwort gegen Selbst-Antigene eingesetzt (Cho et al., 2002; Davila et al., 2003; Miconnet et al., 2002; Stern et al., 2002). Durch die Bindung von CpGs an Toll-like Rezeptoren-9 (Chu et al., 1997; Krug et al., 2001a; Krug et al., 2001b) kommt es zur Sekretion der Zytokine IL-12 und TNF α , ein Merkmal einer T_{H1}-Immunantwort. Zusätzlich kommt es zur verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (APCs) (Martin-Orozco et al., 1999) und B-Zellen werden zur Proliferation angeregt und sezernieren IL-6 (Krieg et al., 1995). Abb. 42 gibt einen Überblick über die allgemeine Wirkungsweise und beschriebene therapeutische Anwendungen von CpGs. Die Verwendung von CpGs-1826 ab der vierten Immunisierung zusätzlich zu den Proteinen rek.PrP und PrP-P30 in dieser Arbeit führte nochmals zu einer weiteren Erhöhung der Anti-Maus-PrP-spezifischen Antikörperantwort. Im Gegensatz dazu blieben die Anti-Hamster-PrP-Titer in den Seren der behandelten Tiere über den Zeitraum der dritten bis fünften Booster-Injektionen konstant. Da nach jeder Immunisierung die Serum-Antikörpertiter bestimmt wurden und nur eine Booster-Injektion verabreicht werden sollte, wenn die Titer wieder abzusinken drohten (Cooper et al., 1991; Hu and Kitagawa, 1990; Siskind et al., 1968), wurde die Immunisierung in der ersten Immunisierungsgruppe nach der fünften Booster-Injektion eingestellt. In der nachfolgenden

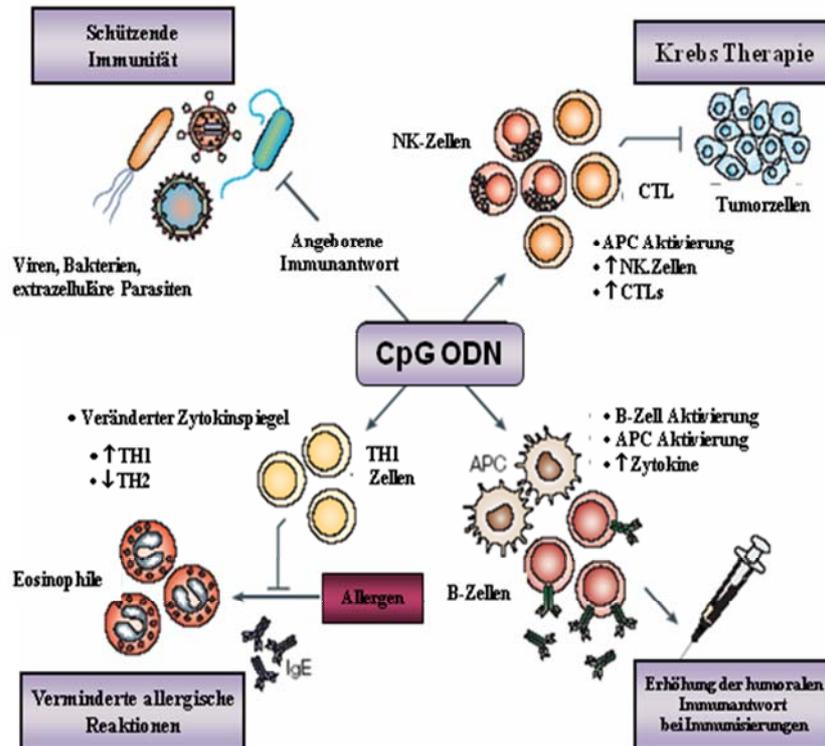


Abbildung 42. Therapeutische Anwendungen von CpG-Oligonukleotiden (CpGs-ODNs) (Klinman, 2004). Bis heute wurden vier verschiedene therapeutische Anwendungsbereiche für CpGs beschrieben. CpGs ahmen den stimulierenden Effekt bakterieller DNA nach. Als ein Faktor der angeborenen Immunität beeinflussen sie sowohl die unspezifische als auch die spezifische Immunantwort. Wenn sie mit anderen Allergenen kombiniert werden, stimulieren sie eine Antigen-spezifische T_{H1} -Immunantwort, welche dem Auftreten von T_{H2} -Zellvermittelten allergischen Asthma entgegenwirkt. Die CpGs-ODNs fördern auch die Wirkung von APCs und können den Zytokin bzw. Chemokinspiegel der Zellen verändern, welche für eine adaptive Immunantwort bei Immunisierungen verantwortlich sind. Durch Aktivierung von NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten können außerdem therapeutische Behandlungen von Krebs unterstützen.

Immunisierungsgruppe wurde das Adjuvanz CpG schon zu Beginn der ersten Injektion verabreicht (Abb.24). Durch diese leichte Abweichung des Immunisierungsprotokolls zur ersten Gruppe wurden nach der fünften Injektion von sowohl rek.PrP als auch PrP-P30 im ELISA bis zu 10-fach höhere Anti-Hamster-PrP spezifische Antikörpertiter erreicht (Vgl. Abb.25 mit Abb.14). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Immunstimulation durch den TLR9-Agonisten CpGs-1826 die humorale Immunantwort gegen PrP deutlich erhöhen kann. Diese Effekte sind wahrscheinlich das Ergebnis einer erhöhten Antigenaufnahme, Antigenprozessierung oder/und der Hemmung von potentiellen Funktionen von regulatorischen T-Zellen (Tregs) (El Andaloussi et al., 2006; Kabelitz et al., 2006; Pasare and Medzhitov, 2003; Wiegard et al., 2005; Wu and Peng, 2006). Es gibt Arbeiten, die zeigten,

dass ODNs ohne CpG-enthaltene Abschnitte, keinen Einfluss auf die humorale Immunantwort ausüben (Davis et al., 1998; Kraft et al., 2005) obwohl inzwischen bekannt ist, dass auch diese DNA-Abschnitte über den TLR9-Rezeptor wirken (Vollmer et al., 2004). Ob die in der vorliegenden Arbeit erhaltene deutliche Erhöhung der humoralen Immunantwort gegen PrP^C als ein Wirkungsmechanismus über TLR9 erklärt werden kann ist nicht klar, da keine *NSEHa-Prnp*^{0/0} Gruppe in die Studie mit aufgenommen wurde, die andere Arten von Adjuvanzen erhielt. Die Wirkung von ODNs könnte auch auf allgemeine immunstimulatorische Eigenschaften der Phosphodiestergruppen in den Oligonukleotiden zurückgeführt werden (Vollmer et al., 2002). Dennoch ist die Verwendung von CpGs-1826 von Beginn der Immunisierung an in dieser Arbeit sehr erfolgreich gewesen.

Wie oben beschrieben, wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass die Verwendung von CpGs als Adjuvanz bei einer Immunisierung die induzierte Immunantwort qualitativ in Richtung einer T_{H1}-Antwort verschieben kann (Chu et al., 1997; Klinman et al., 1996; Raz et al., 1996). Um dies zu überprüfen, wurden die Seren der *NSEHa-Prnp*^{0/0} Mäuse vor (3.boost) und nach der Verwendung von CpGs (4.boost) auf IgG1 und IgG2a-spezifische Subtypen hin untersucht, welche charakteristisch sind für eine T_{H2}- bzw. T_{H1}- Immunantwort (Abb.15). Sowohl vor der Verwendung von CpGs als auch nach dem Einsatz dieses Adjuvanz sind die Hamster-PrP-spezifischen induzierten Antikörper fast ausschließlich vom IgG1-Subtyp und auch in den Seren mit Maus-PrP-spezifischen Antikörper überwiegt diese Subtypenklasse (Abb. 15). Auch in der zweiten Immunisierungsgruppe konnte die beschriebene Polarisierung der Immunantwort hin zu einer T_{H1}-Antwort nicht gezeigt und in dieser Arbeit also nicht bestätigt werden. Diese Diskrepanz zu veröffentlichten Arbeiten kann durch das Konzept der „vorbestimmten T_{H2} Entwicklung“ erklärt werden („default T_{H2} response“ (Jankovic et al., 2001). Dieses Konzept geht davon aus, dass sich T_{H2} Zellen *in vivo* immer dann spontan entwickeln, wenn keine mikrobiellen Faktoren zur Verfügung stehen, welche für die Induktion der Expression von T_{H1}-Zytokinen verantwortlich sind. Nach einer Peptidimmunisierung kommt es also nur dann zu einer Verschiebung der Immunantwort in Richtung T_{H1}, wenn genügend CpG-Motive verfügbar sind, was mit dem vorliegenden Immunisierungsprotokoll eventuell nicht gegeben war. Somit scheint die Richtung der T_H-Zellpolarisierung nach Proteinimmunisierung im Wesentlichen von der Menge und der Verfügbarkeit der CpG Motive als Adjuvanz abzuhängen.

Im nächsten Schritt wurde die Spezifität der durch die Immunisierung induzierten Antikörper in den Immunsereen mittels kompetitivem ELISA überprüft. Dabei konnten erwartungsgemäß die Anti-Maus-PrP-Antikörper in den Seren aller Tiere durch Vorinkubation mit rek. Maus-PrP abgesättigt werden und somit die Spezifität der Antikörper gegen Maus-PrP bestätigt

werden (Tabelle 4 und 7). Durch die Verwendung von Maus-PrP als Vakzine gegen endogen exprimiertem Hamster-PrP sollte die induzierte Immunantwort durch molekulare Mimikry beeinflusst werden (Hemmer et al., 1998). Molekulare Mimikry bedeutet, dass aufgrund der Ähnlichkeit der verwendeten antigenen Determinante mit den Proteinen des Wirtsorganismus dieser mit der Bildung von Auto-Antikörpern bzw. Auto-aggressiven T-Lymphozyten reagiert (Benoist and Mathis, 2001). Die daraus resultierende Auto-Aggression sollte das Brechen der Selbsttoleranz induzieren (Choi and Craft, 2004). Die Ergebnisse der kompetitiven ELISA-Experimente zeigten, dass in einigen, jedoch nicht allen Tieren, solche Auto-Antikörper gegen Hamster-PrP induziert werden konnte. Diese Immunseren zeigten zudem kreuzreaktive Eigenschaften gegenüber Maus-PrP. Die Immunantwort, die durch rek. Maus-PrP bzw. PrP-P30 hervorgerufen wurde ist demnach nicht nur spezifisch für Maus-PrP, sondern auch für das entsprechende Hamster-Epitop. Anders ausgedrückt führte demnach die Immunisierung mit Maus-PrP durch molekulare Mimikry zur Erkennung von homologen Epitopen des Hamster-PrPs.

Insgesamt bietet das Ergebnis der ELISA-Versuche über die Höhe der Anti-PrP^C-Titer keine zuverlässige Aussage über die Fähigkeit der induzierten Antikörper, natives PrP^C auf lebenden Zellen zu erkennen. Deshalb wurden die Immunseren im Westernblot mit PrP-enthaltenden Hirnhomogenaten bzw. PrP^C-exprimierenden Zellen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, natives PrP^C zu detektieren. Eine spezifische Bindung aller getesteten Immunseren an natives Maus-PrP^C konnte sowohl durch FACS-Analyse, als auch im Immunoblot nachgewiesen werden (Abb. 17-18 und 27-28). Im Gegensatz dazu konnte eine Bindung der Autoantikörper an das Hamster-PrP^C nur in einer Minderheit der Tiere gezeigt werden, selbst unter den vorliegenden denaturierenden Bedingungen des Immunoblots. Diese Ergebnisse müssen in ihrer Aussagekraft nicht automatisch negativ gewertet werden. Die Antikörperkonzentrationen im murinen Blut könnten mit den verwendeten Methoden für den Nachweis und die Bestimmung der Spezifität zu niedrig sein. Dies bestätigen die erhaltenen ELISA-Daten, die ca. 4 bis 8 fach höhere Werte gegen das Maus-PrP als gegen Hamster-PrP ergaben. Trotz fehlender Reaktion im Westernblot und im FACS könnten die induzierten Antikörper einen Einfluss auf die Prionenkonversion zeigen oder durch andere Mechanismen wie z.B. durch die Interaktion mit putativen im Konversionsprozess entstehenden Zwischenformen, ihre Wirkung entfalten.

Das Ziel der durchgeführten Immunisierungsstrategie war die Induktion von Autoantikörper in *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäusen, die fähig sind auf der Zelloberfläche lokalisiertes PrP^C zu erkennen und zu binden. Verschiedenen Studien in Mäusen haben gezeigt, dass zelluläres PrP in vielen Arten ohne phänotypische Auswirkungen entfernt werden kann (Bueler et al., 1992;

Mallucci et al., 2003; Richt et al., 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Verminderung in der Expressionsstärke von PrP^C eine Verlängerung in der Inkubationszeit zufolge hat und somit ein wirksames Mittel gegen eine Prionenerkrankung darstellt (Gilch et al., 2001). Für die Biogenese des pathogenen Prion-Proteins ist die Expression der zellulären Form auf der Zelloberfläche unbedingt notwendig (Borchelt et al., 1992; Caughey and Raymond, 1991; Taraboulos et al., 1995). Um den Einfluss der induzierten Antikörper auf die Biogenese von PrP^{Sc} zu untersuchen, wurden PrP^{Sc}-tragende N2a-Zellen (ScN2a-Zellen) mit den Immunseren behandelt. Die Anti-PrP-Antikörper in den Seren aller mit rek.PrP-immunisierten *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäuse waren in der Lage, den PrP^{Sc}-Gehalt in den Scrapie infizierten Zellen signifikant zu reduzieren (Abb. 19 und 29). Diese Ergebnisse stimmen mit bereits veröffentlichten Ergebnissen überein, in denen die Behandlung mit Anti-PrP^C-Antikörpern in diesem Zellsystem ebenfalls zur Reduktion des PrP^{Sc}-Gehaltes führte (Beringue et al., 2004; Enari et al., 2001; Feraudet et al., 2005; Kim et al., 2004; Miyamoto et al., 2005). Auch in diesem *in vitro* Zellsystem führten hingegen die Immunseren der mit PrP-P30 immunisierten *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäusen nur in einigen Tieren bzw. nur zur partiellen Reduktion der Prionenreplikation. Da in allen Tieren mit den zuvor beschriebenen Experimenten eine spezifische Anti-Maus-PrP Immunantwort bestätigt wurde war dieses Ergebnis unerwartet. Eine mögliche Erklärung für die *in vitro* unterschiedlich funktionellen Immunseren liegt in der möglicherweise unterschiedlichen Epitoperkennung der induzierten Anti-PrP-Antikörper. Es wurde gezeigt, dass spezifische Antikörper, die gegen Epitope von PrP im Bereich der Aminosäuren 95-103 und 220-231 gerichtet sind, *in vitro* einen Effekt auf die Prionenreplikation zeigen, während Antikörper gegen die Region 29-37 bzw. 72-86 in diesem System keinen Effekt zeigen. Dies weist auf eine starke Bedeutung der Epitop-Lokalisierung des Antigens hin (Sigurdsson et al., 2003). Zusätzliche Studien zeigen, dass monoklonale Antikörper genauso wie rekombinante Fab-Fragmente gegen Aminosäuren 32-156 (Helix 1 des Prion-Proteins) fähig sind, die PrP^{Sc}-Replikation in Zellkultur zu inhibieren (Enari et al., 2001; Peretz et al., 2001). Die in dieser Arbeit induzierten Immunseren sind polyklonale Seren, die Antikörper mit unterschiedlichen Epitoperkennungssequenzen aufweisen. In den beschriebenen ELISA, FACS und Westernblot Experimenten sind diese Seren zwar teilweise fähig natives und denaturiertes PrP zu erkennen, durch möglicherweise unterschiedliche Epitop-Spezifitäten aber nicht in der Lage die Prionenreplikation zu inhibieren.

5.1.2 Die Immunisierung mit PrP-P30 führt zu einer Verlängerung der Inkubationszeit

Um den Einfluss der induzierten Antikörper gegen eine TSE-Infektion *in vivo* zu untersuchen, wurden die immunisierten *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäuse intraperitoneal (i.p.) mit Hamsterprionen inokuliert (Abb. 12). Trotz nachweisbar signifikanter Anti-PrP^C-Titer im Serum der mit rek.PrP-immunisierten *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Tiere, starben die Mäuse im gleichen Zeitraum (Ø 338 Tage nach Inokulation (dpi)) wie die mit Ovalbumin-immunisierten Kontrolltiere (Ø368 dpi). Im Gegensatz dazu zeigten die Mäuse, die mit dem Fusionsprotein PrP-P30 immunisiert wurden, eine durchschnittliche Inkubationszeit von 488 Tagen, was eine Verlängerung in der Inkubationszeit zur mit Ova-behandelten Kontrollgruppe von ca. 30% darstellt (Abb. 20, Tabelle 6). Diese signifikante Verlängerung in der Lebensdauer der Tiere weist darauf hin, dass die in diesen Tieren induzierte Immunantwort mittels PrP-P30 Immunisierung in die Krankheitsentwicklung eingreift. Über die genauen molekularen Mechanismen, die diesem Effekt zugrunde liegen kann nur spekuliert werden. Basierend auf der „Prion-only“-Hypothese“ (Abb. 43a) und den vorliegenden Ergebnisse, sowie den Daten anderer Arbeiten sind verschiedene Mechanismen vorstellbar (Abb. 43 b-d). Die wohl allgemeingültigste Vorstellung liegt in der Inhibierung der Interaktion von PrP^C und PrP^{Sc} durch die mit Immunisierung induzierten Anti-PrP^C Antikörper (Peretz et al., 2001). Erreicht wird dies mit Immunglobulinen, die entweder spezifisch sind für PrP^C bzw. PrP^{Sc} (Abb. 43b), oder in der Lage sind, beide Isoformen des Prion-Proteins zu erkennen (Abb. 34c). Die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} wird verhindert, weil eine direkte Interaktion beider Formen durch die Blockade durch die Antikörper nicht mehr möglich ist und somit das notwendige Substrat (zelluläres PrP) für die Umwandlung nicht mehr zur Verfügung steht. In den Immunisierungsexperimenten in dieser Arbeit wurden sowohl spezifische Anti-Maus-PrP^C als auch in einigen Tieren spezifische Anti-Hamster-PrP^C Antikörper in den *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäusen nachgewiesen. Diese Antikörper zeigten in Zellkultur einen Einfluss auf die Prionenreplikation ohne erkennbare Unterschiede zwischen den mit rek.PrP und PrP-P30 immunisierten Tieren. Trotzdem hatten nur die Tiere, die PrP-P30 als Vakzine erhielten, eine signifikant verlängerte Inkubationszeit. Dies lässt auf unterschiedliche Wirkungsmechanismen der induzierten Antikörper in einer *in vitro* im Gegensatz zur *in vivo* Situation schließen.

