

Ein zellbasierter Biolumineszenzassay zur Untersuchung der Dimerisierung und Aggregation des Prionproteins

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

Katharina Annick Wüsten

aus Velbert

Bonn, 2017

Anfertigung mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Gültekin Tamgüney

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Höhfeld

Tag der Promotion 28.06.2017

Erscheinungsjahr 2017

Meinen Eltern, wie versprochen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	3
1.1 Das zelluläre Prionprotein (PrP ^C).....	3
1.2 Die Struktur des Prionproteins	4
1.3 Vergleich zwischen PrP ^C und PrP ^{Sc} und die Prion Hypothese	6
1.4 PrP ^C -PrP ^{Sc} Konversionsmodelle	7
1.5 Beispiele für Prion-Erkrankungen	9
1.6 Prionstämme.....	11
1.7 In vivo und in vitro Nachweisverfahren für Prionen	12
1.8. Zielsetzung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Geräteliste	15
2.1.2 Verbrauchsmaterial	16
2.1.3 Zellkulturmedien und –zusätze.....	16
2.1.4 Zelllinien	17
2.1.5 Enzyme	17
2.1.6 Kits	17
2.1.7 Primer.....	17
2.1.8 Antikörper	18
2.1.9 Pufferzusammensetzung.....	18
2.1.10 Lösungen.....	19
2.1.11 Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.1.12 Software	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Zellkultur.....	22
2.2.1 Kultivierung von RK13- und N2a-Zellen	22
2.2.2 Durchflusszytometrie	23
2.2.3 Immunozytochemische Zellfärbung.....	23
2.2.4 MTT-Test.....	23
2.2.5. Klonierung und PCR.....	24
2.2.6. Western Blot.....	25
2.2.7 Enzymatischer Verdau von Zelllysaten oder Hirnhomogenaten	26
2.2.8 Biolumineszenzuntersuchung.....	27

2.2.9 In vivo Versuche	29
2.2.10 Auswertung	31
3. Ergebnisse.....	32
3.1 Klonierung der Fusionskonstrukte.....	32
3.2 Expressionsnachweis von Fusionsproteinen im Western Blot	33
3.3 Expressionsnachweis mittels Immunzytochemie	36
3.4. Nachweis der PrP-Dimerisierung in RK13+PrP-DC-Zellen mittels Biolumineszenzassay	37
3.5 Antikörper gegen die zentrale Region von PrP inhibieren die Dimerisierung des Proteins.....	38
3.5.1 Antikörper gegen PrP inhibieren die dessen Dimerisierung konzentrations- und zeitabhängig	41
3.6 Eine akute Prioninfektion der RK13+PrP-DC-Zellen führt zu einem Anstieg des Biolumineszenzsignals.....	43
3.6.1 Die Behandlung mit Quinacrine hemmt die Prioninfektion.....	45
3.6.2 Eine akute Infektion von RK13+PrP-DC-Zellen kann für weitere fünf Prionstämme nachgewiesen werden.....	46
3.7 Chronisch infizierte RK13+PrP-DC-Zellen zeigen nach Quinacrine-Behandlung einen Rückgang des Biolumineszenzsignals	47
3.8 Tga20 Mäuse, die mit Lysat der chronisch infizierten und Quinacrine-sensitiven ScRK13+PrP-DC-Zellen infiziert wurden, zeigen weder Krankheitssymptome noch eine verkürzte Lebensdauer.....	48
3.9 In Hirnhomogenat von Tga20-Mäusen, die mit chronisch infizierten ScRK13+PrP- DC infiziert wurden, war kein PrPSc nachweisbar	50
3.10 Das Wirkstoff-Screening identifiziert eine Substanz, die Dimerisierung und Aggregation von PrP inhibiert	51
4. Diskussion	57
4.1 PrP-Dimerisation.....	57
4.2 Der Effekt PrP-spezifischer Antikörper auf die Dimerisation	58
4.3 Detektion Infektions-induzierter Aggregation von PrP.....	60
4.4 QA-Behandlung infizierter RK13+PrP-DC-Zellen.....	61
4.5 Nachweis der Infektiosität im Mausversuch	62
4.6 Infektion mit unterschiedlichen Prion-Stämmen	63
4.7 Wirkstoff-Screening basierend auf dem Biolumineszenzassay.....	67
5. Abkürzungsverzeichnis.....	70
6. Zusammenfassung	72
7. Summary	74
8. Literaturverzeichnis	75

9. Danksagung90
10. Erklärung91
11. Wissenschaftliche Publikationen:92

**Wer a sagt, der muss nicht b sagen.
Er kann auch erkennen, dass a falsch war.**

Bertolt Brecht

1. Einleitung

1. Einleitung

1.1 Das zelluläre Prionprotein (PrP^C)

Die Grundlage aller Prionerkrankungen, wie beispielsweise der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) bei Menschen oder der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) bei Rindern ist die Fehlfaltung des zellulären Prionproteins, das auch als PrP^C bezeichnet wird. Prionerkrankungen werden auf Grund ihrer Übertragbarkeit und Pathologie im Englischen auch als *Transmissible Spongiform Encephalopathie* (TSE) bezeichnet. Der zentrale Vorgang im Zusammenhang mit der Erkrankung ist die konformationelle Umwandlung von PrP^C in die infektiöse Isoform PrP^{Sc}.

PrP^C, das beim Menschen aus 253 Aminosäuren (AS) besteht, wird vom PRNP-Gen kodiert und befindet sich auf Chromosom 20. Maus *Prnp* ist auf Chromosom 2 lokalisiert und kodiert für 254 AS. (Liao et al., 1986; Sparkes et al., 1986). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete AS-Nummerierung bezieht sich auf das murine PrP^C.

Während der Proteinsynthese am Endoplasmatischen Retikulum (ER) werden sowohl die 22 AS lange N-terminale als auch die 23 AS lange C-terminale Signalsequenz abgespaltet. Dafür wird an ein Serin in Position 231 ein Glykoinositolphospholipid (GPI)-Anker angefügt, durch den das reife PrP mit der äußeren Zell-membran verbunden ist (Stahl et al., 1987). An der Zellmembran ist PrP überwiegend in cholesterol-reichen Membrankompartimenten, den sog. „Lipid-rafts“, lokalisiert. Eine weitere posttranslationale Modifikation des Proteins ist die Anheftung von Zuckerketten an die Asparagine an den Positionen 181 und 197. Damit kann PrP un-, mono- als auch diglykosyliert vorliegen, wobei alle drei Formen gleichermaßen in der Zelle vorkommen (Endo et al., 1989; Haraguchi et al., 1989; Linden et al., 2008). PrP wird konstitutiv exprimiert und kommt vor allem in Neuronen, aber in geringen Mengen auch in Lungen-, Herz-, Nieren- und Pankreasgewebe, sowie in weißen Blutzellen und Thrombozyten vor (Bendheim et al., 1992; Perini et al., 1996). Trotz der ubiquitären Präsenz von PrP^C ist die physiologische Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt. Möglicherweise ist PrP^C bei der Bindung von Kupfer-Ionen und/oder in neuroprotektiven Signalwegen involviert (Chiarini et al., 2002; Jackson et al., 2001). Außerdem wird die Rolle von PrP^C für das

1. Einleitung

Immunsystem und den programmierten Zelltod diskutiert (Bainbridge and Walker, 2005; Bounhar et al., 2001; Kuwahara et al., 1999; Mattei et al., 2004). Bemerkenswerterweise zeigen junge PrP-Knockout (PrP-KO)-Mäuse keinen spezifischen Phänotyp. Sie entwickeln sich normal und weisen lediglich einen veränderten Schlaf-Wach-Rhythmus auf (Bueller et al., 1992; Manson et al., 1994). Neuere Beobachtungen in alten PrP-KO Mäusen lassen schlussfolgern, dass PrP^C vor allem eine neuroprotektive Rolle spielt und wichtig für die Erhaltung der Myelinschicht ist (Bremer et al., 2010).

1.2 Die Struktur des Prionproteins

PrP^C ist das einzige bei der Umwandlung in PrP^{Sc} involvierte Element, dessen Struktur auf einem hochauflösenden Niveau charakterisiert ist. Mit Hilfe der Nuklearmagnetresonanz (NMR)-Spektroskopie war es möglich, zunächst die dreidimensionale Struktur von murinem Maus-PrP¹²¹⁻²³¹ (Riek et al., 1996) und schließlich die des gesamten Proteins zu beschreiben (Riek et al., 1997). Demnach ist PrP^C aus einer unstrukturierten N-terminalen Domäne (AS23-120) und einer globulären C-terminalen Domäne (AS 121-231) zusammengesetzt. Die N-terminale Domäne besteht, neben der bereits erwähnten Signalsequenz, aus einer Octa-Repeat-Region, die aus Motivwiederholungen von acht AS (PHGGGWGQ) besteht. Die Anzahl dieser Wiederholungen ist speziesabhängig und variiert von zwei bis sieben (van Rheede et al., 2003). Eine Ausdehnung der Octa-Repeat-Region auf 13 Motivwiederholungen verursacht eine familiäre Form der CJD (Krasemann et al., 1995). Im Gegensatz zur unstrukturierten N-terminalen Domäne zeichnet sich die C-terminale Domäne von PrP^C durch drei α -Helices und zwei antiparallel verlaufende β -Faltblätter aus. Die α -Helices 2 und 3 werden von einer internen Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 179 und 214 stabilisiert (Riek et al., 1997). In Abbildung 1.1 ist die Sekundär- und die Tertiär-struktur von PrP^C dargestellt.