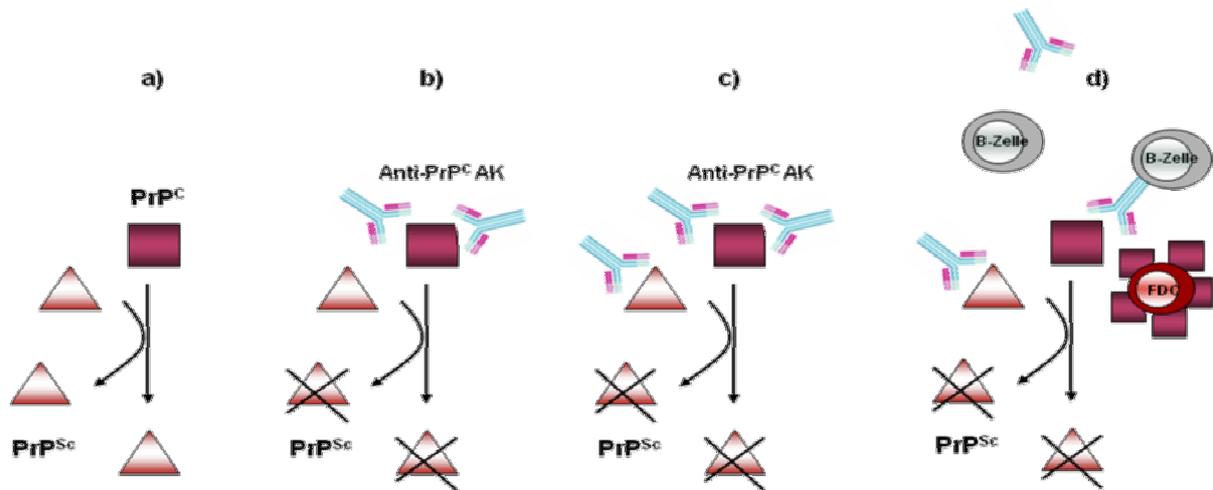


Abbildung 43. Mögliche Wirkungsweisen der induzierten Anti-PrP-Immunantwort. Basierend auf der Prion-only-Hypothese (a) gibt es verschiedene Möglichkeiten wie die induzierten Antikörper auf die Prionenreplikation wirken könnten. Durch Bindung der Serum-Antikörper an PrP^{C} (b) oder/und PrP^{Sc} (c) kommt es zur Inhibition der PrP^{C} - PrP^{Sc} Interaktion und somit zur Verhinderung der Konversion von PrP^{C} in die pathogene Isoform. Eine weitere Möglichkeit liegt in der Inhibition des Konversionsprozesses unter Beteiligung von folliculär dendritischen Zellen (DCs) und membranständigen Anti-PrP-Antikörper auf B-Zellen (d).

Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf eine entscheidende Funktion Peptid-spezifischer Antikörper bei dem Prozess der Konversion von PrP^{C} zu PrP^{Sc} hin. Allgemein ist bekannt, dass spezifische Anti- PrP^{C} IgG-Antikörper *in vivo* einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben können. Viele in passiven Immunisierungen verwendeten monoklonale Anti- PrP^{C} Antikörper scheinen ihre Wirkung allerdings nur temporär zu vermitteln, da im Mausmodell unphysiologische Konzentrationen der Antikörper verabreicht werden müssen, um den Ausbruch der Krankheit zu verhindern oder zu verzögern. Ein Beispiel dafür ist ein transgenes Mausmodell, welches eine konstitutive Expression von anti-PrP IgGs aufweist (Heppner et al., 2001), oder infizierte Mäuse, die asymptomatisch blieben, solange sie zweimal wöchentlich mit sehr hohen Dosen von Anti-PrP IgGs behandelt wurden (White et al., 2003). Wenn die Anti-PrP IgG Levels unter einen spezifischen Wert fallen, bevor die Infektionsdosis eliminiert wird, sterben die Tiere aufgrund der Infektion. Die verzögerte Inkubationszeit der mit PrP-P30 immunisierten Tiere, die in dieser Arbeit beobachtet wurde, korreliert nicht mit den individuell induzierten Antikörper-Titern gegen Hamster-PrP (siehe Abb. 44). Eine Korrelation würde darauf hindeuten, dass die Tiere geschützt wären, wenn eine bestimmte Antikörperantwort erreicht wurde. Der Mechanismus wie Immunglobuline vor einer TSE-Infektion schützen, ist noch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass Anti-PrP IgGs monomeres zelluläres PrP binden, dies dadurch stabilisiert wird und somit die infektiöse

Form neutralisiert und seine Verbreitung verhindert wird. Es könnte sein, dass die Neigung von PrP-P30 in Lösung Aggregate zu bilden, dazu führt in den damit immunisierten Tieren eine oligomer-gerichtete Immunantwort auszulösen. In verschiedenen Zellkultursystemen wurde gezeigt, dass PrP-spezifische Antikörper, die gegen kovalent-gebundene PrP-Dimere gerichtet sind, einen stärkeren Anti-Prion Effekt aufweisen als gegen PrP-Monomere (Gilch et al., 2003). Es ist vorstellbar, dass die Igs die durch PrP-P30 induziert wurden, einen ähnlichen Anti-Prion Effekt aufweisen.

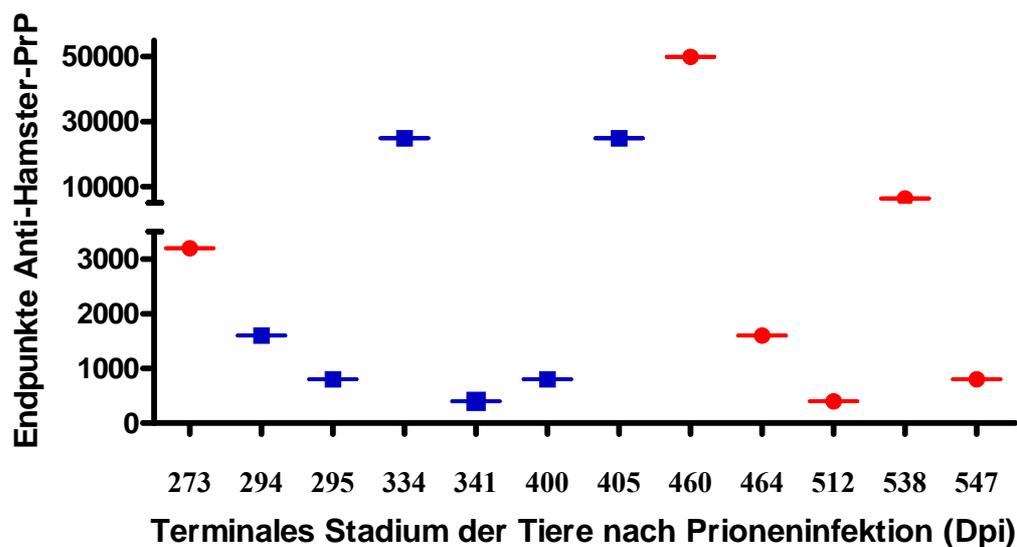


Abbildung 44. Abhängigkeit der spezifischen Serum Anti-Hamster-PrP^C-Titer auf die Inkubationszeit. Dargestellt sind die erreichten Endpunkttiter der induzierten Anti-Hamster-PrP-Antikörper einzelner *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäuse nach der letzten Immunisierung und die dazugehörigen Inkubationszeiten nach Prioneninfektion. Die Höhe der induzierten Immunantwort korreliert dabei nicht mit den erhaltenen Inkubationszeiten.

Eine andere Hypothese stellt die schon oben diskutierten unterschiedlichen Epitoperkennungen der induzierten Antikörper dar. Rekombinantes PrP und PrP-P30 könnten eine unterschiedliche Konformation einnehmen und zur Induktion spezifischer konformationsabhängiger Antikörper führen. Ein wichtiges Epitop in diesem Zusammenhang stellt die Aminosäure Asparagin an Stelle 155 des Hamster Prion-Proteins dar. In der Mausequenz ist an dieser Stelle die Aminosäure Tyrosin lokalisiert, was zu teilweise unterschiedlichen Konformationen der Proteine führt und welche als ein wichtiger Faktor in der Artenbarriere zwischen Maus und Hamster identifiziert wurde (Priola et al., 2001). Diese Barriere ist nicht absolut, da gezeigt werden konnte, dass Mäuse prinzipiell mit Hamsterprionen infizierbar sind, auch wenn die Krankheit erst nach extrem langen Inkubationszeiten ausbricht (Race and Chesebro, 1998). Die Konformation von PrP-P30

könnte zur Induktion von Antikörper geführt haben, die spezifisch gegen diese Region um Aminosäure 155 gerichtet sind, was die deutlich verlängerte Inkubationszeit erklären würde. Eine weitere Möglichkeit der Funktionalität von PrP-P30 gegenüber rek.PrP könnte auf B-Zell-Ebene liegen. Durch den Einbau des P30-Epitops zusätzlich zum rekombinanten Prion-Protein könnte es direkt zur Stimulierung von B-Zellen gekommen sein und dadurch zur Expression von Anti-PrP-Immunglobulinen auf der Oberfläche. Es ist bekannt, dass folliculär dendritische Zellen (FDCs), die im Stroma von lymphoretikulären Organen lokalisiert sind, eine wichtige Funktion in der peripheren Prionenpathogenese einnehmen (Montrasio et al., 2000). Da FDCs mit B-Zellen interagieren, könnten membrangebundene Anti-PrP Antikörper auf der Oberfläche von B-Zellen durch diese Interaktion mit FDCs in die Prionenpathogenese eingreifen (Abb. 43 d).

In der Arbeitsgruppe um Sethi wurde 2002 gezeigt, dass die Immunisierung mit CpGs alleine ausreicht, um eine Verlängerung in der Inkubationszeit nach Prioneninfektion zu erreichen (Sethi et al., 2002). In dieser Arbeit konnte dies nicht gezeigt werden. Trotz Behandlung der Tiere mit Ovalbumin und CpGs als Kontrolle, konnte in diesen Tieren keine signifikante Verlängerung in der Inkubationszeit gegenüber infizierten, nichtbehandelten Tieren beobachtet werden. Durch die Verwendung von CpGs kommt es zur Aktivierung des Immunsystems über den TLR9. Wie diese Aktivierung zum Schutz gegen eine mögliche Prioneninfektion führen soll, ist schwierig zu erklären, da gezeigt wurde, dass MyD88^{-/-} Mäuse, bei denen die Signalübertragung über den TLR9 nicht mehr funktioniert, eine normale Krankheitsentwicklung aufweisen (Prinz et al., 2003b). Im Jahr 2004 wurde um die Arbeitsgruppe von Junt gezeigt, dass die wiederholte Immunisierung mit CpGs zur Zerstörung von Keimzentren in lymphoidalen Geweben führt, welche Orte der Prionenreplikation darstellen. Es wird deshalb vermutet, dass der durch die Verabreichung von CpGs beobachtete Anti-Prionen-Effekt eher auf immunsuppressive statt auf immunstimulatorische Eigenschaften zurückzuführen ist (Heikenwalder et al., 2004). Zusätzlich gibt es auch diverse Studien mit immundefizienten Tieren, in denen die Prionenreplikation und Ausbreitung der Krankheit verhindert ist (Frigg et al., 1999; Klein et al., 1997; Klein et al., 1998; Prinz et al., 2003a).

5.1.3 Untersuchung zur Induktion einer T-Zell-spezifischen Immunantwort durch Immunisierung mit rek.PrP und PrP-P30

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass es möglich ist, durch Immunisierung mit rek.PrP und PrP-P30 eine spezifische humorale Immunantwort in *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäusen zu induzieren. Diese induzierten Antikörper waren in der Lage sowohl natives PrP^C auf lebenden Zellen zu erkennen und zumindest teilweise einen Einfluss auf die Prionenreplikation *in vitro* zu zeigen. Obwohl in den durchgeführten *in vitro*-Versuchen dabei keine signifikanten Unterschiede innerhalb der mit rek.PrP und PrP-P30 immunisierten Versuchstiere gezeigt werden konnten, führte nur die Immunisierung mit PrP-P30 zu signifikant verlängerten Inkubationszeiten nach der Infektion mit Prionen in der *in vivo*-Situation. Eine Möglichkeit diesen Unterschied zu erklären liegt in der unterschiedlichen Induktion einer spezifischen zellulären Immunantwort, das heißt auf der Ebene von T-Zellen. Außerdem kann das Brechen der immunologischen Toleranz gegen ein Selbstantigen unter Umständen zu für den Organismus schädlichen autoaggressiven Effekten führen. Eine Charakterisierung der T-Zell-Immunantwort nach einer Immunisierung ist deshalb unabdingbar und wurde auch in dieser Arbeit vorgenommen. Bis heute gibt es nur wenige Arbeiten, die sich mit dem Einfluss einer Anti-PrP T-Zell-Antwort befassen (Bainbridge and Walker, 2003; Gregoire et al., 2005; Rosset et al., 2004; Souan et al., 2001a; Souan et al., 2001b). Dabei wurde aber klar gezeigt, dass PrP-Knockout Mäuse prinzipiell in der Lage sind eine zelluläre Immunantwort gegen das Prion-Protein aufzubauen (Bainbridge and Walker, 2003). In dieser Studie wurde gezeigt, dass es nach *ex vivo* Stimulierung von aus Milz und Lymphknoten der immunisierten *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäusen isolierten T-Lymphozyten mit Maus-PrP bzw. Hamster-PrP zu keiner spezifischen Proliferation von CD4-positiven oder CD8-positiven T-Lymphozyten gekommen ist (Abb. 31, 32). In wildtypischen Mäusen wird PrP^C sowohl auf ruhenden als auch auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert. Durch eine Aktivierung der Lymphozyten kommt es dabei zur einer erhöhten Expression des zellulären PrPs, was auf eine Funktion von PrP^C bei der Lymphozytenaktivierung schließen lässt. Entsprechend dieser Funktion von PrP^C wird nach einer *ex vivo* Stimulierung mit Mitogenen eine erniedrigte Aktivierung von T-Lymphozyten in *Prnp^{0/0}*-Mäusen beobachtet (Mabbott et al., 1997). Da für die in dieser Arbeit verwendeten Immunisierungen der transgene Stamm *NSEHa-Prnp^{0/0}* verwendet wurde, welcher in der Peripherie keine Expression des zellulären PrPs aufweist, könnte die Abwesenheit von CD4 und CD8-proliferierender T-Zellen auf diesen Effekt zurückgeführt werden. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass anti-PrP^C-Antikörper in der Lage sind, die T-Zell-Proliferation nach Mitogen-Stimulation zu reduzieren (Bainbridge and Walker, 2003;

Cashman et al., 1990). Die durch rek.PrP und PrP-P30 induzierten Anti-PrP^C-Antikörper in den *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäusen könnten, wie in dieser Arbeit beobachtet, zu einer verminderten T-Zell-Proliferation beigetragen haben.

In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass nur die Verabreichung von CpGs-1826 als Immunstimulator ausreicht, um T-Zellen zu aktivieren und dies zur Induktion autoaggressiver T-Lymphozyten führen kann (Sacher et al., 2002). Des Weiteren führte die Injektion dieser Oligonukleotide in die Kniegelenke von Mäusen zu einer durch Makrophagen induzierten Arthritis (Deng et al., 1999). Diese Beispiele für eine Induktion von autoaggressiven T-Lymphozyten konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht bestätigt werden, da weder die Proteinimmunisierungen noch die Immunisierung mit dem Kontrollpeptid Ovalbumin mit CpGs nach *ex vivo* Stimulation zu einer signifikanten Proliferation von T-Lymphozyten führte. Die in anderen Versuchen beobachteten autoaggressiven Immunreaktionen blieben in den vorliegenden Immunisierungsexperimenten aus.