1. Einleitung

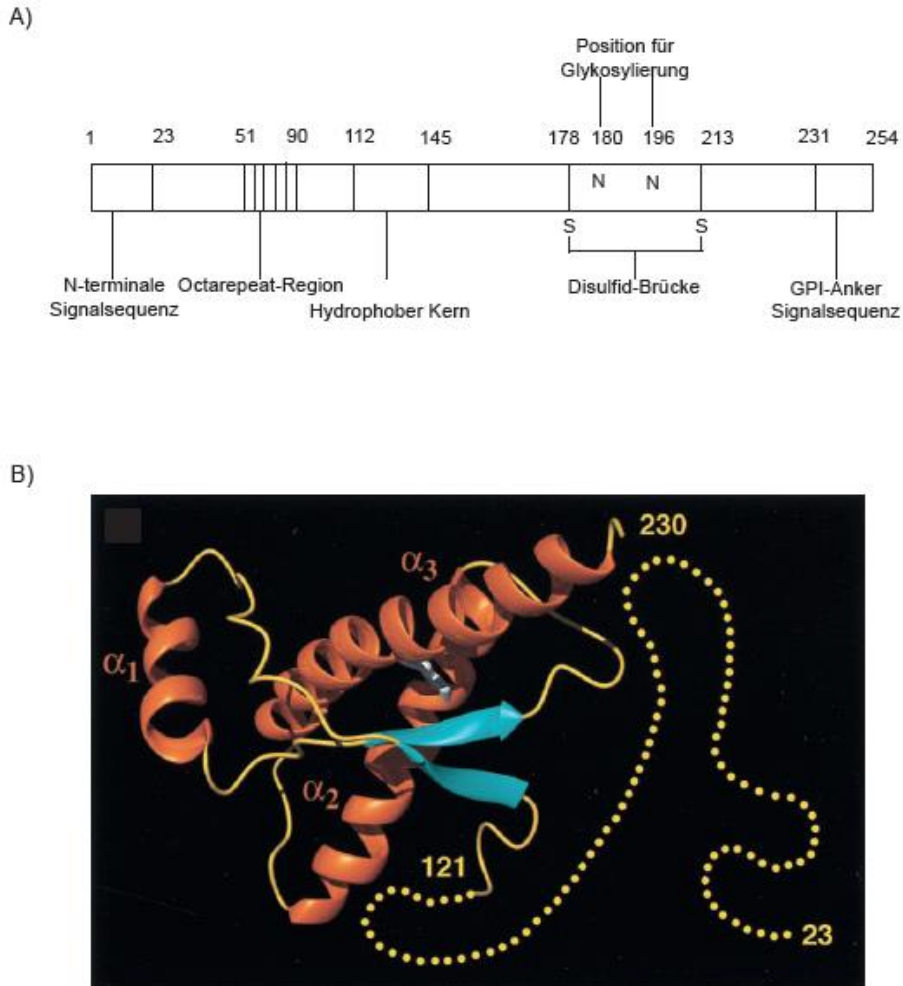


Abb.1.1: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur (A) und der Tertiärstruktur (B) des murinen PrP^C. A) Das murine Prionprotein besteht aus 254 AS und umfasst die N-terminale Signalsequenz (AS 1-23) und die Octa-Repeat -Region (AS 51-90) am N-Terminus sowie den hydrophoben Kernbereich (AS 112-145), eine Disulfidbrücke zwischen Cysteinen 179 und 214, die Asparaginreste 180 und 196 für eine potentielle Glykosylierung und die Signalsequenz zum Anfügen des GPI-Ankers. Verändert nach (Brown, 2001)

B) Die mittels NMR-Spektroskopie aufgelöste Tertiärstruktur zeigt zwei β -Faltblatt-Strukturen, (blaue Pfeile) drei α -Helices α_1 , α_2 und α_3 (orange), die unstrukturierten Abschnitte des C-Terminus (gelbe Linie) und die des N-Terminus (AS 23-121, gelbe Punkte)

Verändert nach (Zahn et al., 2000)

Im Gegensatz zu PrP^C ist trotz vieler Modelle, die in den letzten Jahren vorgeschlagen wurden, weder die Struktur von PrP^C-PrP^{Sc}- intermediären Produkten, noch die Struktur von PrP^{Sc} vollständig aufgelöst (Cobb et al., 2007; DeMarco and Daggett, 2004; Downing and Lazo, 1999; Govaerts et al., 2004; Huang et al., 1996; Langedijk et al., 2006; Mornon et al., 2002; Stork et al., 2005; Wille et al., 2009; Wille et al., 2002). Während die PrP^C-Struktur mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt wurde, sind selbst kleinere PrP^{Sc}-Oligomere auf Grund ihrer Größe von 400-600 kDa (Silveira et al., 2005) kaum für

1. Einleitung

klassische biophysikalische Methoden zugänglich. Zudem sind PrP^{Sc} Oligomere, bzw. Aggregate wasserunlöslich und bilden in Puffern, die für Strukturanalysen benötigt werden, nicht-kristalline Formen aus, die sich wiederum nur unter Hitze- und Chemikalienbehandlung wieder auflösen (Gabizon et al., 1987). Während des Aufreinigungsprozesses tendieren PrP^{Sc} Aggregate außerdem dazu, sich an andere Proteine, Lipiden oder AS zu heften, was das Risiko für Kontaminationen erhöht (Diringer et al., 1997).

1.3 Vergleich zwischen PrP^C und PrP^{Sc} und die Prion Hypothese

Obwohl PrP^C und PrP^{Sc} die gleiche Primärstruktur besitzen und die post-translationalen Modifikationen ebenfalls identisch sind, unterscheiden sich die beiden Isoformen in Bezug auf einige biochemische und biophysikalische Charakteristika (Stahl et al., 1993). Wie im vorherigen Abschnitt erläutert ist die Struktur von PrP^{Sc} bisher nur in Modellen beschrieben, dennoch ist klar, dass sie sich deutlich von der PrP^C-Struktur unterscheidet. Während PrP^C zu 42% aus α -Helices und nur zu 3% aus β -Faltblättern besteht, deuten NMR- und Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie auf einen geringeren Anteil von α -Helices in PrP^{Sc} Aggregaten hin (Baldwin et al., 1994; Castilla et al., 2005; Caughey et al., 1998; Caughey et al., 1991; Pan et al., 1993; Safar et al., 1993a). Surewicz et al. beschreiben in ihrem Modell, dass PrP^{Sc}-Aggregate keine α -Helices enthalten, sondern allein aus parallel-verlaufenden β -Faltblattstrukturen bestehen (Surewicz et al., 1993). Insgesamt verdeutlicht die Existenz der verschiedenen Modelle, wie wenig bis heute über die Struktur von PrP^{Sc} bekannt ist. Im Gegensatz dazu ist das klassische Unterscheidungsmerkmal zwischen PrP^C und PrP^{Sc} die Resistenz gegenüber proteolytischem Verdau (Caughey and Raymond, 1991; Pan et al., 1993). PrP^C ist durch die Behandlung mit Proteinase K (PK) vollständig abbaubar, während PrP^{Sc} partiell resistent gegenüber kontrolliertem PK-Verdau ist, so dass ein um den N-Terminus verkürztes Protein entsteht, das entsprechend seines Molekulargewichts als PrP27-30 bezeichnet wird (Caughey et al., 1991). Darüber hinaus weist PrP^{Sc} auch gegenüber der Denaturierung durch Hitze, Harnstoff oder chaotropen Salzen eine größere Stabilität als PrP^C auf (Prusiner et al., 1993; Safar et al., 1993b).

1. Einleitung

Die Unterschiede machen deutlich, dass PrP in zwei Isoformen existiert: Der nativen Form, dem PrP^C und der krankheits-assoziierten Form, dem PrP^{Sc}. Die mittlerweile weitgehend akzeptierte Prion-Hypothese besagt, dass der TSE-Erreger ein sich selbst replizierendes, fehlgefaltetes und infektiöses Protein ist (Prusiner, 1998; Soto, 2011). Belege hierfür sind u.a., dass der TSE-Erreger, bzw. PrP^{Sc}, nicht durch Behandlungen inaktiviert wird, die zur Denaturierung von DNA eingesetzt werden (Alper et al., 1967). Trotz intensiver Forschung war es nicht möglich, DNA oder Viren im Zusammenhang mit PrP^{Sc} reproduzierbar nachzuweisen (Prusiner et al., 1984; Safar et al., 2005). Dagegen führt aufgereinigtes, PrP^{Sc}-haltiges Material zu einer Übertragung von TSEs (Safar et al., 2005) wobei die Infektiosität abhängig von der eingesetzten PrP^{Sc} Konzentration ist. PrP-KO Mäuse sind jedoch resistent gegenüber Prionenerkrankungen, unabhängig von der eingesetzten Dosis (Bueller et al., 1993; Mallucci et al., 2003). Ein weiterer *in vitro* gefundener Beweis für die Prion-Hypothese besteht in der Fähigkeit von PrP^{Sc} PrP^C in einer autokatalytischen Reaktion zu konvertieren (Kocisko et al., 1994; Saborio et al., 2001).