Es ist allgemein bekannt, dass T-Zellen bei der Abwehr viraler und bakterieller Infektionen eine wichtige Funktion einnehmen. In der vorliegenden Arbeit scheinen allerdings neutralisierende Antikörper die Hauptmediatoren für einen wirksamen Schutz gegen eine Prioneninfektion zu sein. Diese humorale Immunantwort gegen das Prion-Protein scheint dabei unabhängig von einer T-Zell-Antwort zu sein. Dieser Effekt wird teilweise auch bei der Aktivierung von virus-spezifischen Gedächtniszellen beobachtet (Hebeis et al., 2004). Wie B-Zellen zur Sekretion von Antikörpern aktiviert werden, ohne die Hilfe von T-Zellen, muss noch geklärt werden. Eine Möglichkeit liegt in der Aktivierung durch andere T-Zell-unabhängige Faktoren, wie z.B. durch verschiedene Komplementfaktoren (Fischer et al., 1998) oder Typ-I Interferone (Le Bon et al., 2001).

5.1.4 Ausblick

Noch vor einigen Jahren galten Prionenerkrankungen als gänzlich nicht-therapierbar. Tatsächlich ist es bis heute nicht möglich, Prionenerkrankungen beim Menschen oder Tieren erfolgreich zu behandeln. Trotz allem gab es in jüngster Zeit eine Vielzahl an therapeutischen Entwicklungen im Bereich der Intervention gegen diese Krankheit, die auf vielversprechende Therapiemöglichkeiten schließen lassen. Die Immuntherapie von Prionenerkrankungen verfolgt das Ziel, das Prion-Protein durch das körpereigene Immunsystem anzugreifen. Viele Ansatzmöglichkeiten bei der Entwicklung von Vakzinen kommen aus dem Bereich der Onkologie, die ganz ähnlichen Prinzipien wie bei der Impfung gegen das Prion-Protein

unterliegt. Seit einigen Jahren werden beispielsweise dendritische Zellen als Vakzine gegen Tumore eingesetzt. Die DCs werden mit Tumorantigenen beladen, wandern in die Lymphknoten und aktivieren Tumor-spezifische T-Zellen (Papewalis et al., 2008, Zhang, 2008). Wie in diesen Arbeiten gezeigt werden konnte, könnte der Einsatz von PrP^C-exprimierenden DCs einen möglichen Ansatz in der Therapie von TSEs darstellen. Andere Möglichkeiten liegen in der Verwendung von rekombinanten Viren wie z.B. Vaccinia, Adenoviren oder Salmonella (Goni, 2005).

Allgemein ist die Entwicklung von Anti-Prionen-Therapeutika eindeutig im Bereich der Prophylaxe einzuordnen. Sobald sich die Krankheit klinisch manifestiert hat, kommt es zu massiven Schädigungen des Gehirns und eine Behandlung ist aller Wahrscheinlichkeit nicht mehr wirksam. Auch in der Zukunft wird es eine große Herausforderung sein, therapeutische Immunisierungsstrategien zu entwickeln, die eine schützende Immunantwort gegen Selbstantigene induzieren. Ein grundlegendes Verständnis für die Prozesse, die bei diesen Reaktionen wichtig sind, wird auch bei der Entwicklung von Impfstoffen gegen andere neurologische Erkrankungen wie z.B. die Alzheimer-Erkrankung oder gegen Tumore eine wichtige Rolle spielen.

5.2 Funktion von BAX und BCL-2 bei Prionenerkrankungen

Der Mechanismus, wie die Akkumulation von Prionen im zentralen Nervensystem von betroffenen Individuen zu Neurotoxizität und Neurodegeneration führt, ist noch nicht geklärt. Die typische Pathologie von Prionenerkrankungen sind astrozytäre Gliose, die Aktivierung von Mikroglia, die Ablagerung von PrP^{Sc} und letztendlich das Absterben von Neuronen. Es gibt zahlreiche Hypothesen über den Mechanismus der Priontoxizität im Gehirn und die dadurch entstehenden spongiformen Veränderungen. Obwohl die Expression von PrP^C für die Infektion eines Individuums essentiell ist, scheint die pathogene Form PrP^{Sc} keine direkte toxische Aktivität zu besitzen. Es sind Prionenerkrankungen beschrieben, in denen keine oder nur sehr geringen Mengen von PrP^{Sc} nachgewiesen werden können (Collinge et al., 1995; Hsiao et al., 1990; Lasmezas et al., 1997; Medori et al., 1992). Mäuse, die nur eine geringe Expression von PrP^C aufweisen, sind dennoch in der Lage eine große Menge von PrP^{Sc} im Gehirn zu akkumulieren, haben aber längere Inkubationszeiten als ihre wildtypischen Artgenossen (Bueler et al., 1994). Im Gegensatz dazu sind in Tg20-Tieren, welche eine 10-20 fache Expression von PrP^C aufweisen und im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich verkürzte Inkubationszeit haben, nur geringe Mengen der pathogenen Form PrP^{Sc} nachweisbar (Fischer et al., 1996). Einen weiteren Hinweis darauf, dass PrP^{Sc} an sich nicht toxisch wirkt, erhielt man durch Studien mit PrP^C-exprimierendem Gewebe, welches in Gehirne von *Prnp*^{0/0}-Empfängertiere transplantiert wurde. In diesen Fällen ist die Pathologie strikt auf das transplantierte Gewebe begrenzt und es kommt nach Infektion nicht zu einer Schädigung des angrenzenden Wirtsgewebe durch PrP^{Sc} (Brandner et al., 1996a), was auch in dieser Studie gezeigt werden konnte. Die Toxizität von Prionen wird also über andere Mechanismen wie z.B. Apoptose vermittelt. Die Apoptose, das Zelltodprogramm der Zelle, wird über Caspasen vermittelt, und ist für die Aufrechterhaltung des Zellgleichgewichts von entscheidender Bedeutung. Die Proteine BAX und BCL-2 gehören zur BCL-2 Familie von apoptotischen Proteinen, welche sowohl pro-als auch anti-apoptotische Regulatoren umfassen. Diese Proteine reagieren auf verschiedenste Formen von intrazellulärem Stress wie z.B. DNA-Schädigungen oder Mangel an Zytokinen. Ihre Sequenzen zeigen einen hohen Anteil an konservierten Aminosäuren, haben aber funktionell unterschiedliche Aufgaben. BCL-2 inhibiert apoptotische Vorgänge, wobei BAX diesen anti-apoptotischen Funktionen entgegenwirkt. BAX ist ein zytoplasmatisches Protein, das infolge apoptotischer Stimuli ins Mitochondrium transloziert, wo es verantwortlich ist für die Freisetzung von Cytochrom C und dem anschließenden Tod der Zelle (Putcha et al., 1999). Sowohl in mit Prionen-infizierten Mäusen, Hamstern und Schafen als auch in an Creutzfeldt-Jakob oder an FFI-

leidenden Patienten werden veränderte apoptotische Signalwege beschrieben (Dorandeu et al., 1998; Ferrer, 2002; Gray et al., 1999). Die genauen molekularen Signalvorgänge sind allerdings nicht bekannt. Die genetische Manipulation von pro-oder anti-apoptotischen Signalwegen führte in Mausmodellen für neurodegenerativen Erkrankungen zu einer Verzögerung der Pathologie, wie z.B. in Mausmodellen für Amyotrophe Lateralsklerose, Ischämie oder Axotomie (Dubois-Dauphin et al., 1994; Gould et al., 2006; Kostic et al., 1997; Li et al., 2007; Martinou et al., 1994; Tsai et al., 2006). In anderen Untersuchungen jedoch hatte die veränderte Expression apoptotischer Proteine keinen Einfluss auf die Pathologie neurodegenerativer Erkrankungen (Chiesa et al., 2005; Couplier et al., 2006; Kang et al., 2003; Sagot et al., 1995; Selimi et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass die zelluläre Form des Prion-Proteins an das C-terminale Ende von BCL-2 bindet, nicht aber mit BAX interagiert (Kurschner and Morgan, 1995, 1996). Neuronale Zelllinien, die kein PrP^C exprimieren, zeigen eine durch Serummangel ausgelöste erhöhte Apoptoserate. Diesem Effekt kann aber durch die Überexpression von BCL-2 entgegenwirkt werden (Kuwahara et al., 1999). Die ektopische Expression von BAX in humanen Neuronen führt innerhalb von 24 Stunden zum Zelltod, wobei dieser Effekt mit der Expression von BCL-2 oder PrP^C abgeschwächt werden kann (Bounhar et al., 2001). Die Komplexität von Prionen-vermittelter Neurodegeneration wird durch verschiedene *in vivo* Studien mit BAX-und BCL-2 noch untermauert. Zum Beispiel deletierten in der Arbeitsgruppe um Li et al. die Forscher BAX aus zwei unterschiedlichen PrP-Transgenen, wobei die Deletion in der einen Mutante zur Verhinderung des Zelltodes führte (PrP32-134) während die BAX-Deletion in der anderen Mutante keinen Einfluss zu haben scheint (PrP105-125). In einer neueren Studie wirkt die Überexpression von BCL-2 im für PrP-transgenen Mausmodell protektiv. Die Überexpression dieses anti-apoptotischen Faktors führt in diesen Tieren zu einer verlängerten Inkubationszeit und verzögert das Absterben von Neuronen (Nicolas et al., 2007). In Hamstern, die mit dem Hamsterprionenstamm 263K infiziert wurden, kam es zur Überexpression von BAX im Gehirn (Park et al., 2000) und dies lässt darauf schließen, dass es in der Pathologie von Prionenerkrankungen eine wichtige Funktion übernimmt. Allerdings zeigt BAX in Mäusen, die mit dem Maus-adaptierten Prionenstamm RML infiziert werden, keine erhöhte Expression. Die Rolle von BAX in Prionenerkrankung ist somit nicht vollständig geklärt.

Da die Proteine BAX und BCL-2 in vielen neurologischen Erkrankungsmodellen in apoptotischen Signalvorgängen von entscheidender Bedeutung sind und ihr Fehlen in diesen Modellen zu einer Verzögerung der Erkrankung führen kann, entstand die Frage, ob BAX- oder BCL-2 defizientes neuronales Gewebe einen Einfluss auf die Prionenpathogenese besitzt. Kommt es durch das Fehlen des proapoptotischen Faktors BAX zum Schutz

gegenüber Prioneninfektion? Und zeigt die Deletion des BAX-Gegenspielers BCL-2 eine stärkere Pathologie als wildtypisches Gewebe? Um diese Fragen zu untersuchen, wurde das Transplantationsmodell verwendet. Mit Prionen-inokulierte und mit neuroektodermalen Gewebe transplantierte *Prnp^{0/0}*-Empfängertiere werden nicht krank und somit war es möglich, für BAX- und BCL-2 defizientes Gewebe bis zu 376 Tage nach Infektion mit Prionen auf Prionenpathologie zu untersuchen, einen Zeitraum, welchen die Donoren des ektodermalen Transplantats nicht erreicht hätten. Der Einfluss des Fehlens der apoptotischen Faktoren BAX und BCL-2 auf den Verlauf der Erkrankung wurde analysiert. In dieser Arbeit konnte kein schützender Effekt der Deletion von BAX oder BCL-2 auf die Prionenpathogenese gezeigt werden. Die Akkumulation von PrP^{Sc} im transplantierten Gewebe wurde mittels der Petblot-Technik detektiert und konnte nur im transplantierten Gewebe nachgewiesen werden (Abb. 37). Die Anreicherung der pathogenen Form des Prion-Proteins war dabei strikt auf das PrP^C-exprimierende Transplantat beschränkt, ein Ergebnis das die Resultate von Aguzzi bestätigt (Aguzzi et al., 1997). In früheren Arbeiten wurde eine Verbreitung der PrP^{Sc} Moleküle in das umgebende Wirtsgewebe beobachtet, ohne jedoch zur typischen Prionenpathologie zu führen (Brandner et al., 1998; Brandner et al., 1996a). Solch eine Verbreitung von PrP^{Sc} in das benachbarte Wirtsgewebe wurde in den untersuchten Transplantaten dieser Arbeit nicht beobachtet.

Mittels Immunhistochemie konnte in den Transplantaten eine starke Gliose und Hypertrophie von Astrozyten und erhöhter GFAP-Expression nachgewiesen werden (Abb. 38). Hinsichtlich der Stärke der auftretenden Pathologie wurde weder zwischen BAX- und BCL-2 defizientem Gewebe oder wildtypisch-transplantiertem Gewebe signifikante Unterschiede detektiert. Vakuolisierung und der Verlust von Synapsen im Gehirn ist ein typisches Merkmal von spongiformen Enzephalopathien. Obwohl es noch nicht bekannt ist, ob das Auftreten von spongiformen Veränderungen direkt mit dem Tod von Neuronen in Zusammenhang gebracht werden kann (Armstrong et al., 2003; Masters and Richardson, 1978), ist gezeigt worden, dass die Vakuolisierung des Neuropils zu neuronalen Veränderungen führt (Jeffrey et al., 1992). Mit einer HE-Färbung wurde gezeigt, dass es innerhalb des transplantierten, PrP^C-exprimierenden und für BAX- oder BCL-2 defizienten Gewebes zu einer ausgeprägten Vakuolisierung des Gewebes kommt (Abb. 38). Es konnten hierbei keine Unterschiede hinsichtlich des Genotyps des transplantierten Gewebes festgestellt werden. Obwohl keine Quantifizierung der Vakuolen vorgenommen wurde, sind signifikante Unterschiede zwischen BAX- oder BCL-2 defizientem Gewebe und wildtypischem Gewebe nicht ersichtlich. Die Deletion der apoptotischen Faktoren BAX und BCL-2 hat auf den Prozess der Vakuolisierung und des damit verbundenen spongiformen Phänotyps keinen Einfluss. Es muss davon

ausgegangen werden, dass für die Vermittlung der Toxizität im zentralen Nervensystem sowohl BAX-abhängige als auch BAX-unabhängige Signalvorgänge verantwortlich sind. Die erhaltenen Ergebnisse sind konsistent mit anderen Arbeiten bei denen beispielsweise BAX-defiziente Mäuse mit Rinderprionen infiziert wurden. In dieser Arbeit von Couplier und Kollegen hatte die Deletion von BAX ebenfalls keinen Einfluss auf die Neuropathologie, auf die Inkubation und den Verlauf der Krankheit oder die PrP^{Sc}-Akkumulation. Auch für diesen Prionenstamm scheint ein BAX-abhängiger Apoptose-Signalweg für die Entwicklung der Pathologie keinen Einfluss zu haben (Couplier et al., 2006), ähnlich wie für den in dieser Arbeit verwendeten Prionenstamm RML.

5.2.1 Die neuronale Differenzierung der Transplantate ist unbeeinflusst

Zusätzlich wurden in den immunhistochemischen Analysen Antikörper verwendet, die gegen Synaptophysin oder MAP-2 gerichtet sind, um die Integrität des neuronalen Gewebes zu untersuchen und Veränderungen innerhalb der Transplantate aufzudecken. Die immunhistochemische Untersuchung auf MAP-2- und Synaptophysin- Expression innerhalb der Transplantate zeigte eine starke Färbung sowohl innerhalb der Transplantate als auch im umgebenden Wirtsgewebe (Abb. 39). Ein signifikanter Unterschied zwischen BAX-bzw. BCL-2 defizienten neuronalem Gewebe und Gewebe aus Wildtyp-Spendertieren war nicht zu erkennen. Veränderungen in der Expression von MAP-2 und Synaptophysin sind in der Funktion von Neuronen von Bedeutung. MAP-2 ist bei der Neubildung von Synapsen und dem Neuronenwachstum von Bedeutung (Gordon-Weeks, 1993). Es wurde gezeigt, dass neuronale Degeneration mit dem Verlust von MAP-2 korreliert (Matesic and Lin, 1994). Synaptophysin ist ein in präsynaptischen Vesikeln lokalisiertes Protein, welches für die Exozytose von gespeicherten Neurotransmittern verantwortlich ist (Thomas et al., 1988). Veränderungen in der Expression von Synaptophysin führen dabei zur Veränderung der synaptischen Übertragung. Abweichungen in der Expression von MAP-2 und Synaptophysin können somit zu veränderter neuronaler Aktivität im Gehirn führen. In den untersuchten Transplantaten konnte hinsichtlich der Expression von MAP-2 und Synaptophysin kein signifikanter Unterschied zwischen infizierten Transplantaten und nicht-infiziertem Wirtsgewebe beobachtet werden. Die Deletion von BAX oder BCL-2 hat somit in den hier beschriebenen Untersuchungen keinen Einfluss auf die synaptische Integrität von neuronalen Transplantaten.

Nach dem Stand der heutigen Forschung werden allgemein apoptotische Mechanismen als möglicher Auslöser von neuronalen Zelltod in TSEs angesehen. Allerdings wird ein wichtiges

biochemisches Kennzeichen der Apoptose, die Fragmentierung von DNA in die typische Leiterstruktur, nicht mehr als notwendige Bedingung angesehen. In einigen Tiermodellen scheint diese Fragmentierung trotz morphologischer Charakteristika von Apoptose nicht zu entstehen (Cohen et al., 1992). Die typische DNA-Fragmentierung wurde auch in mehreren Fällen von Zelltod beobachtet, die durch Nekrose ausgelöst wurden (Ferrer, 1999; Ferrer et al., 1994; Sastry and Rao, 2000). Die Frage nach apoptotischem Zelltod in Prionenerkrankungen ist deshalb widersprüchlich. In verschiedenen mit Scrapie-infizierten Mausmodellen wurden apoptotische Mechanismen nachgewiesen (Giese et al., 1995; Giese and Kretzschmar, 2001; Kretzschmar, 1999; Kretzschmar et al., 1997; Lucassen et al., 1995; Williams et al., 1997). Die charakteristische DNA-Fragmentierung wurde sowohl in BSE-Fällen (Jesionek-Kupnicka et al., 1999; Theil et al., 1999) als auch in natürlich vorkommenden Scrapie-Fällen (Fairbairn et al., 1994) beobachtet. TUNEL-Färbungen wiesen zusätzlich auf apoptotische Zellen in humanen CJD-Fällen (Ferrer, 1999) und FFI-Patienten (Dorandeu et al., 1998) hin. Auf der anderen Seite wurden in humanen TSE-Biopsaten trotz TUNEL-positiver Zellen keine morphologischen Eigenschaften von Apoptose gefunden (Ferrer, 1999). Die Markierung der aktivierten Caspase-3 stellt eine Alternative zur mittlerweile kontrovers diskutierten TUNEL-Färbung dar, die fragmentierte DNA detektiert (Gavrieli et al., 1992). Inzwischen wurde festgestellt, dass DNA-Strangbrüche auch beim nekrotischen Zelluntergang, bei Autolyse und bei der Gewebefixierung und -bearbeitung entstehen (Grasl-Kraupp et al., 1995). Demzufolge kann die TUNEL-Färbung nicht akkurat zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen unterscheiden und ist somit kein spezifischer Marker für Apoptose (Charriaut-Marlangue and Ben-Ari, 1995). Um herauszufinden, ob andere apoptotische Proteine als BAX oder BCL-2 in dem durch Prionen-induzierten Zelltod involviert sind, wurden in dieser Arbeit Gehirnschnitten von mit BAX- und BCL-2-defizientem Gewebe auf die Expression von aktivierter Caspase-3 untersucht. Es war möglich dieses Protein, welches zur Familie der Exekutions-Caspasen gehört und unter anderem durch BAX und BCL-2 reguliert wird, in allen Transplantaten nachzuweisen (Abb. 40). Es wurden hinsichtlich der Stärke der Expression keine Unterschiede zwischen den BAX- und BCL-2 defizienten Transplantaten festgestellt. Dies weist darauf hin, dass für die Aktivierung zumindest dieser Caspase, BAX- und BCL-2-unabhängige Signalwege existieren müssen. Ein Kandidat für solch eine Aktivierung ist die Caspase-12, welche in diesem Signalweg Caspase-3 vorangeschaltet ist. Ein Hinweis darauf zeigten die Arbeiten von Hetz und Mitarbeitern (Hetz et al., 2003b), welche gezeigt haben, dass diese Caspase bei verschiedenen Prionenerkrankungen beteiligt ist und für die Aktivierung der Caspase-9 und somit auch für die Aktivität der Caspase-3 verantwortlich ist (Morishima et al., 2002). Insgesamt konnten in den Transplantaten nur vereinzelt Caspase-3

positive Zellen detektiert werden, was einerseits auf die doch zeitlich begrenzte Aktivität dieser Proteine zurückzuführen ist. In nicht-infizierten Wildtyp-Kontrollen wurden allerdings keine deutlich positiven Zellfärbungen für Caspase-3 beobachtet. Zusätzlich zum Nachweis der Caspase-3 Aktivierung, wurden die Transplantate mit TUNEL-Färbung auf apoptotische Zellen untersucht. Es konnten sowohl in BAX- als auch BCL-2 defizienten Transplantaten TUNEL-positive Zellen nachgewiesen werden, wobei der Anteil an positiven Zellen in BCL-2-losen Transplantaten im Vergleich zu BAX-defizientem Gewebe deutlich höher war (Abb. 41). Obwohl diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass zumindest einige Neuronen aufgrund apoptotischer Mechanismen sterben, weisen viele Ergebnisse darauf hin, dass andere Zelltodarten für den Neuronenverlust in TSE-Fällen verantwortlich sind.

5.2.2 Autophagie als möglicher Mechanismus des neuronalen Zelltods in TSEs

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Deletion von BAX oder BCL-2 auf die Pathologie von Prionenerkrankungen keinen Einfluss hat. In den untersuchten Zeiträumen über 200 Tage nach Infektion mit Prionen, war die Akkumulation von PrP^{Sc} im Gehirn und die Astrogliose durch die Abwesenheit der apoptotischen Faktoren im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. Diese Ergebnisse korrelieren mit anderen Arbeiten, die die Funktion von BAX und BCL-2 in der Prionenpathogenese mit Hilfe anderer Modelle untersucht haben. Steele und Mitarbeiter inokulierten sowohl BAX-defiziente als auch BCL-2 überexprimierende Mäuse mit Prionen. Auch in dieser Arbeit konnte weder der Ausbruch der Krankheit verhindert, noch die Schwere der Pathologie beeinflusst werden (Steele et al., 2007).

Trotz der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann eine Funktion von BAX oder BCL-2 in Prionen-induzierter Neurodegeneration nicht völlig ausgeschlossen werden. Wenn ein BAX- oder BCL-2 abhängiger Signalweg bei der Vermittlung der Pathologie involviert ist, könnte die Deletion dieser Faktoren in diesem frühen Stadium durch andere apoptotische Mechanismen kompensiert werden. In diesem Fall könnte man durch die Untersuchung der Transplantate in einem früheren Stadium der Krankheit eine eventuell verzögerte Pathologie im Gehirn beobachten. Eine andere Möglichkeit der Kompensation des Fehlens von BAX oder BCL-2 besteht in der Übernahme der Funktion dieser Proteine von Mitgliedern derselben Familie apoptotischer Faktoren. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurde gezeigt, dass die Deletion von BAK zusätzlich zu BAX, Photorezeptoren effizienter vor Apoptose schützen kann, als das Ausschalten eines dieser Proteine allein (Hahn et al., 2004; Wei et al., 2001). Ein anderer möglicher Signalweg für die durch Prionen induzierte Neurotoxizität besteht in

nicht-apoptotischen Prozessen wie beispielsweise dem Prozess der Autophagie. Der Prozess der Autophagie ist ein degradativer Mechanismus, der am Recycling und Umsatz zytoplasmatischer Proteine und auch Organellen beteiligt ist. Zusätzlich zur Funktion der Aufrechterhaltung der zellulären Homeostase kann die Autophagie auch zum Zelltod beitragen. Der Mechanismus der Autophagie spielt während der Morphogenese als autophagischer programmierter Zelltod eine Rolle, aber es gibt inzwischen auch Hinweise auf seine Beteiligung im adulten Organismus (Bursch and Ellinger, 2005). Ein Hinweis auf die Beteiligung von Autophagie an neurodegenerativen Prozessen lieferten Arbeiten von Liberski und Mitarbeitern (Liberski et al., 2004) einerseits durch Untersuchungen an humanen TSE-Fällen als auch in verschiedenen mit Scrapie-infizierten Tiermodellen. (Dron et al., 2005, 2006). Obwohl die Autophagie ein verbreitetes Merkmal von TSE-Fällen darstellt, bleibt es unklar wie die Autophagie zur allgemeinen Pathologie und zum neuronalen Zelltod im Besonderen beiträgt. Die in der Literatur vorhandenen, zum Teil gegensätzlichen Studien lassen keine klare Aussage darüber zu, welcher Zelltodtyp zur Pathologie von TSE-Erkrankungen beiträgt.

Mit den Ergebnissen in dieser Arbeit kann man davon ausgehen, dass BAX- und BCL-2, zwei Hauptmediatoren neuronaler Apoptose, für die Toxizität von Prionen keine unmittelbare Rolle spielen. Dies steht im Gegensatz zu vielen anderen pathologischen Situationen, in denen BAX und BCL-2 bei der neuronalen Apoptose eine wichtige Rolle zu spielen scheinen, wie z.B. bei einigen vererbten Formen von Prionenerkrankungen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Prionenerkrankungen oder Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSEs) sind übertragbare Krankheiten, zu denen die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) beim Menschen, Scrapie bei Schafen und die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rindern gehören. Der infektiöse Erreger (PrP^{Sc}) besteht dabei aus einer abnormalen Form des zellulären Prion-Proteins (PrP^C) und unterscheidet sich von dieser nur in der Proteinstruktur. Ein Hauptproblem bei der Entwicklung von aktiven Immunisierungsstrategien gegen Prionenerkrankungen besteht in der fehlenden Reaktion des Immunsystems auf das ubiquitär exprimierte Selbst-Antigen PrP^C, welche auf einer Immuntoleranz gegen das körpereigene Protein beruht. In dieser Arbeit wurde ein transgenes Mausmodell für aktive Immunisierungsexperimente verwendet. Diese transgenen Tiere exprimieren Hamster-PrP^C (HaPrP) unter der Kontrolle des Neuronen-spezifischen Enolase-Promotors (NSE) ausschließlich im Nervensystem auf einem *Prnp*^{0/0}-Hintergrund. Durch die Verwendung eines „artfremden“ Proteins (rekombinantes Maus-PrP) gegen endogenes Hamster-PrP als Vakzine sollte die Immunogenität des Proteins verstärkt werden. Zusätzlich wurde für die Immunisierungen ein Fusionsprotein aus Maus-PrP und einem T-Helferepitop des Tetanustoxins (P30) eingesetzt. Als Adjuvanz diente das bakterielle DNA-Motiv CpG-1826, welches die Fähigkeit besitzt T- und B-Lymphozyten direkt zu stimulieren und die Sekretion von Interleukinen zu induzieren. Die Immunisierungen erfolgten subkutan und wurden monatlich durchgeführt. Nach jedem Boost wurden die Blutseren auf Antikörper sowohl gegen Maus-PrP als auch gegen Hamster-PrP untersucht. Neben der Analyse der humoralen Immunantwort mittels ELISA, Westernblot und FACS, wurden die Seren der immunisierten Mäuse auf ihre Fähigkeit getestet, die Prionenreplikation *in vitro* zu inhibieren. Mit der gewählten Immunisierungsstrategie war es mit beiden Proteinen möglich, hohe Antikörperantworten sowohl gegen Maus- als auch gegen Hamster-Prion-Protein zu induzieren. In Zellkultur waren die Seren in der Lage, signifikant den PrP^{Sc}-Gehalt zu reduzieren. Die immunisierten Mäuse wurden mit Hamsterprionen infiziert, um den Einfluss der induzierten Antikörper auf den Verlauf der Krankheit zu untersuchen. Nach Immunisierung mit PrP-P30 zeigten die Mäuse gegenüber mit Ovalbumin-behandelten Kontrolltieren eine signifikant verlängerte Inkubationszeit von ca. 30%. Im Gegensatz dazu konnte nach Immunisierung mit PrP ohne das zusätzliche T-Helferepitop keine Verlängerung in den Inkubationszeiten beobachtet werden. Abschließend wurde die Immunantwort in den immunisierten Tieren auf zellulärer Ebene mittels Proliferationsanalyse von T- und B-Lymphozyten untersucht. Dafür wurden Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten der

immunisierten *NSEHa-Prnp^{0/0}*-Mäusen isoliert, *ex vivo* mit Maus-PrP bzw. Hamster-PrP stimuliert und auf die Proliferation von CD4-positiven oder CD8-positiven T-Lymphozyten untersucht. Durch die Analyse wurde gezeigt, dass es nach Immunisierung mit rek.PrP oder PrP-P30 zu keiner spezifischen Proliferation von T-Lymphozyten kam. Die beobachtete humorale Immunantwort scheint also unabhängig von einer spezifischen T-Zell-Immunantwort zu wirken.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, durch die Wahl von geeigneten Immunisierungsstrategien, die Toleranz gegen das Selbstprotein PrP zu brechen. Sie stellen eine Grundlage für weitere Forschungsansätze dar, um prophylaktische Immunisierungen gegen Prionenerkrankungen in Zukunft zu realisieren.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die Funktion der apoptotischen Faktoren BAX und BCL-2 in der Prionen-induzierten Neurodegeneration *in vivo* untersucht. Dazu wurde neuroektodermales Gewebe aus *BAX^{-/-}* und *BCL-2^{-/-}*-Embryonen in das Gehirn von PrP-Knockout-Mäusen (*Prnp^{0/0}*) transplantiert. Diese PrP^C-defizienten Tiere sind nicht mit Prionen infizierbar und können PrP^{Sc} nicht propagieren. Nach Langzeitinfektion mit Mausprionen wurden die Transplantate histochemisch auf Prionenpathologie untersucht. Die typischen neuropathologischen Veränderungen waren dabei strikt auf das PrP^C-positive Transplantat begrenzt. Zusätzlich wurden die Transplantate auf apoptotische Veränderungen untersucht und dabei TUNEL-Färbungen und aktivierte-Caspase-3 Färbungen durchgeführt. Es zeigten sich hierbei hinsichtlich Ausprägung und Stärke der Pathologie keine Unterschiede zwischen den BAX-bzw. BCL-2-Knockout Transplantaten und wildtypischen Transplantaten. Daraus konnte gefolgert werden, dass in diesem Modell weder BAX noch BCL-2 eine signifikante Rolle bei der Prionenpathogenese spielen. Die Ergebnisse aus diesem Teil der Arbeit leisten einen wichtigen Beitrag für das bessere Verständnis der durch Prionen-induzierten Neurodegeneration und sind für die Entwicklung von potentiellen therapeutischen Strategien hilfreich.

7 SUMMARY

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are a group of fatal neurodegenerative disorders that affect animals as well as humans (Prusiner, 1997). The most prominent are Creutzfeldt-Jacob disease (CJD) in humans, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle, scrapie in sheep and goats and chronic wasting disease (CWD) in cervids. These diseases are characterized by the conversion of the cellular prion protein (PrP^C) into the abnormally folded isoform termed PrP^{Sc}, which accumulates and represents the major component of infectious prions (Aguzzi and Polymenidou, 2004). The development of an effective PrP vaccine has been hampered by immunotolerance to the ubiquitously expressed endogenous PrP^C and the immunization with recombinant PrP led only to weak antibody-responses against the protein in wildtype mice. Here, we tried to circumvent this problem experimentally by generation of anti-PrP immunity in hamster transgenic mice. These mice (*NSEHa-Prnp^{0/0}*) express Hamster-PrP under the control of the neuron-specific enolase Promotor (NSE) exclusively in the nervous system on a *Prnp^{0/0}* background (Race et al., 1995). To further enhance the immunogenic feature of the mouse Prion-Protein, we fused a T-Helper epitope of the tetanus toxin (P30) to the C-terminal end of the protein (Panina-Bordignon et al., 1989). This epitope has been successfully in the development of several anti-tumour vaccines (Hertz et al., 2001; Steinaa et al., 2008). For the immunization the recombinant mouse Prion-Protein (PrP) as well as the fusion construct, called PrP-P30, was used. The bacterial DNA-Motif CpG-1826 was co-injected as an adjuvant, known as a direct stimulator of T-and B-cells and to have the ability to induce the secretion of interleukins (Krieg, 2002). The immunization was performed monthly and the sera were analysed after every boost for the presence of antibodies against Mouse- and Hamster-PrP. Beside the analysis of the humoral response via ELISA, Westernblot and FACS, the sera of the immunized mice were tested for their ability to inhibit prion replication *in vitro*. With the selected immunization strategy it was possible to induce a high antibody response both against Mouse-PrP as well as against Hamster-PrP. In the cell culture assay with prion-infected cells a significant decrease of the PrP^{Sc} level was observed.

Furthermore the immunized animals were inoculated with Hamster prions to assess the efficiency of the induced antibodies to prolong the incubation time of the disease. With the introduction of the T-Helper epitope P30 it was possible to prolong the survival time of the treated animals about 30%, in comparison to the animals receiving only PrP without P30 or control animals, which were treated with Ovalbumin, respectively. A second group of

transgenic mice was immunized to investigate the cellular immune response by proliferation assays. Towards this, lymphocytes of spleen and lymph nodes of the immunized animals were isolated and stimulated *ex vivo* with either mouse- or hamster-PrP. This analysis showed that the induced humoral immune response was independent of T-cells, because no specific proliferation of neither CD4- nor CD8-positive T-cells could be observed.

In conclusion, the results clearly demonstrate that the possibility to break the self-tolerance against PrP by using appropriate vaccination strategies. It therefore might open a new avenue for the future development of prophylactic prion vaccines.