1.4 PrP^C-PrP^{Sc} Konversionsmodelle

Für die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} werden hauptsächlich zwei Modelle diskutiert, die schematisch in Abb. 1.2 dargestellt sind: Das sog. „Heterodimer-Modell“ (engl. *refolding model*) und das „Nukleationskeim-Modell“ (engl. *seeding model*). Beim Heterodimer-Modell wird die spontane Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} durch die hohe zu überwindende Aktivierungsenergie verhindert. Damit ließe sich das seltene Auftreten der sporadischen Form der CJD (sCJD) mit einem Fall pro 10⁶ Individuen pro Jahr erklären (Kahana et al., 1974). Eine Infektion mit PrP^{Sc} könnte jedoch unter Bildung eines intermediären PrP^C-PrP^{Sc}-Heterodimers die Aktivierungsenergie senken und die Umwandlung von PrP^C in die fehlgefaltete, β -Faltblatt-reiche PrP^{Sc}-Struktur auslösen. Auch bestimmte Mutationen in *Prnp* können die spontane Umwandlung von PrP^C begünstigen (Hsiao and Prusiner, 1990) Neu synthetisiertes PrP^{Sc} könnte wiederum weiteres PrP^C rekrutieren. In diesem Prozess sind möglicherweise auch Chaperone und Enzyme beteiligt.

1. Einleitung

Beim Nukleationskeim-Modell besteht ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen PrP^C und PrP^{Sc}, das zu Gunsten von PrP^C verschoben ist. Durch einen Nukleationskeim („seed“) wie PrP^{Sc}-Aggregate könnte endogenes PrP^{Sc} jedoch stabilisiert werden, so dass sich weitere PrP^{Sc}-Moleküle anlagern und sich Oligomere und Fibrillen bilden. Ein Auseinanderbrechen dieser Strukturen wäre die Quelle für neue Nukleationskeime, die zu einer schnellen Vervielfältigung von PrP^{Sc} führen würden (Caughey et al., 2009; Jarrett and Lansbury, 1993; Soto et al., 2006). Das Nukleationskeim-Modell wird durch *in vitro* Daten unterstützt, die zeigen, dass die Inkubation von PrP^C mit PrP^{Sc}-Fibrillen zu einer hohen Umwandlungsrate führt, während die spontane Konversion zu PrP^{Sc} ein seltenes Ereignis ist (Soto et al., 2006)

Abgeleitet von diesen beiden Konversionsmodellen wird ebenfalls diskutiert, ob PrP^C und PrP^{Sc} als Dimere vorliegen, die entweder die Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} katalysieren oder als Stabilisator für PrP^{Sc}, bzw. als Kristallisationskeim dienen könnten (Tompa et al., 2002). Studien zeigten, dass PrP-Dimere sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen auftreten (Kocisko et al., 1994; Priola et al., 1995). Es ist noch nicht abschließend geklärt, welche PrP^{Sc}-Spezies für dessen Infektiosität verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang werden, mit Ausnahme von PrP-Monomeren, verschiedene PrP^{Sc}-Spezies diskutiert (Caughey et al., 1997; Hope, 1994; Prusiner et al., 1990), wobei neuere Arbeiten zeigen, dass kleine Oligomere, zusammengesetzt aus 12-14 Monomeren, die höchste Infektiosität aufweisen (Silveira et al., 2005; Tixador et al., 2010)

1. Einleitung

Demenz und motorische Dysfunktionen wie Tremor, Spasmen und Lähmungen, aber auch Verhaltensauffälligkeiten wie Verwirrtheit und Depression. Die betroffenen Patienten sind meist zwischen 55 und 75 Jahren alt. Neuropathologische Kennzeichen sind schwammartige Auflockerungen des Gehirns und vereinzelt Ablagerungen von PrP^{Sc} (Belay, 1999; Pocchiari et al., 2004). In den 90er Jahren wurden CJD-Fälle bekannt, bei denen die Patienten mit durchschnittlich 29 Jahren bei Ausbruch der Krankheit deutlich jünger waren (Will, 2003). Auch die Symptome unterschieden sich von der sporadischen Form, da es sich hauptsächlich um psychiatrische Auffälligkeiten wie Angstzustände, Aggression, Schlafstörungen oder paranoide Wahnvorstellungen handelte (Belay et al., 2005; Ironside et al., 2006). Bei den betroffenen Individuen ließ sich zudem PrP^{Sc} im Lymphgewebe nachweisen (Ironside et al., 2006). Laboruntersuchungen und die Übertragung von infektiösem Material in Makaken zeigten eine große Ähnlichkeit mit BSE-Prionen. Daher wird davon ausgegangen, dass diese neue Variante der CJD (variant CJD; vCJD) auf den Konsum von BSE-kontaminiertem Fleisch zurückzuführen ist und die Übertragung von Prionen von Rindern auf den Menschen darstellt (Will, 2003). Die speziesübergreifende Übertragung von Prionerkrankungen ist jedoch im Vergleich zur Übertragung innerhalb einer Spezies deutlich weniger effizient, wenn nicht unmöglich, da sie durch die sog. Speziesbarriere verhindert wird (Moore et al., 2005; Peretz et al., 2002). Die Speziesbarriere besteht aufgrund von Unterschieden in der Primärstruktur von PrP zwischen verschiedenen Spezies, die eine Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} stört (Chen and Gambetti, 2002; Vanik et al., 2004). Im Vergleich zu BSE-Prionen, die nur in sehr geringem Umfang auf Menschen übertragbar sind, ist die bei Schafen und Ziegen auftretende Prionerkrankung der Traberkrankheit oder *Scrapie* nicht auf Menschen übertragbar. *Scrapie* wurde bereits Mitte des 18. Jahrhunderts beschrieben (Aguzzi, 2006; Imran and Mahmood, 2011). Betroffene Tiere zeigen motorischen Störungen, erhöhte Schreckhaftigkeit und leiden an Pruritus und kratzen sich deswegen häufiger als gesunde Artgenossen. Von diesem Verhalten (engl.: *scrape* = kratzen) lässt sich der englische Namen der Krankheit ableiten und davon wiederum die Bezeichnung der krankheitsassoziierten Isoform des Prionoproteins, PrP^{Sc}. Eine weitere bei Tieren auftretende Prionerkrankung ist die chronisch zehrende Krankheit der Hirschartigen, die im Englischen als *chronic wasting disease* (CWD) bezeichnet wird und die, hauptsächlich in Nordamerika, Hirschartige wie Hirsche und Rehe befällt. CWD-Prionen können über

1. Einleitung

Speichel, Kot und Urin ausgeschieden und verbreitet werden, auch lange bevor die Tiere klinische Symptome zeigen (Tamguney et al., 2009). Zu den Symptomen zählen, ähnlich wie bei Scrapie, motorische Störungen und Verhaltensauffälligkeiten (Miller and Williams, 2004)

1.6 Prionstämme

Bereits bevor die Prion-Hypothese aufgestellt wurde, wurde die Existenz verschiedener Prionstämmen beschrieben (Pattison and Millson, 1961). Voraus ging die Beobachtung, dass Ziegen, die mit dem gleichen Scrapie-kontaminierten Material infiziert wurden, unterschiedliche klinische Symptome zeigten.

Die gebräuchlichsten *in vivo* Parameter, um Prionstämme voneinander zu unterscheiden sind heute die Inkubationszeit, die betroffenen Gehirnareale, in denen PrP^{Sc}-Ablagerungen und eine spongiforme Degeneration zu beobachten sind und die klinischen Symptome (Bessen and Marsh, 1992b; Bruce, 1993; Fraser, 1993). Biochemisch lassen sich unterschiedliche Prionstämme anhand ihrer Sensitivität gegenüber PK-Verdau und ihrer elektrophoretischen Mobilität nach PK-Verdau voneinander unterscheiden. Diese beiden Parameter lassen Rückschlüsse auf die Schnittstellen am N-Terminus des Proteins zu. Weitere *in vitro* Charakteristika sind die Stabilität gegenüber anderen chemischen und physikalischen Denaturierungsmethoden und der Anteil der un- mono- oder diglykosylierten Proteinfractionen (Bessen and Marsh, 1992a; Collinge et al., 1996; Telling et al., 1996). Wie bereits im Zusammenhang mit der Speziesbarriere erwähnt liegt der Ursprung der Prionstämme in unterschiedlichen Konformationen von PrP^{Sc}, die auch über mehrere Passagen erhalten bleiben. Wie jedoch der Organtropismus unterschiedlicher Prionstämme kodiert ist oder warum beispielsweise murine Neuroblastomzellen unempfindlich gegenüber Prionstämmen sind, mit denen Mäuse infiziert werden können, sind bisher unbeantwortete Fragen in Bezug auf das Phänomen der unterschiedlichen Prionstämme.