In a second part of the work, the role of BAX and BCL-2 in prion-mediated neurodegeneration was characterized *in vivo*. BAX- and BCL-2- deficient neuroectodermal tissue was transplanted into the brain of *Prnp^{0/0}* recipient mice. Mice devoid of PrP^C (*Prnp^{0/0}*) are resistant to prions and do not propagate the infectious agent (Bueler et al., 1993). After long-term infection with mouse scrapie prions, typical histopathological features of the disease, such as gliosis, spongiosis and PrP^{Sc} accumulation were examined with histochemical techniques in the engrafted brains and the pathological changes were restricted to the PrP^C-expressing neurografts. Furthermore we perform TUNEL and active-Caspase 3 stainings for determination and detection of apoptotic changes in the neurografts. Regarding the strength and characteristics of prion pathology no differences were seen between BAX- and BCL-2-Knockout grafts in comparison to the wildtype tissue. In summary, these results demonstrate that neither BAX nor BCL-2, two major players of apoptosis, are necessary for prion-induced neurodegeneration. These results therefore contribute to a better understanding of the pathogenic mechanisms in prion diseases and are useful for the development of future therapeutical strategies.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Adjou, K.T., Demaimay, R., Deslys, J.P., Lasmezas, C.I., Beringue, V., Demart, S., Lamoury, F., Seman, M., and Dormont, D. (1999). MS-8209, a water-soluble amphotericin B derivative, affects both scrapie agent replication and PrPres accumulation in Syrian hamster scrapie. *J Gen Virol* 80 (Pt 4), 1079-1085.
- Adjou, K.T., Demaimay, R., Lasmezas, C., Deslys, J.P., Seman, M., and Dormont, D. (1995). MS-8209, a new amphotericin B derivative, provides enhanced efficacy in delaying hamster scrapie. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 2810-2812.
- Aguzzi, A., Blattler, T., Klein, M.A., Raber, A.J., Hegyi, I., Frigg, R., Brandner, S., and Weissmann, C. (1997). Tracking prions: the neurografting approach. *Cell Mol Life Sci* 53, 485-495.
- Aguzzi, A., and Polymenidou, M. (2004). Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* 116, 313-327.
- Aguzzi, A., Sigurdson, C., and Heikenwalder, M. (2007). Molecular Mechanisms of Prion Pathogenesis. *Annu Rev Pathol*.
- Aguzzi, A., and Sigurdson, C.J. (2004). Antiprion immunotherapy: to suppress or to stimulate? *Nat Rev Immunol* 4, 725-736.
- Alcorn, S.W., and Pascho, R.J. (2000). Single-dilution enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of antigen-specific salmonid antibody. *J Vet Diagn Invest* 12, 245-252.
- Annacker, O., Pimenta-Araujo, R., Burlen-Defranoux, O., Barbosa, T.C., Cumano, A., and Bandeira, A. (2001). CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* 166, 3008-3018.
- Armstrong, R.A., Lantos, P.L., Ironside, J.W., and Cairns, N.J. (2003). Spatial correlation between the vacuolation, prion protein, deposition and surviving neurons in patients with Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD). *J Neural Transm* 110, 1303-1311.
- Astori, M., and Kraehenbuhl, J.P. (1996). Recombinant fusion peptides containing single or multiple repeats of a ubiquitous T-helper epitope are highly immunogenic. *Mol Immunol* 33, 1017-1024.
- Aucouturier, P., Carp, R.I., Carnaud, C., and Wisniewski, T. (2000). Prion diseases and the immune system. *Clin Immunol* 96, 79-85.
- Babbitt, B.P., Allen, P.M., Matsueda, G., Haber, E., and Unanue, E.R. (1985). Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 317, 359-361.
- Bainbridge, J., and Walker, B. (2003). Cell mediated immune responses against human prion protein. *Clin Exp Immunol* 133, 310-317.
- Beekes, M., and McBride, P.A. (2000). Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett* 278, 181-184.
- Benoist, C., and Mathis, D. (2001). Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol* 2, 797-801.
- Beringue, V., Vilette, D., Mallinson, G., Archer, F., Kaisar, M., Tayebi, M., Jackson, G.S., Clarke, A.R., Laude, H., Collinge, J., and Hawke, S. (2004). PrPSc binding antibodies are potent inhibitors of prion replication in cell lines. *J Biol Chem* 279, 39671-39676.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.

- Blattler, T., Brandner, S., Raeber, A.J., Klein, M.A., Voigtlander, T., Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1997). PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* 389, 69-73.
- Bliss, J., Van Cleave, V., Murray, K., Wiencis, A., Ketchum, M., Maylor, R., Haire, T., Resmini, C., Abbas, A.K., and Wolf, S.F. (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, 887-894.
- Bolton, D.C., McKinley, M.P., and Prusiner, S.B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218, 1309-1311.
- Bomford, R. (1998). Will adjuvants be needed for vaccines of the future? *Dev Biol Stand* 92, 13-17.
- Borchelt, D.R., Taraboulos, A., and Prusiner, S.B. (1992). Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem* 267, 16188-16199.
- Borgerson, K.L., Bretz, J.D., and Baker, J.R., Jr. (1999). The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid autoimmune disease. *Autoimmunity* 30, 251-264.
- Bounhar, Y., Zhang, Y., Goodyer, C.G., and LeBlanc, A. (2001). Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 276, 39145-39149.
- Brandner, S., Isenmann, S., Kuhne, G., and Aguzzi, A. (1998). Identification of the end stage of scrapie using infected neural grafts. *Brain Pathol* 8, 19-27.
- Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1996a). Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379, 339-343.
- Brandner, S., Raeber, A., Sailer, A., Blattler, T., Fischer, M., Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1996b). Normal host prion protein (PrPC) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13148-13151.
- Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., *et al.* (1997). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390, 684-687.
- Brown, D.R., Schmidt, B., Groschup, M.H., and Kretzschmar, H.A. (1998). Prion protein expression in muscle cells and toxicity of a prion protein fragment. *Eur J Cell Biol* 75, 29-37.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguët, M., and Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguët, M., and Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577-582.
- Bueler, H., Raeber, A., Sailer, A., Fischer, M., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1994). High prion and PrP^{Sc} levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med* 1, 19-30.
- Bursch, W., and Ellinger, A. (2005). Autophagy--a basic mechanism and a potential role for neurodegeneration. *Folia Neuropathol* 43, 297-310.
- Butler, D.A., Scott, M.R., Bockman, J.M., Borchelt, D.R., Taraboulos, A., Hsiao, K.K., Kingsbury, D.T., and Prusiner, S.B. (1988). Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J Virol* 62, 1558-1564.
- Carimalo, J., Cronier, S., Petit, G., Peyrin, J.M., Boukhtouche, F., Arbez, N., Lemaigre-Dubreuil, Y., Brugg, B., and Miquel, M.C. (2005). Activation of the JNK-c-Jun pathway during the early phase of neuronal apoptosis induced by PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ and prion infection. *Eur J Neurosci* 21, 2311-2319.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Cashman, N.R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascsak, R.J., Bolton, D.C., and Bendheim, P.E. (1990). Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* 61, 185-192.
- Castilla, J., Hetz, C., and Soto, C. (2004). Molecular mechanisms of neurotoxicity of pathological prion protein. *Curr Mol Med* 4, 397-403.
- Caughey, B., and Raymond, G.J. (1991). The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* 266, 18217-18223.
- Caughey, B., and Raymond, G.J. (1993). Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol* 67, 643-650.
- Chandler, R.L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* 1, 1378-1379.
- Charriaut-Marlangue, C., and Ben-Ari, Y. (1995). A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 7, 61-64.
- Chiarini, L.B., Freitas, A.R., Zanata, S.M., Brentani, R.R., Martins, V.R., and Linden, R. (2002). Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *Embo J* 21, 3317-3326.
- Chiesa, R., Piccardo, P., Dossena, S., Nowoslawski, L., Roth, K.A., Ghetti, B., and Harris, D.A. (2005). Bax deletion prevents neuronal loss but not neurological symptoms in a transgenic model of inherited prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 238-243.
- Cho, H.J., Hayashi, T., Datta, S.K., Takabayashi, K., Van Uden, J.H., Horner, A., Corr, M., and Raz, E. (2002). IFN-alpha beta promote priming of antigen-specific CD8+ and CD4+ T lymphocytes by immunostimulatory DNA-based vaccines. *J Immunol* 168, 4907-4913.
- Choi, J.Y., and Craft, J. (2004). Activation of naive CD4+ T cells in vivo by a self-peptide mimic: mechanism of tolerance maintenance and preservation of immunity. *J Immunol* 172, 7399-7407.
- Chu, R.S., Targoni, O.S., Krieg, A.M., Lehmann, P.V., and Harding, C.V. (1997). CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 186, 1623-1631.
- Cohen, G.M., Sun, X.M., Snowden, R.T., Dinsdale, D., and Skilleter, D.N. (1992). Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J* 286 (Pt 2), 331-334.
- Coleman, J.W., Yeung, J.H., Tingle, M.D., and Park, B.K. (1986). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to protein-reactive drugs and metabolites: criteria for identification of antibody activity. Detection and hapten specificity of anti-DNP, anti-captopril and anti-sulphanilamidobenzoic acid. *J Immunol Methods* 88, 37-44.
- Collinge, J., Palmer, M.S., Sidle, K.C., Hill, A.F., Gowland, I., Meads, J., Asante, E., Bradley, R., Doey, L.J., and Lantos, P.L. (1995). Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature* 378, 779-783.
- Collinge, J., Whittington, M.A., Sidle, K.C., Smith, C.J., Palmer, M.S., Clarke, A.R., and Jefferys, J.G. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370, 295-297.
- Come, J.H., Fraser, P.E., and Lansbury, P.T., Jr. (1993). A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5959-5963.
- Cooper, P.D., Turner, R., and McGovern, J. (1991). Algammulin (gamma inulin/alum hybrid adjuvant) has greater adjuvanticity than alum for hepatitis B surface antigen in mice. *Immunol Lett* 27, 131-134.
- Coulpier, M., Messiaen, S., Hamel, R., Fernandez de Marco, M., Lilin, T., and Eloit, M. (2006). Bax deletion does not protect neurons from BSE-induced death. *Neurobiol Dis* 23, 603-611.

- Davila, E., Kennedy, R., and Celis, E. (2003). Generation of antitumor immunity by cytotoxic T lymphocyte epitope peptide vaccination, CpG-oligodeoxynucleotide adjuvant, and CTLA-4 blockade. *Cancer Res* 63, 3281-3288.
- Davis, H.L., Weeratna, R., Waldschmidt, T.J., Tygrett, L., Schorr, J., and Krieg, A.M. (1998). CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 160, 870-876.
- DeArmond, S.J. (1993). Overview of the transmissible spongiform encephalopathies: prion protein disorders. *Br Med Bull* 49, 725-737.
- DeArmond, S.J. (2004). Discovering the mechanisms of neurodegeneration in prion diseases. *Neurochem Res* 29, 1979-1998.
- DeArmond, S.J., Yang, S.L., Lee, A., Bowler, R., Taraboulos, A., Groth, D., and Prusiner, S.B. (1993). Three scrapie prion isolates exhibit different accumulation patterns of the prion protein scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6449-6453.
- Deng, G.M., Nilsson, I.M., Verdrengh, M., Collins, L.V., and Tarkowski, A. (1999). Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat Med* 5, 702-705.
- Diarra-Mehrpour, M., Arrabal, S., Jalil, A., Pinson, X., Gaudin, C., Pietu, G., Pitaval, A., Ripoche, H., Eloit, M., Dormont, D., and Chouaib, S. (2004). Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Cancer Res* 64, 719-727.
- Dorandeu, A., Wingertsmann, L., Chretien, F., Delisle, M.B., Vital, C., Parchi, P., Montagna, P., Lugaresi, E., Ironside, J.W., Budka, H., *et al.* (1998). Neuronal apoptosis in fatal familial insomnia. *Brain Pathol* 8, 531-537.
- Dron, M., Bailly, Y., Beringue, V., Haeberle, A.M., Griffond, B., Risold, P.Y., Tovey, M.G., Laude, H., and Dandoy-Dron, F. (2005). Scrg1 is induced in TSE and brain injuries, and associated with autophagy. *Eur J Neurosci* 22, 133-146.
- Dron, M., Bailly, Y., Beringue, V., Haeberle, A.M., Griffond, B., Risold, P.Y., Tovey, M.G., Laude, H., and Dandoy-Dron, F. (2006). SCRG1, a potential marker of autophagy in transmissible spongiform encephalopathies. *Autophagy* 2, 58-60.
- Dubois-Dauphin, M., Frankowski, H., Tsujimoto, Y., Huarte, J., and Martinou, J.C. (1994). Neonatal motoneurons overexpressing the bcl-2 protooncogene in transgenic mice are protected from axotomy-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3309-3313.
- El Andaloussi, A., Sonabend, A.M., Han, Y., and Lesniak, M.S. (2006). Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors. *Glia* 54, 526-535.
- Enari, M., Flechsig, E., and Weissmann, C. (2001). Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9295-9299.
- Endo, T., Groth, D., Prusiner, S.B., and Kobata, A. (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 28, 8380-8388.
- Fairbairn, D.W., Carnahan, K.G., Thwaites, R.N., Grigsby, R.V., Holyoak, G.R., and O'Neill, K.L. (1994). Detection of apoptosis induced DNA cleavage in scrapie-infected sheep brain. *FEMS Microbiol Lett* 115, 341-346.
- Feraudet, C., Morel, N., Simon, S., Volland, H., Frobert, Y., Creminon, C., Vilette, D., Lehmann, S., and Grassi, J. (2005). Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrPSc replication in infected cells. *J Biol Chem* 280, 11247-11258.
- Fernandez-Luna, J.L. (2007). Apoptosis regulators as targets for cancer therapy. *Clin Transl Oncol* 9, 555-562.

- Ferrer, I. (1999). Nuclear DNA fragmentation in Creutzfeldt-Jakob disease: does a mere positive in situ nuclear end-labeling indicate apoptosis? *Acta Neuropathol* 97, 5-12.
- Ferrer, I. (2002). Synaptic pathology and cell death in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. *Cerebellum* 1, 213-222.
- Ferrer, I., Tortosa, A., Blanco, R., Martin, F., Serrano, T., Planas, A., and Macaya, A. (1994). Naturally occurring cell death in the developing cerebral cortex of the rat. Evidence of apoptosis-associated internucleosomal DNA fragmentation. *Neurosci Lett* 182, 77-79.
- Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *Embo J* 15, 1255-1264.
- Fischer, M.B., Goerg, S., Shen, L., Prodeus, A.P., Goodnow, C.C., Kelsoe, G., and Carroll, M.C. (1998). Dependence of germinal center B cells on expression of CD21/CD35 for survival. *Science* 280, 582-585.
- Fiskum, G., Starkov, A., Polster, B.M., and Chinopoulos, C. (2003). Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991, 111-119.
- Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O., and Tagliavini, F. (1993). Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362, 543-546.
- Fradkin, J.E., Schonberger, L.B., Mills, J.L., Gunn, W.J., Piper, J.M., Wysowski, D.K., Thomson, R., Durako, S., and Brown, P. (1991). Creutzfeldt-Jakob disease in pituitary growth hormone recipients in the United States. *Jama* 265, 880-884.
- Francis, M.J., Hastings, G.Z., Syred, A.D., McGinn, B., Brown, F., and Rowlands, D.J. (1987). Non-responsiveness to a foot-and-mouth disease virus peptide overcome by addition of foreign helper T-cell determinants. *Nature* 330, 168-170.
- Freund, J. (1956). The mode of action of immunologic adjuvants. *Bibl Tuberc*, 130-148.
- Frigg, R., Klein, M.A., Hegyi, I., Zinkernagel, R.M., and Aguzzi, A. (1999). Scrapie pathogenesis in subclinically infected B-cell-deficient mice. *J Virol* 73, 9584-9588.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S.A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119, 493-501.
- Gerstmann, J., Strüssler, E., and Scheinker, I. (1936). Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z. Neurol. Psych* 154, 736-762.
- Giese, A., Groschup, M.H., Hess, B., and Kretzschmar, H.A. (1995). Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol* 5, 213-221.
- Giese, A., and Kretzschmar, H.A. (2001). Prion-induced neuronal damage--the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies. *Curr Top Microbiol Immunol* 253, 203-217.
- Gilch, S., Winklhofer, K.F., Groschup, M.H., Nunziante, M., Lucassen, R., Spielhauer, C., Muranyi, W., Riesner, D., Tatzelt, J., and Schatzl, H.M. (2001). Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. *Embo J* 20, 3957-3966.
- Gilch, S., Wopfner, F., Renner-Muller, I., Kremmer, E., Bauer, C., Wolf, E., Brem, G., Groschup, M.H., and Schatzl, H.M. (2003). Polyclonal anti-PrP auto-antibodies induced with dimeric PrP interfere efficiently with PrPSc propagation in prion-infected cells. *J Biol Chem* 278, 18524-18531.
- Good, M.F., Maloy, W.L., Lunde, M.N., Margalit, H., Cornette, J.L., Smith, G.L., Moss, B., Miller, L.H., and Berzofsky, J.A. (1987). Construction of synthetic immunogen: use of new T-helper epitope on malaria circumsporozoite protein. *Science* 235, 1059-1062.