1. Einleitung

1.7 *In vivo* und *in vitro* Nachweisverfahren für Prionen

In den letzten Jahren haben *in vivo* und *in vitro* Nachweisverfahren entscheidend zum Verständnis über die Biologie von PrP^C und PrP^{Sc} beigetragen. Die zentrale Rolle von PrP^C für die Umwandlung und Verbreitung von PrP^{Sc} wurde durch Versuche mit PrP-KO-Mäusen deutlich, die resistent gegenüber einer Prioninfektion sind (Bueller et al., 1993; Bueller et al., 1994)

Transgene Mäuse, die beispielsweise humanes PrP exprimieren, bieten die Möglichkeit, die Inkubationszeit verschiedener Prionstämme, deren Neuropathologie, die Reaktion des Immunsystems oder Verhaltensauffälligkeiten zu erforschen. Diese Aspekte lassen sich kaum ohne Tierversuche mit infizierten Mäusen oder Hamstern untersuchen, sie sind jedoch wegen der langen Inkubationszeiten sehr zeit- und kostenintensiv und setzen entsprechende Ressourcen voraus. Zellbasierte Testverfahren, wie der *Standard Scrapie Cell Assay* (SSCA), nutzen klassischerweise infizierte murine Neuroblastom-Zellen (N2a, bzw. ScN2a) oder Subklone dieser Zelllinie wie PK1 oder R33 (van der Merwe et al., 2015). Der SSCA wurde entwickelt, um die Lücke zwischen Mausversuchen und Western Blot zur Detektion von PK-resistentem PrP^{Sc} zu füllen und maus-adaptierte Prionstämme detektieren, beschreiben und titrieren zu können (Mahal et al., 2008). Dazu werden infizierbare Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und mit infektiösem Hirnhomogenat in verschiedenen Verdünnungen inkubiert. Anschließend folgt ein PK-Verdau und die Detektion des verbliebenen PK-resistenten PrP^{Sc}-Materials mittels PrP-spezifischer Antikörper. Modifizierungen des SSCA können darüber hinaus für Dekontaminations-Studien (Edgeworth et al., 2009) oder für größere Wirkstoff-Screenings genutzt werden (McCarthy et al., 2013).

Da Prionerkrankungen keine Immunreaktion verursachen und auch nicht durch pathogenspezifische DNA im betroffenen Organismus nachweisbar sind, ist das Grundproblem die schnelle und frühzeitige Detektion von PrP^{Sc}. Ultrasensitive *in vitro*-Testverfahren wie der *Protein Cyclic Amplification Assay* (PMCA) und der *Real time Quaking –Induced Conversion* (RT-QuIC)-Assay nutzen die Eigenschaft von PrP^{Sc}, sich selbst replizieren zu können und dabei als Vorlagen für die Umwandlung von PrP^C zu fungieren (Atarashi et al., 2007; Chen et al., 2010; Orru et al., 2009; Orru et al., 2011; Saa

1. Einleitung

et al., 2006b). PMCA funktioniert nach dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), indem rekombinantes PrP als Substrat und PrP^{Sc} aus Gehirn-, Blut-, Urin oder anderen Gewebeproben als Keim für die PrP-Umwandlung genutzt wird. Durch Sonifizierung der entstehenden PrP^{Sc}-Aggregate werden diese aufgebrochen und bieten weitere Anlagerungsflächen für rekrutiertes PrP^C aus dem Substrat (Saborio et al., 2001). Nach jedem Amplifizierungszyklus folgt ein PK-Verdau und die Detektion von PK-resistenten PrP^{Sc} Aggregaten, entweder mittels Western Blot oder einem amyloid-sensitiven Farbstoff wie Thioflavin T (ThT) (Orri et al., 2012). Über den direkten Zusammenhang zwischen der PrP^{Sc} Menge der eingesetzten Probe und Anzahl der Amplifizierungszyklen, die zur Detektion von PrP^{Sc} nötig sind, lässt sich die ursprüngliche in der Probe enthaltende PrP^{Sc}-Menge bestimmen (Chen et al., 2010). Selbst minimale Mengen von 10^{-18} g PrP^{Sc} können so in biologischem Material nachgewiesen werden (Jones et al., 2007; Saa et al., 2006a; Terry et al., 2009).

Der RT-QuIC-Assay beruht auf dem gleichen Prinzip wie der PMCA, allerdings werden die Proben bei diesem Testverfahren nicht sonifiziert sondern geschüttelt und die neugebildeten PrP-Fibrillen standardmäßig mit Hilfe von ThT detektiert. Das wichtigste Anwendungsgebiet des RT-QuIC ist die Diagnose von sCJD aus Liquorproben (Atarashi et al., 2011; Bessen et al., 2010; Peden et al., 2012).

1. Einleitung

1.8. Zielsetzung der Arbeit

Prionerkrankungen sind tödlich verlaufende, neurodegenerative Erkrankungen, die durch die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} ausgelöst werden. Im Vergleich zu PrP^C besteht PrP^{Sc} größtenteils aus β -Faltblatt-Strukturen und bildet Aggregate.

Im Prozess der Entstehung von PrP^{Sc} könnte die Dimerisierung von PrP einen wichtigen Zwischenschritt darstellen. Um die Dimerisierung von PrP untersuchen zu können, soll ein Biolumineszenz-Testverfahren entwickelt werden, das auf dem Prinzip der Proteinkomplementierung (engl.: *Protein-Fragment Complementation Assays*, PCA) beruht (Remy and Michnick, 2006). RK13 Zellen (*rabbit kidney epithelial cells*), die kein endogenes PrP exprimieren, werden für dieses Testverfahren stabil mit einem Fusionsprotein aus PrP und der N-, bzw. C-terminalen Hälfte von *Gaussia Luziferase* transfiziert. Dimerisiert oder aggregiert PrP an der Oberfläche der transfizierten RK13 Zellen, komplementieren sich beide Luziferasehälften und werden bei Zugabe des entsprechenden Substrats biolumineszent. Auf der Grundlage dieses Testverfahrens wird mit PrP-Antikörpern, die gegen unterschiedliche Regionen des Proteins (vgl. Abb. 1.1) gerichtet sind, der Einfluss spezifischer Regionen auf die Dimerisierung untersucht. Darüber hinaus ist es möglich, nach einer Infektion der RK13-Zellen mit Hirnhomogenat erkrankter Mäuse eine infektions-induzierte Aggregation von PrP zu detektieren, da Aggregate des PrP-Fusionsproteins zu erhöhter Biolumineszenz führen sollten. Mit der Verwendung unterschiedlicher Prionstämme sollen zusätzlich Fragen nach der Sensitivität der RK13-Zell-Linie gegenüber den verwendeten Stämmen nachgegangen werden. Als Kontrolle dient dabei Hirnhomogenat gesunder Mäuse, das keine Aggregation, bzw. zu keiner erhöhten Biolumineszenz führen sollte und der Anti-Prion-Wirkstoff Quinacrine, der das Signal infizierter Zellen wieder senken sollte. Da das Testverfahren für 96-Well-Formate entwickelt wird, eignet es sich auch zur Durchführung von Wirkstoff-Screenings. Aus einer Sammlung von 1650 Wirkstoffen sollen zunächst diejenigen identifiziert werden, die die Dimerisierung von PrP inhibieren, um unter diesen anschließend Wirkstoffe zu selektieren, die infizierte N2a Zellen heilen können. Das Ziel ist die Identifizierung potentieller neuer Anti-Prion-Wirkstoffe um die Rolle der Dimerisierung für die Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} näher zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräteliste

Gerät	Name	Hersteller
Benchtop UV Transilluminator	BioDoc-It Imaging System	UVP
Blaulich Transilluminator	Blaulich Transilluminator UVT-14 BE	Herolab
Computer	Otiplex 790	DELL
Deckgläser	“High Precision” Deckgläser	Carl Roth
Durchflusszytometer	FACSAria III Cell Sorters	BD Biosciences
Gelkammer	Mini-Sub Cell GT	Bio Rad
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf
Inkubator	Brutschrank INCU-Line	VWR
Inkubator (Zellkultur)	HERAcell 240i CO ₂ Incuabtor	Thermo Scientific
Kipp-/Rollenmischer	RS-TR 5	Roth
Kugelhomogenisator	Precellys 24-Dual Bead Homogenizer	Bertin Instruments
Labtop	EliteBook	HP
Mikroskop	Leica DM IL LED	Leica
Objektträger	Objektträger superfrost	VWR
PCR cycler	Veriti 96-Well Thermal cycler	Applied Biosystems
pH-Elektrode	pH-Elektrode InLab Micro	Mettler Toledo
pH-Meter	pH-Meter	Mettler Toledo
Pipetteboy	Easypet 3	Eppendorf
Pipetten	Eppendorf Reference	Eppendorf
Plattenlesegerät	EnVision 2140 Multilabel Reader	Perkin Elmer
Plattenlesegerät	Fluostar	BMG LABTECH
Plattenschüttler	Digital Orbitalschüttler Sea Star	Roth
Schüttler	Vortex Genie 2 Schüttelgerät	Scientific Instruments
Spektrophotometer	NanoDrop	PeqLab
Sterilwerkbank	Sicherheitswerkbank Model mars	Scanlaf
Stickstoff-Tank	MVE Cryosystem 6000	Chart Industries
Ultrazentrifuge	Avanti J-26 XP	Beckman Coulter
Ultrazentrifuge	Optima MAX-XP Ultracentifuge	Beckman Coulter
Vacuumpumpe	Vacunsafe	Integra
Waage	ABJ 220-4M Analysewaage	Kern
Wasserbad	Wasserbad WNB29	Memmert
Western Blot Imaging System	Li-Cor Odyssey Infrared Imaging System	Li-Cor
Western Blot Kammer	TE 77XP Semi-Dry Transfer	Hoefer
Western Blot Zubehör	Power Pac HC Power Supply	Bio Rad
Western Blot Zubehör	XCell 4 Surelock Midi-Cell Runner	Life Technologies
Zählkammer (Zellkultur)	Countess automated cell counter	Life Technologies
Zentrifuge	Hereaus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Scientific
Zentrifuge (Zellkultur)	Hereaus Multifuge X3 Serie	Thermo Scientific

2. Material und Methoden

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
384-well Platte	Perkin Elmer
6-/12-/24-/96-Well Platten	Greiner Bio-One, Neolab
96-Well half-area Platten	Perkin Elmer
Centrifuge Tube	Beckman Coulter
Kloniererringe, steril, 3 mm	sigma
Countess Kammern zur Zellzählung	Life Technologies
Cryoröhrchen 1 ml	Omnilab
Deckgläschen/Objektträger	Roth
Einmal-Spritzen, 1 mL	Th.Geyer
Einmal-Spritzen, 10 mL	Th.Geyer
Einmal-Wägeschalen	Neolab
Falcon-Röhrchen (15 und 50 mL)	Nerbe
IMMOBILON-FL PVDF Membran mit 0,45 µm Porengröße	Milipore
Nitril Handschuhe	Th. Geyer
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Midi Gele (SDS)	Life Technologies
OP-Mundschutz	Th. Geyer
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 mL)	Greiner Bio-One
Petrischalen	Roth
Pipetten (5, 10, 25 und 50 mL)	Th. Geyer
Pipettenspitzen (10 µl – 1000 µL)	Nerbe
PVDF-Membran	Omnilab
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 mL)	Eppendorf, nerbe
Skalpell	Paragon
Soft tissue homogenizing Röhrchen (2mL)	PEQLAB
Spritzenvorsatzfilter Minisart-plus, steril, 0.2 µL	Th. Geyer
Spritzenvorsatzfilter Minisart-plus, steril, 0.45 µm	Th. Geyer
Sterilfilter	Th. Geyer
Teströhrchen 0.5 mL	nerbe
Teströhrchen 15 mL	nerbe
Teströhrchen 50 mL	nerbe
Whatman-Papier	VWR
Zellkulturflasche (75 cm ²)	Greiner Bio-One
Zellkulturschalen (150 x 25 mm)	Schubert und Weiss

2.1.3 Zellkulturmedien und –zusätze

Zellkulturmedium oder -zusatz	Hersteller
D-MEM/F-12 (1X), 1:1, L-glutamine, ohne HEPES und Phenolrot	Life Technologies
DMEM High Glucose	Life Technologies
DMSO "Hybri-Max	Omnilab
Fetales Rinderserum (FBS)	Life Technologies
Geneticin (G418)	Life Technologies
Opti-MEM Reduced Serum Medium (1X) mit L-Glutamine	Life Technologies
PBS ohne Ca und Mg (1x)	Life Technologies
Penizillin/Streptomycin (Pen/Strep) (100 x)	Sigma

2. Material und Methoden

2.1.4 Zelllinien

Zelllinie	
RK13	CCLV, Friedrich-Loeffler-Institut
N2a	CLS Cell line service
ScNeuro2a	erhalten von David Westaway; Centre for Prions and Protein folding diseases, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Kanada

2.1.5 Enzyme

Enzym	Hersteller
Antarctic Phosphatase	NEB
PNGaseF	NEB
Proteinase K	NEB
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	NEB
Restriktionsenzyme	NEB
T4 DNA-Ligase	Life Technologies

2.1.6 Kits

Name des Kits	
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Scientific
GeneJET Plasmid Maxiprep Kit	Thermo Scientific
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific
Lipofectamine Transfection Kit	Life Technologies
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
TACS MTT Cell Proliferation Assay Kit	Trevigen

2.1.7 Primer

PCR-Primer	
Name	Sequenz (5'-->3')
MoPrP-Xho-Vektor	CTCGAGCCTTCCTGCTTGT
NhGLuc-PrP	CGTCAGATCCGCTAGCCACC ATGAAGCCCACCGAGAACAAC
NhGLuc-PrP-ChGLuc	TCCGCTAGCATGAAGCCCACC

Sequenzier-Primer	
Name	Sequenz (5'-->3')
CMV-fwd-Primer	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
Seq_Primer Ch-NhGluc Nr.1	ACAATGGCGAACCTTGGC
Seq_Primer Ch-NhGLuc Nr.2	ATGTGGACTGATGTCGGCC
Seq_Primer Ch-NhGLuc Nr.3	TGGAGCAGATGTGCGTCAC
Seq_Primer hGLuc Nr.1	TTCAACATCGTGGCCGTG
Seq_Primer hGLuc Nr.2	GCCCATGGAGCAGTTCATC
Seq_Primer hGLuc Nr.3	TTGGAATAAGGCCGGTGTG
Seq_Primer IRES Ende	GTGCCACGTTGTGAGTTGG

2. Material und Methoden

Seq_Primer IRES Start	TGCACGCCCAAGATGAAG
Seq_Primer Nh-Ch_CTerm	TTTCAGGTTTCAGGGGGAGG
Seq_Primer Nh-Ch_N-Term	CCGTGCGACTGCAGAATTCCG
Seq_Primer NhGLuc Nr.1	CATGGCGAACCTTGGCTAC
Seq_Primer NhGLuc Nr.2	ACCTCAAGCATGTGGCAGG
Seq_Primer NhGLuc Nr.3	TGAAGATGATGGAGCGCG
Seq_Primer IRES bis ChGLUC	GCTGAAGGATGCCCAAGAAG
Seq_Primer pIRES_PrP Nr.1	TGGCGAACCTTGGCTACTG
Seq_Primer pIRES_PrP Nr.2	ACCTCAAGCATGTGGCAGG
Seq_Primer pIRES_PrP Nr.3	TGGAGCAGATGTGCGTCAC

2.1.8 Antikörper

Primäre Antikörper	Hersteller	Verwendung/Verdünnung
anti CD230 / PrP C-term [EP1802Y]	Acris	Biolumineszenzuntersuchung 1:50
Prion Protein MoAb (BAR-236)	IBL	Biolumineszenzuntersuchung 1:50
Prion Protein MoAb (SAF-34)	Bertin	Biolumineszenzuntersuchung 1:50; Zellfärbung 1:2000
Prion Protein MoAb SAF-61	Bertin	Biolumineszenzuntersuchung 1:50
Prion Protein MoAb (SHA-31)	IBL	Biolumineszenzuntersuchung 1:50; WB 1:2000
Prion Protein MoAb (BAR-236)	IBL	Biolumineszenzuntersuchung 1:50
Prion Protein MoAb (SAF-32)	IBL	Biolumineszenzuntersuchung 1:50 WB; 1:2000
Prion Protein MoAb (SAF-83)	IBL	Biolumineszenzuntersuchung 1:50
Prion (6D11) Monoclonal Antibody,	Biozol	Biolumineszenzuntersuchung 1:50
Anti-GLuc Antibody	New England Biolabs	WB 1:2000
Beta-Tubulin Loading Control mAb	Fisher Scientific	WB 1:2000
Mouse Immunoglobulin (IgG)	Sigma	Biolumineszenzuntersuchung 1:50

Sekundäre Antikörper	Hersteller	Verwendung/Verdünnung
IRDye 680LT Donkey anti-Mouse IgG (H + L), 0,5 mg	LI-COR	WB; 1:10000
IRDye 680LT Donkey anti-rabbit IgG (H + L), 0,5 mg	LI-COR	WB; 1:10000
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse	Life Technologies	WB; 1:10000
goat anti-mouse IgG, F(ab') ₂ -APC	Santa Cruz	Durchflusszytometrie: 1:50

2.1.9 Pufferzusammensetzung

Puffer
Lysepuffer
10 mM Tris/HCl (pH 7,4)
150 mM NaCl
0,5% Deoxycholate (w/v)
0,5% Triton X-100 (v/v)
ad dH ₂ O
Transferpuffer
0,2 M Tris-HCl (pH 8,8)
1,9 M Glycin
10% Methanol (v/v)
0,1% SDS (w/v)
ad dH ₂ O

2. Material und Methoden

Stripping Puffer (pH 2)
100 mM Glycin
3% SDS (w/v)
0,1% Tween 20 (v/v)
ad 1x TBS
Färbepuffer (Durchflusszytometrie)
2 mM EDTA
5% FBS (fetal bovine serum) (v/v)
ad 1x PBS
Binding Puffer (Durchflusszytometrie)
100 mM HEPES/NaOH (pH 7,4)
1,4 M NaCl
25 mM CaCl ₂
ad dH ₂ O

2.1.10 Lösungen

Lösung
Blockierlösung (Western Blot)
5% Milchpulver (w/v)
alternativ 5% BSA (w/v)
0,1% Tween 20 (v/v)
ad 1x TBS
Blockierlösung (Zellfärbung)
5% normal goat serum (v/v)
2% BSA (w/v)
1x PBS
ad dH ₂ O
PFA-Lösung (Zellfärbung)
4% PFA (v/v)
1x PBS
ad dH ₂ O
Antikörperverdünnungslösung
2% normal goat serum (v/v)
1% BSA (w/v)
1x PBS
ad dH ₂ O
Coelenterazin-Arbeitslösung
D-MEM/F-12 (1X)
40 µM Coelenterazin
Coelenterazin-Stammlösung
Methanol
1,18 mM Coelenterazin

2. Material und Methoden

2.1.11 Chemikalien und Reagenzien

Materialname	Hersteller
10x PBS	Life Technologies
Ampicillin, steril	Merck Bioscience
Annexin-V-FITC	Beckman Coulter
Antarctic Phosphatase Reaction Buffer (10x)	NEB
Aqua-Poly/Mount	Polysciences Inc.
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
CaCl ₂	Sigma
Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder	LI-COR Biosciences
Coelenterazine, nativ	Biosynth
CutSmart Buffer (10x)	NEB
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochlorid)	VWR
Deoxycholate	Sigma
DNA Gel Loading Dye (6x)	Thermo Scientific
dNTPs	NEB
EDTA	Applied biosystems
Ethanol 96% vergällt	Roth
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec
Fetales Rinderserum (FBS)	Life Technologies
Forene	abbvie
Formalin	Sigma
GelRed/GelGreen Nucleic Acid Gel Stain	VWR
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific
Geneticin (G418)	Life Technologies
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
HCl	Sigma
HEPES/NaOH	Sigma
Isopropanol	Sigma
Kanamycin	Biomol
LB-Agar (Luria/Miller)	Roth
Methanol	Sigma
Milchpulver, Blotting Grade	Roth
NaCl	VWR
NaOH	Sigma
Normales Ziegenserum	Life Technologies
NuPAGE Antioxidant	Life Technologies
Probenpuffer (NuPAGE LDS Sample Buffer (4x))	Life Technologies
Laufpuffer (NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x))	Life Technologies
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Fisher Scientific
PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid	AppliChem
Q5 Polymerase Reaction Buffer (5x)	NEB
Qunacrine Dihydrochlorid	Sigma
SDS	Sigma
SeaKem GTG Agarose	Biozym
SOC Medium	Invitrogen
T4 DNA-Ligase Reaction Buffer (5x)	Invitrogen
Tris/HCl	Invitrogen
TRITON X-100	Sigma
Trizma®base	Sigma
Trypanblau	Invitrogen
Trypsin (TrypLM™ Express)	Life Technologies

2. Material und Methoden

Tween 20

MP Biomedicals

2.1.12 Software

Computerprogramm	Hersteller
Excel 2008	Microsoft
FlowJo 6.8	Tree Star
ImageJ1	NIH
Photoshop CS5	Adobe
Word 2011	Microsoft
Vector NTI	Thermo Scientific
SPSS	IBM SPSS Statistics
ZEN Imaging Software	Zeiss
Origen 6.1	OrigenLab

2. Material und Methoden

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung von RK13- und N2a-Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer S2-Werkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. RK13- sowie N2a Zellen wurden in DMEM High Glucose kultiviert, dem zusätzlich 10% FBS und 1% Penizilin/Streptomycin zugesetzt wurden. Ein Mediumwechsel, bei dem $\frac{2}{3}$ des Mediums ausgetauscht wurde, fand alle 3-4 Tage statt. Um die Zellen auszudünnen, wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 10 mL auf 37°C vorgewärmten PBS gewaschen. Anschließend wurden die adhärenenten RK13-Zellen mit 2 mL TrypLM für 5 min bei 37°C inkubiert. Um N2a Zellen von der Zellkulturflasche abzulösen und sie in 15 mL Falcon-Röhrchen zu überführen, war es ausreichend, die Zellen mit 10 mL Medium vorsichtig abzuspülen. Die RK13-Zellen konnten nach der Trypsinbehandlung mit 8 mL Medium abgewaschen und ebenfalls in 15 mL Falcon-Röhrchen überführt werden. Die Zellsuspension wurde im Anschluss für 5 min bei 300 x g (RT) zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 1 mL Medium resuspendiert. Je nach anschließender Verwendung wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 bis 1:100 in neue Zellkulturflaschen oder- platten ausgesät.

2.2.1.2 Transfektion der RK13-Zellen

Für die Transfektion von Plasmid-DNA in RK13-Zellen wurden 100.000 Zellen pro Well 24 Stunden vor der Transfektion in eine 6 Wellplatte ausgesät. Als Medium wurde „Opti-MEM-Reduced Serum Medium“ verwendet, auf Antibiotika wurde verzichtet. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurden 2 µg Plasmid-DNA pro Well eingesetzt. Drei Stunden sowie 24 Stunden nach der Transfektion fand ein kompletter Austausch des Mediums statt. 48 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium durch DMEM high Glucose mit 1% Pen/Strep und 700 µg/mL G418 ersetzt. Nach zwei bis drei Tagen Selektion durch die G418-Behandlung konnte ein vermehrtes Absterben der Zellen beobachtet werden. Zwei bis drei Wochen nach Beginn der Selektion der transfizierten Zellen wurden diese mittels der Durchflusszytometrie (engl. Fluorescence-activated cell sorting, FACS) entsprechend der Stärke ihrer Proteinexpression sortiert. Die G418-

2. Material und Methoden

Konzentration wurde während der Dauer der Kultivierung konstant bei 700 µg/mL gehalten.

2.2.2 Durchflusszytometrie

Als Vorbereitung auf die Durchflusszytometrie wurden die Zellen mittels Trypsinbehandlung vom Zellkulturgefäß abgelöst, zentrifugiert und in Färbe-puffer resuspendiert, dabei wurde eine Zellkonzentration von 4×10^6 Zellen pro mL nicht überschritten. Nach Anfärbung der Zellen mit dem PrP-spezifischen Antikörper SAF32, dem entsprechenden APC-gekoppelten Sekundäantikörper sowie DAPI, welches den Zellkern anfärbte, wurden die Zellen mit Hilfe des FACSAria III Cell Sorters entsprechend der Stärke ihrer Expression bzw. Färbung sortiert. Für die weitere Analyse der Daten wurde das Programm „FlowJo“ benutzt.

2.2.3 Immunozytochemische Zellfärbung

Für die Immunozytochemische Färbung wurden die Zellen für 10 min auf Eis mit 4% PFA fixiert und anschließend zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Behandlung mit der Blockierlösung dauerte 60 min, die Inkubation mit den jeweiligen spezifischen Primäantikörpern geschah über Nacht bei 4°C. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal je 5 min mit kaltem PBS gewaschen, bevor die Sekundäantikörper für 60 min bei RT und zuletzt die DAPI-Färbelösung für 3 min bei RT zugegeben wurden. Nach einem letzten Waschschrift, bei dem zweimal je 5 min mit PBS gewaschen wurde, wurden die Zellen mithilfe eines Tropfens Aqua-Poly/Mount auf Objektträgern fixiert und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *ZEN Imaging Software* von Zeiss.