- Gordon-Weeks, P.R. (1993). Organization of microtubules in axonal growth cones: a role for microtubule-associated protein MAP 1B. *J Neurocytol* 22, 717-725.
- Gould, T.W., Buss, R.R., Vinsant, S., Prevette, D., Sun, W., Knudson, C.M., Milligan, C.E., and Oppenheim, R.W. (2006). Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci* 26, 8774-8786.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Grasl-Kraupp, B., Ruttkey-Nedecky, B., Koudelka, H., Bukowska, K., Bursch, W., and Schulte-Hermann, R. (1995). In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 21, 1465-1468.
- Gray, F., Chretien, F., Adle-Biassette, H., Dorandeu, A., Ereau, T., Delisle, M.B., Kopp, N., Ironside, J.W., and Vital, C. (1999). Neuronal apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 321-328.
- Gregoire, S., Bergot, A.S., Feraudet, C., Carnaud, C., Aucouturier, P., and Rosset, M.B. (2005). The murine B cell repertoire is severely selected against endogenous cellular prion protein. *J Immunol* 175, 6443-6449.
- Gupta, R.K., Relyveld, E.H., Lindblad, E.B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S., and Gupta, C.K. (1993). Adjuvants--a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* 11, 293-306.
- Haendeler, J., Messmer, U.K., Brune, B., Neugebauer, E., and Dimmeler, S. (1996). Endotoxic shock leads to apoptosis in vivo and reduces Bcl-2. *Shock* 6, 405-409.
- Hahn, P., Lindsten, T., Lyubarsky, A., Ying, G.S., Pugh, E.N., Jr., Thompson, C.B., and Dunaief, J.L. (2004). Deficiency of Bax and Bak protects photoreceptors from light damage in vivo. *Cell Death Differ* 11, 1192-1197.
- Harrison, P.M., Chan, H.S., Prusiner, S.B., and Cohen, F.E. (2001). Conformational propagation with prion-like characteristics in a simple model of protein folding. *Protein Sci* 10, 819-835.
- Hartsough, G.R., and Burger, D. (1965). Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis* 115, 387-392.
- Hebeis, B.J., Klenovsek, K., Rohwer, P., Ritter, U., Schneider, A., Mach, M., and Winkler, T.H. (2004). Activation of virus-specific memory B cells in the absence of T cell help. *J Exp Med* 199, 593-602.
- Heikenwalder, M., Polymenidou, M., Junt, T., Sigurdson, C., Wagner, H., Akira, S., Zinkernagel, R., and Aguzzi, A. (2004). Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med* 10, 187-192.
- Heitz, S., Lutz, Y., Rodeau, J.L., Zanjani, H., Gautheron, V., Bombarde, G., Richard, F., Fuchs, J.P., Vogel, M.W., Mariani, J., and Bailly, Y. (2007). BAX contributes to Doppel-induced apoptosis of prion-protein-deficient Purkinje cells. *Dev Neurobiol* 67, 670-686.
- Hemmer, B., Vergelli, M., Pinilla, C., Houghten, R., and Martin, R. (1998). Probing degeneracy in T-cell recognition using peptide combinatorial libraries. *Immunol Today* 19, 163-168.
- Heppner, F.L., Musahl, C., Arrighi, I., Klein, M.A., Rulicke, T., Oesch, B., Zinkernagel, R.M., Kalinke, U., and Aguzzi, A. (2001). Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science* 294, 178-182.
- Herms, J.W., Korte, S., Gall, S., Schneider, I., Dunker, S., and Kretschmar, H.A. (2000). Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. *J Neurochem* 75, 1487-1492.
- Hertz, M., Mahalingam, S., Dalum, I., Klysner, S., Mattes, J., Neisig, A., Mouritsen, S., Foster, P.S., and Gautam, A. (2001). Active vaccination against IL-5 bypasses immunological tolerance and ameliorates experimental asthma. *J Immunol* 167, 3792-3799.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Hetz, C., Maundrell, K., and Soto, C. (2003a). Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? *Trends in molecular medicine* 9, 237-243.
- Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Maundrell, K., Castilla, J., and Soto, C. (2003b). Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *Embo J* 22, 5435-5445.
- Hilchey, S.P., and Bernstein, S.H. (2007). Use of CFSE to monitor ex vivo regulatory T-cell suppression of CD4+ and CD8+ T-cell proliferation within unseparated mononuclear cells from malignant and non-malignant human lymph node biopsies. *Immunol Invest* 36, 629-648.
- Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., and Korsmeyer, S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 334-336.
- Hope, J., and Manson, J. (1991). The scrapie fibril protein and its cellular isoform. *Curr Top Microbiol Immunol* 172, 57-74.
- Hornshaw, M.P., McDermott, J.R., and Candy, J.M. (1995). Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 207, 621-629.
- Hsiao, K.K., Scott, M., Foster, D., Groth, D.F., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (1990). Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science* 250, 1587-1590.
- Hu, J.G., and Kitagawa, T. (1990). Studies on the optimal immunization schedule of experimental animals. VI. Antigen dose-response of aluminum hydroxide-aided immunization and booster effect under low antigen dose. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 38, 2775-2779.
- Isenmann, S., Brandner, S., and Aguzzi, A. (1996). Neuroectodermal grafting: a new tool for the study of neurodegenerative diseases. *Histol Histopathol* 11, 1063-1073.
- Janeway, C.A., Jr. (2001). How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 3, 1167-1171.
- Jankovic, D., Liu, Z., and Gause, W.C. (2001). Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol* 22, 450-457.
- Jeffrey, M., Goodsir, C.M., Bruce, M.E., McBride, P.A., Scott, J.R., and Halliday, W.G. (1992). Infection specific prion protein (PrP) accumulates on neuronal plasmalemma in scrapie infected mice. *Neurosci Lett* 147, 106-109.
- Jenkins, M.K., and Schwartz, R.H. (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* 165, 302-319.
- Jesionek-Kupnicka, D., Buczynski, J., Kordek, R., and Liberski, P.P. (1999). Neuronal loss and apoptosis in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *Folia Neuropathol* 37, 283-286.
- Kabelitz, D., Wesch, D., and Oberg, H.H. (2006). Regulation of regulatory T cells: role of dendritic cells and toll-like receptors. *Crit Rev Immunol* 26, 291-306.
- Kang, S.J., Sanchez, I., Jing, N., and Yuan, J. (2003). Dissociation between neurodegeneration and caspase-11-mediated activation of caspase-1 and caspase-3 in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 23, 5455-5460.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kim, C.L., Karino, A., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Sato, M., and Horiuchi, M. (2004). Cell-surface retention of PrPC by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation. *J Gen Virol* 85, 3473-3482.
- Kingsbury, D.T., Smeltzer, D.A., Gibbs, C.J., Jr., and Gajdusek, D.C. (1981). Evidence for normal cell-mediated immunity in scrapie-infected mice. *Infect Immun* 32, 1176-1180.

- Kisielow, P., Bluthmann, H., Staerz, U.D., Steinmetz, M., and von Boehmer, H. (1988). Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 333, 742-746.
- Klein, M.A., Frigg, R., Flechsig, E., Raeber, A.J., Kalinke, U., Bluethmann, H., Bootz, F., Suter, M., Zinkernagel, R.M., and Aguzzi, A. (1997). A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 390, 687-690.
- Klein, M.A., Frigg, R., Raeber, A.J., Flechsig, E., Hegyi, I., Zinkernagel, R.M., Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1998). PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat Med* 4, 1429-1433.
- Klein, M.A., Kaeser, P.S., Schwarz, P., Weyd, H., Xenarios, I., Zinkernagel, R.M., Carroll, M.C., Verbeek, J.S., Botto, M., Walport, M.J., *et al.* (2001). Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat Med* 7, 488-492.
- Klinman, D.M. (2004). Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* 4, 249-258.
- Klinman, D.M., Yi, A.K., Beaucage, S.L., Conover, J., and Krieg, A.M. (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, 2879-2883.
- Knudson, C.M., Tung, K.S., Tourtellotte, W.G., Brown, G.A., and Korsmeyer, S.J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270, 96-99.
- Korsmeyer, S.J. (1992). Bcl-2: an antidote to programmed cell death. *Cancer Surv* 15, 105-118.
- Kostic, V., Jackson-Lewis, V., de Bilbao, F., Dubois-Dauphin, M., and Przedborski, S. (1997). Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 277, 559-562.
- Kraft, A.R., Arndt, T., Hasenkrug, K.J., and Dittmer, U. (2005). Effective treatment of retrovirus-induced suppression of antibody responses with CpG oligodeoxynucleotides. *J Gen Virol* 86, 3365-3368.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., and Reed, J.C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53, 4701-4714.
- Kretschmar, H.A. (1999). Molecular pathogenesis of prion diseases. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249 Suppl 3, 56-63.
- Kretschmar, H.A., Giese, A., Brown, D.R., Herms, J., Keller, B., Schmidt, B., and Groschup, M. (1997). Cell death in prion disease. *J Neural Transm Suppl* 50, 191-210.
- Kretschmar, H.A., Prusiner, S.B., Stowring, L.E., and DeArmond, S.J. (1986). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* 122, 1-5.
- Krieg, A.M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20, 709-760.
- Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A., and Klinman, D.M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-549.
- Kroemer, G., and Reed, J.C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-519.
- Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z.K., Endres, S., Krieg, A.M., and Hartmann, G. (2001a). Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α / β in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31, 2154-2163.
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A.M., and Hartmann, G. (2001b). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 31, 3026-3037.
- Kurschner, C., and Morgan, J.I. (1995). The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res Mol Brain Res* 30, 165-168.

- Kurschner, C., and Morgan, J.I. (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, 249-258.
- Kuwahara, C., Takeuchi, A.M., Nishimura, T., Haraguchi, K., Kubosaki, A., Matsumoto, Y., Saeki, K., Matsumoto, Y., Yokoyama, T., Itoharu, S., and Onodera, T. (1999). Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400, 225-226.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lang, C.J., Heckmann, J.G., and Neundorfer, B. (1998). Creutzfeldt-Jakob disease via dural and corneal transplants. *Journal of the neurological sciences* 160, 128-139.
- Lansbury, P.T. (1994). Mechanism of scrapie replication. *Science* 265, 1510.
- Lasmezas, C.I., Deslys, J.P., Robain, O., Jaegly, A., Beringue, V., Peyrin, J.M., Fournier, J.G., Hauw, J.J., Rossier, J., and Dormont, D. (1997). Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* 275, 402-405.
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., and Tough, D.F. (2001). Type I interferons potentially enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14, 461-470.
- Leclerc, C., Przewlocki, G., Schutze, M.P., and Chedid, L. (1987). A synthetic vaccine constructed by copolymerization of B and T cell determinants. *Eur J Immunol* 17, 269-273.
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14, 233-258.
- Leuner, K., Pantel, J., Frey, C., Schindowski, K., Schulz, K., Wegat, T., Maurer, K., Eckert, A., and Muller, W.E. (2007). Enhanced apoptosis, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in lymphocytes as potential biomarkers for Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*, 207-215.
- Li, A., Barmada, S.J., Roth, K.A., and Harris, D.A. (2007). N-terminally deleted forms of the prion protein activate both Bax-dependent and Bax-independent neurotoxic pathways. *J Neurosci* 27, 852-859.
- Liberski, P.P., Sikorska, B., Bratosiewicz-Wasik, J., Gajdusek, D.C., and Brown, P. (2004). Neuronal cell death in transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases) revisited: from apoptosis to autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2473-2490.
- Lucassen, P.J., Williams, A., Chung, W.C., and Fraser, H. (1995). Detection of apoptosis in murine scrapie. *Neurosci Lett* 198, 185-188.
- Lugaresi, E., Montagna, P., Baruzzi, A., Cortelli, P., Tinuper, P., Zucconi, M., Gambetti, P.L., and Medori, R. (1986). [Familial insomnia with a malignant course: a new thalamic disease]. *Rev Neurol (Paris)* 142, 791-792.
- Mabbott, N.A., Brown, K.L., Manson, J., and Bruce, M.E. (1997). T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein. *Immunology* 92, 161-165.
- Mabbott, N.A., Mackay, F., Minns, F., and Bruce, M.E. (2000). Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat Med* 6, 719-720.
- MacFarlane, M., and Williams, A.C. (2004). Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep* 5, 674-678.
- Maignien, T., Lasmezas, C.I., Beringue, V., Dormont, D., and Deslys, J.P. (1999). Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Gen Virol* 80 (Pt 11), 3035-3042.
- Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klohn, P.C., Brandner, S., and Collinge, J. (2003). Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 302, 871-874.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Martin-Orozco, E., Kobayashi, H., Van Uden, J., Nguyen, M.D., Kornbluth, R.S., and Raz, E. (1999). Enhancement of antigen-presenting cell surface molecules involved in cognate interactions by immunostimulatory DNA sequences. *Int Immunol* *11*, 1111-1118.
- Martinou, J.C., Dubois-Dauphin, M., Staple, J.K., Rodriguez, I., Frankowski, H., Missotten, M., Albertini, P., Talabot, D., Catsicas, S., Pietra, C., and et al. (1994). Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* *13*, 1017-1030.
- Masters, C.L., and Richardson, E.P., Jr. (1978). Subacute spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). The nature and progression of spongiform change. *Brain* *101*, 333-344.
- Matesic, D.F., and Lin, R.C. (1994). Microtubule-associated protein 2 as an early indicator of ischemia-induced neurodegeneration in the gerbil forebrain. *J Neurochem* *63*, 1012-1020.
- Matus, A. (1991). Microtubule-associated proteins and neuronal morphogenesis. *J Cell Sci Suppl* *15*, 61-67.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* *12*, 991-1045.
- McBride, P.A., Schulz-Schaeffer, W.J., Donaldson, M., Bruce, M., Diringer, H., Kretzschmar, H.A., and Beekes, M. (2001). Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol* *75*, 9320-9327.
- McDonnell, T.J., Beham, A., Sarkiss, M., Andersen, M.M., and Lo, P. (1996). Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation. *Experientia* *52*, 1008-1017.
- McKinley, M.P., Bolton, D.C., and Prusiner, S.B. (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* *35*, 57-62.
- Medori, R., Montagna, P., Tritschler, H.J., LeBlanc, A., Cortelli, P., Tinuper, P., Lugaresi, E., and Gambetti, P. (1992). Fatal familial insomnia: a second kindred with mutation of prion protein gene at codon 178. *Neurology* *42*, 669-670.
- Miconnet, I., Koenig, S., Speiser, D., Krieg, A., Guillaume, P., Cerottini, J.C., and Romero, P. (2002). CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide. *J Immunol* *168*, 1212-1218.
- Miyamoto, K., Nakamura, N., Aosasa, M., Nishida, N., Yokoyama, T., Horiuchi, H., Furusawa, S., and Matsuda, H. (2005). Inhibition of prion propagation in scrapie-infected mouse neuroblastoma cell lines using mouse monoclonal antibodies against prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* *335*, 197-204.
- Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* *80*, 293-299.
- Monaghan, P., Robertson, D., Amos, T.A., Dyer, M.J., Mason, D.Y., and Greaves, M.F. (1992). Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem* *40*, 1819-1825.
- Montrasio, F., Cozzio, A., Flechsig, E., Rossi, D., Klein, M.A., Rulicke, T., Raeber, A.J., Voshenrich, C.A., Proft, J., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (2001). B lymphocyte-restricted expression of prion protein does not enable prion replication in prion protein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 4034-4037.
- Montrasio, F., Frigg, R., Glatzel, M., Klein, M.A., Mackay, F., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (2000). Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* *288*, 1257-1259.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., and Yasuhiko, Y. (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* *277*, 34287-34294.
- Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* *7*, 145-173.

- Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J.L., Lehmann, S., Launay, J.M., and Kellermann, O. (2000). Signal transduction through prion protein. *Science* 289, 1925-1928.
- Mullen, R.J., Buck, C.R., and Smith, A.M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development (Cambridge, England)* 116, 201-211.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Shinkai, Y., Louie, M.C., Fields, L.E., Lucas, P.J., Stewart, V., Alt, F.W., and et al. (1993). Disappearance of the lymphoid system in Bcl-2 homozygous mutant chimeric mice. *Science* 261, 1584-1588.
- Nguyen, J., Baldwin, M.A., Cohen, F.E., and Prusiner, S.B. (1995). Prion protein peptides induce alpha-helix to beta-sheet conformational transitions. *Biochemistry* 34, 4186-4192.
- Nicolas, O., Gavin, R., Braun, N., Urena, J.M., Fontana, X., Soriano, E., Aguzzi, A., and del Rio, J.A. (2007). Bcl-2 overexpression delays caspase-3 activation and rescues cerebellar degeneration in prion-deficient mice that overexpress amino-terminally truncated prion. *Faseb J* 21, 3107-3117.
- Nitschke, C., Flechsig, E., van den Brandt, J., Lindner, N., Luhrs, T., Dittmer, U., and Klein, M.A. (2007). Immunisation strategies against prion diseases: prime-boost immunisation with a PrP DNA vaccine containing foreign helper T-cell epitopes does not prevent mouse scrapie. *Vet Microbiol* 123, 367-376.
- Oesch, B., Teplow, D.B., Stahl, N., Serban, D., Hood, L.E., and Prusiner, S.B. (1990). Identification of cellular proteins binding to the scrapie prion protein. *Biochemistry* 29, 5848-5855.
- Ohashi, P.S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C.T., Odermatt, B., Malissen, B., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1991). Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65, 305-317.
- Olmsted, J.B., Carlson, K., Klebe, R., Ruddle, F., and Rosenbaum, J. (1970). Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65, 129-136.
- Oltvai, Z.N., and Korsmeyer, S.J. (1994). Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* 79, 189-192.
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.
- Palpers, M. (2005). The epidemiology of kuru in the period 1987 to 1995. *Commun Dis Intell* 29, 391-399.
- Panina-Bordignon, P., Tan, A., Termijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G., and Lanzavecchia, A. (1989). Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur J Immunol* 19, 2237-2242.
- Panus, J.F., McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2000). Antigen-specific T helper cell function: differential cytokine expression in primary and memory responses. *J Exp Med* 192, 1301-1316.
- Park, S.K., Choi, S.I., Jin, J.K., Choi, E.K., Kim, J.I., Carp, R.I., and Kim, Y.S. (2000). Differential expression of Bax and Bcl-2 in the brains of hamsters infected with 263K scrapie agent. *Neuroreport* 11, 1677-1682.
- Parnes, J.R. (1989). Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv Immunol* 44, 265-311.
- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299, 1033-1036.
- Pauly, P.C., and Harris, D.A. (1998). Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* 273, 33107-33110.
- Pearson, G.R., Gruffydd-Jones, T.J., Wyatt, J.M., Hope, J., Chong, A., Scott, A.C., Dawson, M., and Wells, G.A. (1991). Feline spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 128, 532.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Peretz, D., Williamson, R.A., Kaneko, K., Vergara, J., Leclerc, E., Schmitt-Ulms, G., Mehlhorn, I.R., Legname, G., Wormald, M.R., Rudd, P.M., *et al.* (2001). Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* *412*, 739-743.
- Perrier, V., Solassol, J., Crozet, C., Frobert, Y., Mourton-Gilles, C., Grassi, J., and Lehmann, S. (2004). Anti-PrP antibodies block PrPSc replication in prion-infected cell cultures by accelerating PrPC degradation. *J Neurochem* *89*, 454-463.
- Peter, M.E., and Krammer, P.H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* *10*, 26-35.
- Pietri, M., Caprini, A., Mouillet-Richard, S., Pradines, E., Ermonval, M., Grassi, J., Kellermann, O., and Schneider, B. (2006). Overstimulation of PrPC signaling pathways by prion peptide 106-126 causes oxidative injury of bioaminergic neuronal cells. *J Biol Chem* *281*, 28470-28479.
- Pleyer, U., and Ritter, T. (2003). Gene therapy in immune-mediated diseases of the eye. *Prog Retin Eye Res* *22*, 277-293.
- Porter, D.D., Porter, H.G., and Cox, N.A. (1973). Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. *J Immunol* *111*, 1407-1410.
- Prinz, M., Heikenwalder, M., Junt, T., Schwarz, P., Glatzel, M., Heppner, F.L., Fu, Y.X., Lipp, M., and Aguzzi, A. (2003a). Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature* *425*, 957-962.
- Prinz, M., Heikenwalder, M., Schwarz, P., Takeda, K., Akira, S., and Aguzzi, A. (2003b). Prion pathogenesis in the absence of Toll-like receptor signalling. *EMBO Rep* *4*, 195-199.
- Priola, S.A., Chabry, J., and Chan, K. (2001). Efficient conversion of normal prion protein (PrP) by abnormal hamster PrP is determined by homology at amino acid residue 155. *J Virol* *75*, 4673-4680.
- Priola, S.A., Raines, A., and Caughey, W.S. (2000). Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science* *287*, 1503-1506.
- Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* *216*, 136-144.
- Prusiner, S.B. (1997). Prion diseases and the BSE crisis. *Science* *278*, 245-251.
- Puchtler, H., and Sweat, F. (1962). Amidoblack as a stain for hemoglobin. *Arch Pathol* *73*, 245-249.
- Putcha, G.V., Deshmukh, M., and Johnson, E.M., Jr. (1999). BAX translocation is a critical event in neuronal apoptosis: regulation by neuroprotectants, BCL-2, and caspases. *J Neurosci* *19*, 7476-7485.
- Race, R., and Chesebro, B. (1998). Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature* *392*, 770.
- Race, R., Oldstone, M., and Chesebro, B. (2000). Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *J Virol* *74*, 828-833.
- Race, R.E., Priola, S.A., Bessen, R.A., Ernst, D., Dockter, J., Rall, G.F., Mucke, L., Chesebro, B., and Oldstone, M.B. (1995). Neuron-specific expression of a hamster prion protein minigene in transgenic mice induces susceptibility to hamster scrapie agent. *Neuron* *15*, 1183-1191.
- Raeber, A.J., Race, R.E., Brandner, S., Priola, S.A., Sailer, A., Bessen, R.A., Mucke, L., Manson, J., Aguzzi, A., Oldstone, M.B., *et al.* (1997). Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie. *Embo J* *16*, 6057-6065.
- Raff, M.C., Fields, K.L., Hakomori, S.I., Mirsky, R., Pruss, R.M., and Winter, J. (1979). Cell-type-specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture. *Brain Res* *174*, 283-308.

- Raz, E., Tighe, H., Sato, Y., Corr, M., Dudler, J.A., Roman, M., Swain, S.L., Spiegelberg, H.L., and Carson, D.A. (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, 5141-5145.
- Reed, J.C. (1995). Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol* 7, 541-546.
- Reed, J.C. (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387, 773-776.
- Richt, J.A., Kasinathan, P., Hamir, A.N., Castilla, J., Sathiyaseelan, T., Vargas, F., Sathiyaseelan, J., Wu, H., Matsushita, H., Koster, J., *et al.* (2007). Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol* 25, 132-138.
- Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmezas, C.I., and Weiss, S. (1997). The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med* 3, 1383-1388.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., and Wuthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* 382, 180-182.
- Robakis, N.K., Sawh, P.R., Wolfe, G.C., Rubenstein, R., Carp, R.I., and Innis, M.A. (1986). Isolation of a cDNA clone encoding the leader peptide of prion protein and expression of the homologous gene in various tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6377-6381.
- Rosset, M.B., Ballerini, C., Gregoire, S., Metharom, P., Carnaud, C., and Aucouturier, P. (2004). Breaking immune tolerance to the prion protein using prion protein peptides plus oligodeoxynucleotide-CpG in mice. *J Immunol* 172, 5168-5174.
- Roucou, X., Giannopoulos, P.N., Zhang, Y., Jodoin, J., Goodyer, C.G., and LeBlanc, A. (2005). Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death Differ* 12, 783-795.
- Roucou, X., Guo, Q., Zhang, Y., Goodyer, C.G., and LeBlanc, A.C. (2003). Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *J Biol Chem* 278, 40877-40881.
- Rubenstein, R., Kasczak, R.J., Merz, P.A., Papini, M.C., Carp, R.I., Robakis, N.K., and Wisniewski, H.M. (1986). Detection of scrapie-associated fibril (SAF) proteins using anti-SAF antibody in non-purified tissue preparations. *J Gen Virol* 67 (Pt 4), 671-681.
- Sacher, T., Knolle, P., Nichterlein, T., Arnold, B., Hammerling, G.J., and Limmer, A. (2002). CpG-ODN-induced inflammation is sufficient to cause T-cell-mediated autoaggression against hepatocytes. *Eur J Immunol* 32, 3628-3637.
- Sagot, Y., Dubois-Dauphin, M., Tan, S.A., de Bilbao, F., Aebischer, P., Martinou, J.C., and Kato, A.C. (1995). Bcl-2 overexpression prevents motoneuron cell body loss but not axonal degeneration in a mouse model of a neurodegenerative disease. *J Neurosci* 15, 7727-7733.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sakudo, A., Lee, D.C., Li, S., Nakamura, T., Matsumoto, Y., Saeki, K., Itohara, S., Ikuta, K., and Onodera, T. (2005). PrP cooperates with STII to regulate SOD activity in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 14-19.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Sastry, P.S., and Rao, K.S. (2000). Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 74, 1-20.
- Schneider, B., Mutel, V., Pietri, M., Ermonval, M., Mouillet-Richard, S., and Kellermann, O. (2003). NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13326-13331.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Schwartz, J.C., Zhang, X., Fedorov, A.A., Nathenson, S.G., and Almo, S.C. (2001). Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature* 410, 604-608.
- Schwarz, A., Kratke, O., Burwinkel, M., Riemer, C., Schultz, J., Henklein, P., Bamme, T., and Baier, M. (2003). Immunisation with a synthetic prion protein-derived peptide prolongs survival times of mice orally exposed to the scrapie agent. *Neurosci Lett* 350, 187-189.
- Scott, M., Foster, D., Miranda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S.J., and et al. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59, 847-857.
- Scott, M., Groth, D., Foster, D., Torchia, M., Yang, S.L., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (1993). Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell* 73, 979-988.
- Seder, R.A., and Paul, W.E. (1994). Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 12, 635-673.
- Selimi, F., Campana, A., Weitzman, J., Vogel, M.W., and Mariani, J. (2000). Bax and p53 are differentially involved in the regulation of caspase-3 expression and activation during neurodegeneration in Lurcher mice. *C R Acad Sci III* 323, 967-973.
- Sethi, S., Lipford, G., Wagner, H., and Kretzschmar, H. (2002). Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. *Lancet* 360, 229-230.
- Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blattler, T., Brandner, S., Gotz, J., Rulicke, T., Flechsig, E., Cozzio, A., von Mering, C., et al. (1998). Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* 93, 203-214.
- Sigurdson, C.J., Spraker, T.R., Miller, M.W., Oesch, B., and Hoover, E.A. (2001). PrP(CWD) in the myenteric plexus, vagosympathetic trunk and endocrine glands of deer with chronic wasting disease. *J Gen Virol* 82, 2327-2334.
- Sigurdsson, E.M., Brown, D.R., Daniels, M., Kascsak, R.J., Kascsak, R., Carp, R., Meeker, H.C., Frangione, B., and Wisniewski, T. (2002). Immunization delays the onset of prion disease in mice. *Am J Pathol* 161, 13-17.
- Sigurdsson, E.M., Sy, M.S., Li, R., Scholtzova, H., Kascsak, R.J., Kascsak, R., Carp, R., Meeker, H.C., Frangione, B., and Wisniewski, T. (2003). Anti-prion antibodies for prophylaxis following prion exposure in mice. *Neurosci Lett* 336, 185-187.
- Sikorska, B. (2004). Mechanisms of neuronal death in transmissible spongiform encephalopathies. *Folia Neuropathol* 42 Suppl B, 89-95.
- Sinigaglia, F., Matile, H., and Pink, J.R. (1987). Plasmodium falciparum-specific human T cell clones: evidence for helper and cytotoxic activities. *Eur J Immunol* 17, 187-192.
- Siskind, G.W., Dunn, P., and Walker, J.G. (1968). Studies on the control of antibody synthesis. II. Effect of antigen dose and of suppression by passive antibody on the affinity of antibody synthesized. *J Exp Med* 127, 55-66.
- Smale, G., Nichols, N.R., Brady, D.R., Finch, C.E., and Horton, W.E., Jr. (1995). Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 133, 225-230.
- Souan, L., Margalit, R., Brenner, O., Cohen, I.R., and Mor, F. (2001a). Self prion protein peptides are immunogenic in Lewis rats. *J Autoimmun* 17, 303-310.
- Souan, L., Tal, Y., Felling, Y., Cohen, I.R., Taraboulos, A., and Mor, F. (2001b). Modulation of proteinase-K resistant prion protein by prion peptide immunization. *Eur J Immunol* 31, 2338-2346.
- Spinner, D.S., Kascsak, R.B., Lafauci, G., Meeker, H.C., Ye, X., Flory, M.J., Kim, J.I., Schuller-Levis, G.B., Levis, W.R., Wisniewski, T., et al. (2007). CpG oligodeoxynucleotide-enhanced humoral immune response and

- production of antibodies to prion protein PrP^{Sc} in mice immunized with 139A scrapie-associated fibrils. *J Leukoc Biol* 81, 1374-1385.
- Sprent, J., Lo, D., Gao, E.K., and Ron, Y. (1988). T cell selection in the thymus. *Immunol Rev* 101, 173-190.
- Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., and Prusiner, S.B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51, 229-240.
- Steele, A.D., King, O.D., Jackson, W.S., Hetz, C.A., Borkowski, A.W., Thielen, P., Wollmann, R., and Lindquist, S. (2007). Diminishing apoptosis by deletion of Bax or overexpression of Bcl-2 does not protect against infectious prion toxicity in vivo. *J Neurosci* 27, 13022-13027.
- Steinaa, L., Rasmussen, P.B., Gautam, A., and Mouritsen, S. (2008). Breaking B-cell tolerance and CTL tolerance in three OVA-transgenic mouse strains expressing different levels of OVA. *Scand J Immunol* 67, 113-120.
- Steinaa, L., Rasmussen, P.B., Wegener, A.M., Sonderbye, L., Leach, D.R., Rygaard, J., Mouritsen, S., and Gautam, A.M. (2005). Linked foreign T-cell help activates self-reactive CTL and inhibits tumor growth. *J Immunol* 175, 329-334.
- Stern, B.V., Boehm, B.O., and Tary-Lehmann, M. (2002). Vaccination with tumor peptide in CpG adjuvant protects via IFN-gamma-dependent CD4 cell immunity. *J Immunol* 168, 6099-6105.
- Stockel, J., Safar, J., Wallace, A.C., Cohen, F.E., and Prusiner, S.B. (1998). Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry* 37, 7185-7193.
- Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69, 217-245.
- Supattapone, S., Wille, H., Uyechi, L., Safar, J., Tremblay, P., Szoka, F.C., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., and Scott, M.R. (2001). Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. *J Virol* 75, 3453-3461.
- Tagliavini, F., McArthur, R.A., Canciani, B., Giaccone, G., Porro, M., Bugiani, M., Lievens, P.M., Bugiani, O., Peri, E., Dall'Ara, P., *et al.* (1997). Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters. *Science* 276, 1119-1122.
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., and Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10, 1969-1980.
- Taraboulos, A., Jendroska, K., Serban, D., Yang, S.L., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (1992). Regional mapping of prion proteins in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7620-7624.
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L., and Prusiner, S.B. (1995). Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol* 129, 121-132.
- Taylor, D.R., and Hooper, N.M. (2006). The prion protein and lipid rafts. *Mol Membr Biol* 23, 89-99.
- Theil, D., Fatzer, R., Meyer, R., Schobesberger, M., Zurbriggen, A., and Vandevelde, M. (1999). Nuclear DNA fragmentation and immune reactivity in bovine spongiform encephalopathy. *J Comp Pathol* 121, 357-367.
- Thellung, S., Villa, V., Corsaro, A., Arena, S., Millo, E., Damonte, G., Benatti, U., Tagliavini, F., Florio, T., and Schettini, G. (2002). p38 MAP kinase mediates the cell death induced by PrP106-126 in the SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurobiol Dis* 9, 69-81.
- Thomas, L., Hartung, K., Langosch, D., Rehm, H., Bamberg, E., Franke, W.W., and Betz, H. (1988). Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science* 242, 1050-1053.
- Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188, 287-296.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A., and Manson, J.C. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* *380*, 639-642.
- Tsai, M.S., Chiu, Y.T., Wang, S.H., Hsieh-Li, H.M., Lian, W.C., and Li, H. (2006). Abolishing Bax-dependent apoptosis shows beneficial effects on spinal muscular atrophy model mice. *Mol Ther* *13*, 1149-1155.
- Tsui-Pierchala, B.A., Encinas, M., Milbrandt, J., and Johnson, E.M., Jr. (2002). Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci* *25*, 412-417.
- Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2000). Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* *466*, 6-10.
- Van den Broeck, W., Derore, A., and Simoens, P. (2006). Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrI mice. *J Immunol Methods* *312*, 12-19.
- Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* *75*, 229-240.
- Vollmer, J., Janosch, A., Laucht, M., Ballas, Z.K., Schetter, C., and Krieg, A.M. (2002). Highly immunostimulatory CpG-free oligodeoxynucleotides for activation of human leukocytes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* *12*, 165-175.
- Vollmer, J., Weeratna, R.D., Jurk, M., Samulowitz, U., McCluskie, M.J., Payette, P., Davis, H.L., Schetter, C., and Krieg, A.M. (2004). Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. *Immunology* *113*, 212-223.
- Warren, H.S., Vogel, F.R., and Chedid, L.A. (1986). Current status of immunological adjuvants. *Annu Rev Immunol* *4*, 369-388.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* *292*, 727-730.
- Weissmann, C., Fischer, M., Raeber, A., Bueler, H., Sailer, A., Shmerling, D., Rulicke, T., Brandner, S., and Aguzzi, A. (1998). The use of transgenic mice in the investigation of transmissible spongiform encephalopathies. *Rev Sci Tech* *17*, 278-290.
- Wells, G.A., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Jeffrey, M., Dawson, M., and Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* *121*, 419-420.
- Westergard, L., Christensen, H.M., and Harris, D.A. (2007). The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* *1772*, 629-644.
- White, A.R., Enever, P., Tayebi, M., Mushens, R., Linehan, J., Brandner, S., Anstee, D., Collinge, J., and Hawke, S. (2003). Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature* *422*, 80-83.
- Wiedenmann, B., Franke, W.W., Kuhn, C., Moll, R., and Gould, V.E. (1986). Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A* *83*, 3500-3504.
- Wiegand, C., Frenzel, C., Herkel, J., Kallen, K.J., Schmitt, E., and Lohse, A.W. (2005). Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hepatology* *42*, 193-199.
- Wildbaum, G., Netzer, N., and Karin, N. (2002). Plasmid DNA encoding IFN-gamma-inducible protein 10 redirects antigen-specific T cell polarization and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* *168*, 5885-5892.
- Williams, A., Lucassen, P.J., Ritchie, D., and Bruce, M. (1997). PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Exp Neurol* *144*, 433-438.