2.2.4 MTT-Test

Der MTT-Test misst die metabolische Aktivität von Zellen und beruht auf der Reduktion des Tetrazoliumsalzes, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) in unlösliche Formazankristalle. Diese Reaktion findet in den Mitochondrien intakter

2. Material und Methoden

Zellen statt. Die Absorption der entstandenen Formazankristalle kann spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 550-600 nm bestimmt und anschließend quantifiziert werden. Somit kann der Test als Maß für die Viabilität der eingesetzten Zellen dienen. Um den Einfluss von Antikörpern, Quinacrine oder der im Wirkstoff-Screening (vgl 2.7.4) verwendeten Wirkstoffe auf die Viabilität von RK13+PrP-DC und ScN2a Zellen zu testen, wurden diese mit D-MEM/F-12 ohne Phenolrot verdünnt. Zuvor wurden in eine 96-Wellplatte mit durchsichtigem Boden, je nach geplanter Inkubationszeit, 1000 bis 5000 Zellen eingesät. Die vorverdünnten Chemikalien, bzw. Antikörper wurden 2-4 Stunden später zu den Zellen gegeben, wobei das Endvolumen 100 µL betrug. Die Zellen wurden mit Deckel 24 Stunden bis 5 Tage im Brutschrank inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 10 µL der MTT Lösung. Mit dieser wurden die Zellen weitere 3-4 Stunden bei 37°C inkubiert, die Bildung der violetten Formazankristalle wurde regelmäßig unter dem Mikroskop überprüft. Nach maximal 4 Stunden wurden pro Well 100 µL Lösungsdetergenz hinzugefügt und durch Pipettieren mit der Zellsuspension vermischt, um eine Lösung der Formazankristalle sicherzustellen. Sechzig Minuten nach der Zugabe wurde die Absorption mit einem Plattenlesegerät (Fluostar Omega) bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen wobei die Referenzwellenlänge 650 nm betrug.

2.2.5. Klonierung und PCR

Bei den im Rahmen dieser Arbeit klonierten Konstrukten, welche für die Transfektion in RK13 Zellen genutzt wurden, wurde von einer Gensynthese (Invitrogen) ausgegangen. Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde die DNA vervielfältigt (Mullis et al., 1986). Tabelle 2.1 zeigt die Bedingungen des verwendeten PCR Programms, wobei die Annealing-Temperatur und die Dauer der Elongation entsprechend der Primer und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Bereichs angepasst wurde.

2. Material und Methoden

Tab. 2.1:PCR-Bedingungen des verwendeten Programms

	Temperatur [°C]	Zeit
Initiale Denaturierung	98	3 min
25 Zyklen		
Denaturierung	98	30 sec
<i>Annealing</i>		30 sec
Elongation	72	
Finale Elongation	72	10 min
Lagerung	4	∞

Die Aufreinigung, die Gelelektrophorese, der enzymatische Restriktionsverdau und die Ligation der DNA-Fragmente in einen pIRES2 DsRed-Express2_Vektor wurden entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt, ebenso wie die Transformation in chemisch kompetente *E.coli* Bakterien (MAX Efficiency DH10B). Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger et al., 1977) und wurde von der Firma GATC in Konstanz durchgeführt.

2.2.6. Western Blot

Um Zelllysate für die Verwendung im Western Blot herzustellen wurden die Zellen 5 bis 10 min mit Lysepuffer lysiert. Das Lysat wurde danach 5 min lang bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert, um Zelldebris vom Lysat zu trennen und aus der Probe entfernen zu können. Proteinkonzentrationen wurden mittels der Reaktion der Bicinchoninsäure (*engl.* bicinchoninic acid, BCA) nach Angaben des Herstellers des Pierce BCA Protein Assay Kits bestimmt. Die Lysate wurden entweder direkt verwendet oder bei -20°C gelagert. Der Auftrennung der Lysate im Western Blot ging ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 100.000 x g und 4 °C, für 60 min voraus, um die Proteine zu sedimentieren. Das Proteinpellet wurde in Lysepuffer, Probe- und Laufpuffer entsprechend der Angaben des Herstellers resuspendiert und 10 min bei 70°C denaturiert. Die aufbereiteten Proben wurden entweder direkt auf das Gel aufgetragen oder bei -20°C gelagert.

Es wurden NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Midi Gele mit 12 Geltaschen in Kombination mit XCell 4 Surelock Midi-Cell Runner Kammern (Invitrogen) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde bei 150 V für 70-80 min durchgeführt.

2. Material und Methoden

Die separierten Proteine wurden für 80 min vom Gel auf eine zuvor mit Methanol aktivierte PVDF Membran mit 0,45 µm Porengröße geblottet, wobei die Stromstärke je nach Größe des Gels variierte und 0,8 mA/cm² betrug. Anschließend wurde die Membran 60 min bei RT in Blockier-Puffer inkubiert und über Nacht bei 4°C mit den entsprechenden Primärantikörpern, verdünnt in Blockierpuffer, in einem rotierenden Falcon-Röhrchen inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei Wasch-Schritte mit TBS für jeweils 10 min bei RT und die Inkubation mit dem jeweiligen Infrarotfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper für 60 min bei RT. Für die Entwicklung des Blots wurde das Odyssey Infrared Imaging System (Licor) genutzt.

2.2.7 Enzymatischer Verdau von Zelllysaten oder Hirnhomogenaten

2.2.7.1 Proteinase K (PK)-Verdau

Um Zelllysate oder Hirnhomogenate auf PK-resistentes PrP zu testen, wurde ein PK-Verdau durchgeführt. Dafür wurde die Proteinkonzentration des Materials mittels BCA-Reaktion nach Angaben des Herstellers bestimmt. Anschließend wurde das Enzym im Verhältnis 1:50 zur Gesamtproteinmenge eingesetzt und 60 min bei 37°C im Schüttler bei 300 rpm inkubiert. Die PK-Inaktivierung erfolgte durch Zugabe von Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) auf eine Endkonzentration von 2 mM. Danach wurden die Proben weitere 5 min bei RT inkubiert und in der Ultrazentrifuge bei 100.000 x g für 60 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend konnten die Proteinpellets resuspendiert, mittels Gelelektrophorese hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt und im Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern behandelt werden (siehe Abschnitt 2.5).

2.2.7.2 Peptid:N-Glykosidase F (PNGaseF)-Behandlung

Die Struktur des Prionproteins weist zwei Stellen für eine posttranslationale Glykosylierung auf. Um vergleichen zu können, ob das Fusionsprodukt aus PrP- und den beiden hGLuc-Hälften von transfizierten RK13 Zellen exprimiert wurde und glykosyliert vorlag, wurden entsprechende Zelllysate mit PNGase F behandelt. Dabei deglykosyliert PNGase F Glykoproteine indem es die Zuckerketten abspaltet. Abweichend von den Angaben des Herstellers wurden 300 µg Gesamtprotein verwendet und die

2. Material und Methoden

Puffervolumina und Enzymmengen dementsprechend angepasst. Nach der Behandlung wurden die Proben in der Ultrazentrifuge bei 100.000 x g für 60 min bei 4°C zentrifugiert und anschließend im Western Blot aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.5)

2.2.8 Biolumineszenzuntersuchung

Für die Biolumineszenzuntersuchung wurden je nach Versuch nicht transfizierte sowie transfizierte RK13 Zellen in eine 96-Wellplatte vom Typ *half-area* eingesät, dabei wurden bis zu 5000 Zellen pro mL verwendet. Abhängig vom durchzuführenden Versuch wurden vor dem Aussähen der Zellen verschiedene Antikörper, Hirnhomogenate oder Chemikalien in unterschiedlichen Konzentrationen in die Wells vorgelegt. Das Gesamtvolumen pro Well betrug

50 µL, als Medium wurde D-MEM/F-12 ohne Phenolrot eingesetzt. Die Platten wurden mit Deckel bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Unmittelbar vor Beginn des Testverfahrens wurde das zu 1,18 mM in Methanol gelöste Substrat Coelenterazine mit D-MEM/F-12 ohne Phenolrot auf eine Arbeitskonzentration von 40 µM verdünnt. Die Messung der Flashkinetik wurde mit dem Fluostar Omega Plattenlesegerät durchgeführt. Für jedes einzelne Well wurde nach Zugabe von 100 µL Substrat sofort die Biolumineszenz über ein Intervall von 10 ms gemessen. So wurde fortgefahren, bis alle Wells gemessen wurden, einschließlich der Wells, die nur Coelenterazine, bzw. Zellkulturmedium und Coelenterazine enthielten. Für die Auswertung wurden die Summen aller Messintervalle einbezogen. Die Auswertung erfolgte mit Excel und SPSS.