- Williams, E.S., and Young, S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis* 16, 89-98.
- Wong, B.S., Pan, T., Liu, T., Li, R., Gambetti, P., and Sy, M.S. (2000). Differential contribution of superoxide dismutase activity by prion protein in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 136-139.
- Wu, X., and Peng, S.L. (2006). Toll-like receptor 9 signaling protects against murine lupus. *Arthritis Rheum* 54, 336-342.
- Xiao, X.L., Jiang, H.Y., Zhang, J., Han, J., Nie, K., Zhou, X.B., Huang, Y.X., Chen, L., Zhou, W., Zhang, B.Y., *et al.* (2005). Preparation of monoclonal antibodies against prion proteins with full-length hamster PrP. *Biomed Environ Sci* 18, 273-280.
- Yehiely, F., Bamborough, P., Da Costa, M., Perry, B.J., Thinakaran, G., Cohen, F.E., Carlson, G.A., and Prusiner, S.B. (1997). Identification of candidate proteins binding to prion protein. *Neurobiol Dis* 3, 339-355.
- Zahn, R., von Schroetter, C., and Wuthrich, K. (1997). Human prion proteins expressed in *Escherichia coli* and purified by high-affinity column refolding. *FEBS Lett* 417, 400-404.
- Zanata, S.M., Lopes, M.H., Mercadante, A.F., Hajj, G.N., Chiarini, L.B., Nomizo, R., Freitas, A.R., Cabral, A.L., Lee, K.S., Juliano, M.A., *et al.* (2002). Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *Embo J* 21, 3307-3316.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Über die gebräuchlichen SI- und IUPAC-Einheiten hinausgehend wurden die folgenden Abkürzungen verwendet

A	Alanin
A β	Amyloid- β
ACP	Adenylatzyklase
A.dest.	destilliertes Wasser
AD	Alzheimer-Krankheit
Ak	Antikörper
amp	Ampicillin
Apaf-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APP	Amyloid-Precursor-Protein
AS	Aminosäure
BAX ^{-/-}	BAX-defiziente Mäuse (Knockouts)
BCL-2 ^{-/-}	B-cell Lymphoma-defiziente Mäuse (Knockouts)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Cav-1	Caveolin-1
CD	Lymphozyten-Differenzierungsmarker
CDR	Complementary determining region
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
CpG	Cytosin-Guanosin-Dinukleotide
CSFE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester
CTL	zytotoxische T-Zelle
Cu	Kupfer
CWD	Chronic wasting disease (chronisch zehrende Krankheit)
D	Asparaginsäure
DC	dendritische Zellen
DED	death effector domain
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleotid-triphosphat
DISC	death inducing signalling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	days post inoculation (Tage nach Inokulation)
E	Glutaminsäure
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay

ERK	extrazellulär regulierte Kinase
Fab	Fragment antigen binding
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FADD	Fas Associated protein with Death Domain
F _C	Fragment crystallisable
fCJD	familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
FCS	Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum)
FDC	follikulär dendritische Zellen
FFI	fatal familiäre Insomnie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSE	feline spongiforme Enzephalopathie
GFAP	saures Gliafaserprotein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Gruppe
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom
H	Histidin
HE	Hämatoxylin-Eosin
H-Kette	heavy (schwere) Kette
HaPrP	Hamster-PrP
HAT-Medium	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium
HRP	Horseradish peroxidase
i.c.	intrazerebral
i.d.R.	in der Regel
i.p.	intraperitoneal
iCJD	iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
IFA	inkomplettes Freundsches Adjuvants
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
<i>in vitro</i>	in Zellkultur/Reagenzglas
K	Lysin
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth (Medium)
LD ₅₀	letale Dosis
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
N	Asparagin
NH ₄ SCN	Ammoniumthiocyanat
NK	natürliche Killerzelle
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
NSE	Neuronenspezifische Enolase
<i>NSEHa-Prnp^{0/0}</i>	Hamster-PrP transgene Mäuse (PrP-Knockout Hintergrund)
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodinukleotid(e)
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung) ⁷
PCD	programmierter Zelltod
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin

PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
PK	Proteinase K
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>PRNP</i>	Genlocus des humanen Prion-Proteins
<i>Prnp</i> ^{o/o}	PrP-defiziente Mäuse (Knockout)
PrP ^C	zelluläres Prion-Protein
PrP ^{Sc}	pathologische Form des Prion-Proteins
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
Q	Glutamin
R	Arginin
rek. PrP	rekombinantes Maus-PrP
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RML	Rocky-Mountain-Laboratory
ROS	reaktive Sauerstoffprodukte
rpm	Runden pro Minute
RSS	Recombination Signal Sequence
s.c.	subcutan
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SAF	Scrapie-assoziierte Fibrillen
SSC	Seitwärtsstreulicht
sCJD	sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
SDS	Natriumdodecylsulfat
ST-1	stress-inducible protein 1
STE	Stop Transfer Effektor Seite
T	Threonin
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TBST	tris buffered saline tween 20
TCR	T-Zell Rezeptor
<i>Tg(SHaPrP)</i> ³⁹²²	Hamster-PrP transgene Mäuse
TGF	Tumorwachstumsfaktor
T _H	T-Helferzelle
TM	transmembrane Region
TME	Transmissible Mink Encephalopathy (übertragbare Nerz Enzephalopathie)
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathien
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
V	Volt
vCJD	variante Form der Creutzfeldt-Jakob-Disease
Wdh.	Wiederholung
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
Zn	Zink
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungs-und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1. Neuropathologische Eigenschaften von Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien... 1

Abbildung 2. Sequenz des Prion-Proteins und Strukturmodell des zellulären PrP..... 7

Abbildung 3. Zwei Modelle der Prion-Konversion und Replikation 9

Abbildung 4. Extrinsischer und Intrinsischer Signalweg für die Aktivierung von Caspasen..... 13

Abbildung 5. Signaltransduktion über das Prion-Protein..... 16

Abbildung 6. Mögliche Mechanismen der Inhibierung von BAX-induzierter Apoptose durch PrP^C 19

Abbildung 7. Die „Neurografting“ Technik..... 20

Abbildung 8. Induktion der Immunantwort..... 24

Abbildung 9. Struktur des wildtypischen PrP-Gens (*Prnp*) und des PrP-Knockout-Gens (*Prnp*^{0/0}).. 35

Abbildung 10. Schematische Zeichnung der Lage verschiedener Lymphknoten in der Maus. 49

Abbildung 11. Schematische Darstellung des *NSEHaPrP*-Transgens. 55

Abbildung 12. Schematische Sequenzdarstellung der verwendeten Proteine (Aminosäuren 23-231) für die Immunisierung (A) und das Immunisierungsschema (B). 56

Abbildung 13. Gesamt Immunglobulin-Titer in den Seren der immunisierten *NSEHa-Prnp*^{0/0}-Mäuse 57

Abbildung 14. Endpunkttitration der Seren immunisierter *NSEHa-Prnp*^{0/0}-Mäuse 58

Abbildung 15. Anti-Hamster bzw. Anti-Maus Immunglobulinsubtypen in *NSEHa-Prnp*^{0/0}- Mäusen nach Immunisierung mit rek.PrP und PrP-P30..... 60

Abbildung 16. Klonierungsschema für den Austausch der murinen Sequenz des PrP-Gens gegen die Hamster-Region..... 62

Abbildung 17. Bindung von Anti-PrP-spezifischen Antikörpern an 293T-Zellen mittels Durchflusszytometrie. 64

Abbildung 18. Bindung der Seren an PrP^C im Westernblot. 1

Abbildung 19. Reduktion des PrP^{Sc}-Gehaltes von ScN2a-Zellen durch Anti-PrP Antikörper in den Seren der immunisierten Tiere 66

Abbildung 20. Die Immunisierung mit dem Fusionsprotein PrP-P30 führt zu verlängerter Inkubationszeit von infizierten *NSEHa-Prnp*^{0/0}-Tieren. 69

Abbildung 21. PrP^{Sc}-Nachweis in Hirnhomogenaten der inokulierten und immunisierten Mäuse bzw. in Kontrolltieren mittels Westernblot. 70

Abbildung 22. PrP^{Sc}-Nachweis in den Gehirnen infizierter und immunisierter *NSEHa-Prnp*^{0/0} Mäuse. 72

Abbildung 23. Bioassay mit Hirnhomogenat von Scrapie-infizierten, immunisierten Hamster-transgenen Mäusen. 73

Abbildung 24. Übersicht über den Immunisierungsverlauf der zweiten Gruppe von mit rek.PrP und PrP-P30 immunisierten *NSEHa-Prnp*^{0/0}. 74

Abbildung 25. Humorale Immunantwort gegen Maus- und Hamster-PrP in den Seren mit rek.PrP- und PrP-P30 immunisierten <i>NSEHa-Prnp^{0/0}</i> -Mäusen.....	75
Abbildung 26. Konkurrenz des Immunsersums eines mit PrP-P30 immunisierten <i>NSEHa-Prnp^{0/0}</i> -Tieres. 77	77
Abbildung 27. Spezifität der Immunsereen gegen Hamster- und Maus-PrP auf der Oberfläche von 293T-Zellen im FACS.....	78
Abbildung 28. Westernblotanalyse ausgewählter Immunsereen für die Spezifität gegenüber Hamster- und Maus-Prion-Protein.....	80
Abbildung 29. Reduktion der PrP ^{Sc} -Akkumulation in ScN2a-Zellen durch Anti-PrP Antikörper aus den Immunsereen mit PrP-P30 und rek.PrP-immunisierten Tieren	81
Abbildung 30. Einfluss von Maus- und Hamster-PrP auf die Differenzierung von dendritischen Zellen... 82	82
Abbildung 31. Nach <i>in vitro</i> Stimulierung mit Hamster- oder Maus-PrP bzw. Ovalbumin kommt es zu keiner spezifischen Proliferation von CD4-positiven Zellen aus den Lymphknoten immunisierter Mäuse.....	83
Abbildung 32. Nach <i>in vitro</i> Stimulierung mit Hamster- oder Maus-PrP bzw. Ovalbumin kommt es zu keiner spezifischen Proliferation von CD4-positiven Zellen aus den Milzzellen immunisierter Mäuse	84
Abbildung 33. PCR-Analyse der Transplantate.....	86
Abbildung 34. Anti-PrP-Titer in Seren von <i>Prnp^{0/0}</i> -Mäuse mit PrP-exprimierenden neuroektodermalen Transplantaten.....	88
Abbildung 35. Typische Position eines PrP ^C -exprimierenden Transplantats im Seitenventrikel des Gehirns einer <i>Prnp^{0/0}</i> Empfängermaus.	88
Abbildung 36. Zeitverlauf der Transplantation und Analyse.	89
Abbildung 37. Detektion von PrP ^{Sc} in transplantiertem neuroektodermalem Gewebe mit der Petblot-Technik.....	90
Abbildung 38. Nachweis der Scrapie-Pathologie in den Transplantaten.....	92
Abbildung 39. Intraventrikulär oder intraparenchymal gelegene Transplantate der verschiedenen Genotypen zeigen keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Differenzierung	1
Abbildung 40. Aktivierte Caspase-3 innerhalb der verschiedenen Transplantate.....	95
Abbildung 41. Immunhistochemische Analyse von TUNEL-positiven Neuronen und aktivierter Caspase-3 in BAX- und BCL-2-defizienten Transplantaten.....	96
Abbildung 42. Therapeutische Anwendungen von CpG-Oligonukleotiden (CpGs-ODNs)	101
Abbildung 43. Mögliche Wirkungsweisen der induzierten Anti-PrP-Immunantwort.....	106
Abbildung 44. Abhängigkeit der spezifischen Serum Anti-Hamster-PrP ^C -Titer auf die Inkubationszeit.. ..	107

Tabelle 1. Übersicht über Prionenerkrankungen bei Tieren.	2
Tabelle 2. Ätiologische Einteilung der menschlichen Prionenerkrankungen und ihre Ursachen.....	4
Tabelle 3. Bestimmung der spezifischen Anti-PrP-IgG-Antikörper einzelner immunisierter <i>NSEHa-Prnp^{0/0}-Mäuse</i>	59
Tabelle 4. Spezifitätsnachweis der Seren für Maus- und Hamster-PrP mittels Kompetitivem ELISA.	61
Tabelle 5. Vergleich der Endpunkte gegen Maus-PrP im ELISA und Fähigkeit der Immunsereen die Prionenreplikation in ScN2a-Zellen zu inhibieren.	67
Tabelle 6. Individuelle Inkubationszeiten der immunisierten und inokulierten <i>NSEHa-Prnp^{0/0}</i> Mäuse.....	69
Tabelle 7. Auswertung der Konkurrenzexperimente mittels ELISA	77
Tabelle 8. Vergleich der erreichten Endpunkttiter im ELISA mit der Spezifität der Seren im FACS.	79
Tabelle 9. Anzahl der mit BAX- bzw. BCL-2 neuroektodermalem Gewebe transplantierten und inokulierten <i>Prnp^{0/0}</i> -Tiere.	87

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die an dem Fachbereich für Virologie an der Universität Würzburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel “Immunisierungsstrategien gegen Prionenerkrankungen und Untersuchung zur Prionen-induzierten Neurodegeneration“ unter der Betreuung durch Prof. Dr. Michael A. Klein ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel 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

Angela Bahlo

LEBENS LAUF**■ Persönliche Daten**

Name: Angela Bahlo
 Geburtsdatum: 06.07.1976
 Geburtsort: Bretten
 Familienstand: ledig

■ Bildungsweg

07/96 Abitur, Melanchthon-Gymnasium Bretten,
 Note: 2,9

08/96 – 03/97 Ferienarbeiter Firma Behr GmbH & Co. KG, Stuttgart

05/97 – 12/02 Studium der Biologie am Theodor-Boveri-Institut für
 Biowissenschaften,
 Julius-Maximilians-Universität Würzburg
 Schwerpunkte: Genetik (Note: 1,0)
 Biochemie (Note: 1,0),
 Tierphysiologie (Note: 1,0)

■ Diplomarbeit

02/2002-12/2002 Diplomarbeit im Institut für Genetik und Neurobiologie, Institut
 Prof. Heisenberg, AG Prof. Pflugfelder
 “Entwicklung von Vektoren zur revers-genetischen Struktur und
 Funktionsanalyse in Drosophila und anderen Arthropoden”
 Note: 1,0

12/02 – 04/03 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik und
 Neurobiologie, Institut Prof. Heisenberg, AG Prof. Roland
 Strauss
 “Identifizierung und Klonierung von Drosophila Mutanten mit
 Defekten im visuellen Orientierungsverhalten”

■ Promotionsarbeit

05/03-03/08 Institut für Virologie und Immunbiologie Universität Würzburg
 “ Immunisierungsstrategien gegen Prionenerkrankungen und
 Untersuchung zur Prionen-induzierten Neurodegeneration”
 Finanziert durch SFB 581: Molekulare Modelle für
 Erkrankungen des Nervensystems”

Würzburg, den

Angela Bahlo _____

Publikationsliste

Porsch M, Sauer M, Schulze S, Bahlo A, Roth M, Pflugfelder GO

The relative role of the T-domain and flanking sequences for developmental control and transcriptional regulation in protein chimeras of *Drosophila* OMB and ORG-1.
Mech Dev. 2005 Jan;122(1):81-96

Shen J, Dorner C, Bahlo A, Pflugfelder GO

optomotor-blind suppresses instability at the A/P compartment boundary of the *Drosophila* wing.
Mech Dev. 2007 Nov;125(3-4):233-246

Von-Poser Klein C[#], Bahlo A[#], Lindner N, Flechsig E, Klein MA

Impaired immune system confers resistance to oral prion infection of mice expressing neuron-specific hamster PrP

[#]both authors contributed equally to this study
accepted, The American Journal of Pathology

Bahlo A, Lindner N, Flechsig E, Klein MA

Unaltered Neurodegeneration in Prion-infected Neurografts devoid of BCL-2 or BAX
manuscript

Bahlo A, Flechsig E, Klein MA

Immunization with mouse prion protein can break immunological tolerance to PrP in *NSEHa-Prnp^{0/0}* mice and attenuates prion disease after intraperitoneal challenge
manuscript

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Michael A Klein danken, der die Betreuung meiner Arbeit übernommen hat und mir in den letzten Jahren durch sein entgegengebrachtes Vertrauen und den Freiraum, den er mir gelassen hat, viel für meine wissenschaftliche Entwicklung beigetragen hat. In diesem Zusammenhang möchte ich natürlich auch Dr.Eckhard Flechsig danken, für sein Interesse an meiner Arbeit und der kompeteten Hilfe bei meiner Promotion.

Ich danke Prof. Erich Buchner für die Bereitschaft, die Zweitkorrektur zu übernehmen.

Was wäre die Arbeit gewesen ohne diese Arbeitsgruppe um mich herum. Ich danke meinen „Mädels“ für ne supertolle Zeit. Es ist nicht selbstverständlich dass überall so ein harmonisches, wenn auch manchmal wahnsinnig-verrücktes Arbeitsklima herrscht ☺ Meine „Leidensgenossinen“ Cindy, Tanja und Katja für viel „gude Mugge“ und nen Haufen Spass, Party und Wahnsinn in und ausserhalb des Labors. Nele und Julchen für ihre Hilfe beim Meistern des Labor- und Lebensalltags und diversen kulinarischen Leckereien. Auch vielen Dank an die männlichen Mitglieder der Gruppe: der „Neu-Deutsche“ Vladi, Jan und vor allem Patrick für seine stetige Hilfe nicht nur bei kleineren und größeren Computerproblemchen sondern auch für die vielen, nicht nur wissenschaftlichen Diskussionen.

Burkhard danke ich dafür, dass er immer für mich da war wenn ich ihn gebraucht habe, und das nicht nur in wissenschaftlichen Fragen.

Klaus möchte ich einfach dafür danken, dass es ihn gibt. Er zeigt mir jeden Tag, was wirklich wichtig ist im Leben. Er war auch in schwierigen Situationen an meiner Seite und wird das hoffentlich auch noch in Zukunft sehr lange sein.

Am Schluss möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, die mich schon immer in allen Lebenslagen unterstützt haben, nicht nur in finanzieller Hinsicht. Meiner Mama für ihr Vertrauen und für ihre Liebe. Und meinem Papa, der das Ende dieser Arbeit leider nicht mehr mit mir feiern kann und mir unendlich fehlt.



Danke!!!