2.2.8.1 Biolumineszenzuntersuchung mit PrP-spezifischen Antikörpern

Um den Effekt von PrP-spezifischen Antikörpern, die gegen verschiedene Domänen von PrP gerichtet sind, auf die PrP-Dimerisierung zu untersuchen, wurde die Biolumineszenzuntersuchung wie in Abschnitt 2.2.8 beschrieben, vorbereitet. Zusätzlich zu den RK13+PrP-DC-Zellen wurden pro Well 10 µg/mL der PrP-Antikörper SAF32, SAF34, 6D11, SAF61, SAF83, SHA31, BAR236, EP1802Y, oder Maus-Immunglobulin (IgG) als Negativkontrolle vorgelegt. Die Zellen wurden eine bis 48 Stunden mit den Antikörpern inkubiert, anschließend wurde die Biolumineszenzuntersuchung durchgeführt

2. Material und Methoden

(vgl.2.2.8). In einem weiteren Versuch wurden die Antikörper SAF83 und SHA31 in Konzentrationen von 0,1, 0,5, 1,0 und 10 µg/mL eingesetzt und 24 Stunden inkubiert, bevor die Untersuchung durchgeführt wurde (vgl. 2.2.8)

2.2.8.2 Akute Infektion der RK13+PrP-DC Zellen mit verschiedenen Prionstämmen

Um RK13+PrP-DC-Zellen zu infizieren und anschließend die Biolumineszenz zu messen, wurden 5000 Zellen/mL in eine 96-Wellplatte vom Typ *half-area* eingesät. In die entsprechenden Wells wurden zuvor 2,5 µL 10%iges Hirnhomogenat (in PBS) der mausadaptierten Prionstämme RML, 22L, 87V, 22A, ME7 und 79A vorgelegt. Als Negativ-Kontrolle diente 10%iges in PBS verdünntes Hirnhomogenat der C56BL/6J-Mauslinie, bzw. 2,5 µL reines PBS als unbehandelte Kontrolle. Die Zellen, die mit Prionen des RML-Stammes infiziert wurden, wurden einen, drei und fünf Tage im Brutschrank inkubiert, bevor die Messung der Biolumineszenz stattfand (vgl. 2.7). Wegen der geringen zur Verfügung stehenden Menge an Hirnhomogenat der 22L, 87V, 22A, ME7 und 79A Prion-Stämme wurden mit diesen Stämmen nur Versuche mit fünf-tägiger Inkubationszeit durchgeführt. Auch Versuche, in denen zusätzlich zum Hirnhomogenat der Anti-Prion-Wirkstoff Quinacrine (QA) zum Einsatz kam (vgl. Abschnitt 2.7.1), wurden nur mit Prionen des RML-Stammes ausgeführt.

2.2.8.3 Persistente Infektion der RK13+PrP-DC-Zellen mit RML-Prionen

Neben den akut infizierten RK13+PrP-DC-Zellen, die bis zum Messen der Biolumineszenz mit dem infektiösem Hirnhomogenat in Kontakt waren (vgl. Abschnitt 2.2.8.2), wurden Klone dieser Zelllinie verwendet, die stabil infiziert waren. Dazu wurden zunächst 50.000 Zellen/Well in einer 6-Wellplatte mit je 50 µl 10%igem RML-Hirnhomogenat infiziert. Nach fünf Tagen Inkubation wurden die Zellen trypsiniert und in einer Konzentration von 10 Zellen/mL in eine 20 cm Zellkulturschale überführt. Nach drei bis vier Tagen hatten sich einzelne, gut von einander trennbare Zellkolonien gebildet. Diese Einzelkolonien wurden mit Hilfe von sterilen, in Trypsin getränkten Klonieringen (engl. *cloning discs*) in 12, bzw. 6 Wellplatten übertragen. In diesem Format wurden die einzelnen Klone bis zur Durchführung der Biolumineszenzuntersuchung

2. Material und Methoden

kultiviert. Abhängig von der Intensität des Biolumineszenzsignals und dessen Reduktion nach einer Behandlung mit QA, wurden die Klone entweder verworfen oder expandiert und für weitere Untersuchungen genutzt.

2.2.8.4 Wirkstoff-Screening

Insgesamt wurden 2400 Wirkstoffe aus der TocrisScreen-Datenbank und LOPAC (engl. *Library of Pharmacologically Active Compounds*) verwendet. Die Wirkstoffe wurden jeweils in dreifacher Ausführung in die Wells einer 384-Wellplatte vorgelegt, wobei es von jeder Platte zwei Kopien gab. Die Endkonzentration der Wirkstoffe betrug 10 µM. Zur Vorbereitung des Screenings wurden RK13+PrP-DC-Zellen zu den Wirkstoffen gegeben, zusätzlich gab es auf jeder Platte unbehandelte Zellen als interne Kontrolle. Es folgte eine 24 stündige Inkubationszeit. Die Messung des Biolumineszenzsignals erfolgte am EnVision-Plattenlesegerät. Das Gerät injizierte pro Well 65 µL der 40 µM Coelenterazine-Lösung und schüttelte die Platte im Anschluss für zwei Sekunden mit einer Geschwindigkeit von 900 rpm. Das Biolumineszenzsignal wurde danach eine Sekunde lang gemessen. Zur Auswertung der einzelnen Messungen wurde der letzte aufgezeichnete Messwert verwendet.

2.2.9 *In vivo* Versuche

2.2.9.1 Infektion mit Zelllysate und Hirnhomogenat

Für die Infektionen wurden vier bis sechs Wochen alte B6.129S7-Prnp^{tm1Cwe} Tg(Prnp)a20Cwe/CweOrl Mäuse (Synonym: Tga20-Mäuse) verwendet. Diese Mäuse überexprimieren murines *Prnp* sechs- bis siebenfach und ermöglichen den Nachweis selbst geringer Mengen von infektiösen Prionen (Fischer et al, 1996).

Das Zelllysate stammte von RK13+PrP-DC Zellen, bzw. zwei ScRK13+PrP-DC Zellklonen, die zuvor mit RML-Hirnhomogenat infiziert wurden und bei der Biolumineszenzuntersuchung durch ein hohes Signal aufgefallen waren (siehe Abschnitt 2.2.8.3). Die Zellen wurden in einer 10 cm Zellkulturschale kultiviert, bis sie konfluent waren, anschließend dreimal mit kaltem PBS gewaschen, mithilfe eines Spatels von der Zellkulturschale gelöst und in 2 mL PBS aufgenommen. Um die Zellsuspension zu homogenisieren wurde sie mehrmals durch eine Kanüle mit 26 Gauge gesogen.

2. Material und Methoden

Abschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 100000 x g und 4°C für eine Stunde, sodass das entstandene Pellet in 300 µL PBS, dem zusätzlich 5% BSA und 0,5 g/mL zugesetzt wurden, aufgenommen werden konnte.

Sechzehn Tga20 Mäusen wurden jeweils 30 µL des ScRK13+PrP-DC Zelllysates intrazerebral in den linken Parietallappen injiziert. Dafür wurden die Tiere mit 1,5 - 2,0% Isofluran betäubt und 20 – 30 Minuten vor dem Eingriff ihrem Gewicht entsprechend subkutan mit 5 mg/kg Carprofen analgetisch versorgt. Nach der Injektion wurde die Injektionsnadel innerhalb eines Zeitraums von fünf Minuten langsam entfernt, um das Ausfließen des injizierten Lysats zu vermeiden. Als Negativkontrolle wurden sechs Tga20 Mäuse mit Lysat von nicht infizierten RK13+PrP-DC-Zellen in gleicher Weise beimpft. Als Positivkontrolle diente ein 10%iges Hirnhomogenat von RML-infizierten und terminal erkrankten Tieren, welches acht Tga20 Mäusen ebenfalls unter der oben beschriebenen Narkose und analgetischer Versorgung in den linken Parietallappen injiziert wurde.

Alle Versuchsgruppen wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten.

Um das Einsetzen der Erkrankung zu bestimmen, wurden folgende Symptome zugrunde gelegt: Kyphose, Schwierigkeiten bei der Fortbewegung und beim Wiederaufrichten, vermehrtes Laufen im Kreis, dauerhafte Verformung des Schwanzes, reduzierte Fellpflege sowie Lethargie. Sobald ein oder mehrere der genannten Symptome auftraten, spätestens aber ≥ 600 Tage nach der Injektion wurden die Tiere mit einer Inhalationsnarkose mit 1,5 - 2,0% Isofluran betäubt und durch Dekapitation getötet. Die Gehirne wurden entnommen und sagittal geteilt. Eine Hälfte wurde für immunhistologische Untersuchungen bei 4°C in Formalin gelagert, die andere Hälfte für eine spätere Analyse im Western-Blot bei -80°C aufbewahrt.

2.2.9.2 Herstellung der Hirnhomogenate

Zur Herstellung von Hirnhomogenaten wurden C56BL/6J- und Tga20 Mäusen das Gehirn entnommen und eine Hirnhälfte in 2 mL Soft tissue homogenizing Röhrchen überführt. Die Probe wurde anschließend mit kaltem PBS aufgefüllt und mithilfe eines Kugelhomogenisators homogenisiert, sodass ein 10%iges Hirnhomogenat entstand. Das Homogenat und die andere Hälfte des Gehirns wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.10 Auswertung

2.2.10.1 Statistik

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der erhobenen Daten wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel bestimmt. Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS Statistics genutzt, dabei wurde, entsprechend der Daten, entweder der Mann-Whitney-U-Test oder der Kruskal-Wallis Rang-Summen-Test angewendet. Der jeweilige statistische Test und die Anzahl der durchgeführten Versuche (n) sind in der Abbildungslegende angegeben. Es wurden folgende Signifikanzniveaus festgelegt: ***p < 0,001, **p < 0,01 und

* p < 0,05. Nicht signifikante Ergebnisse wurden mit „n.s.“ gekennzeichnet.

2.2.10.2 Western Blot Analyse und Bestimmung der EC₅₀ von JTC-801

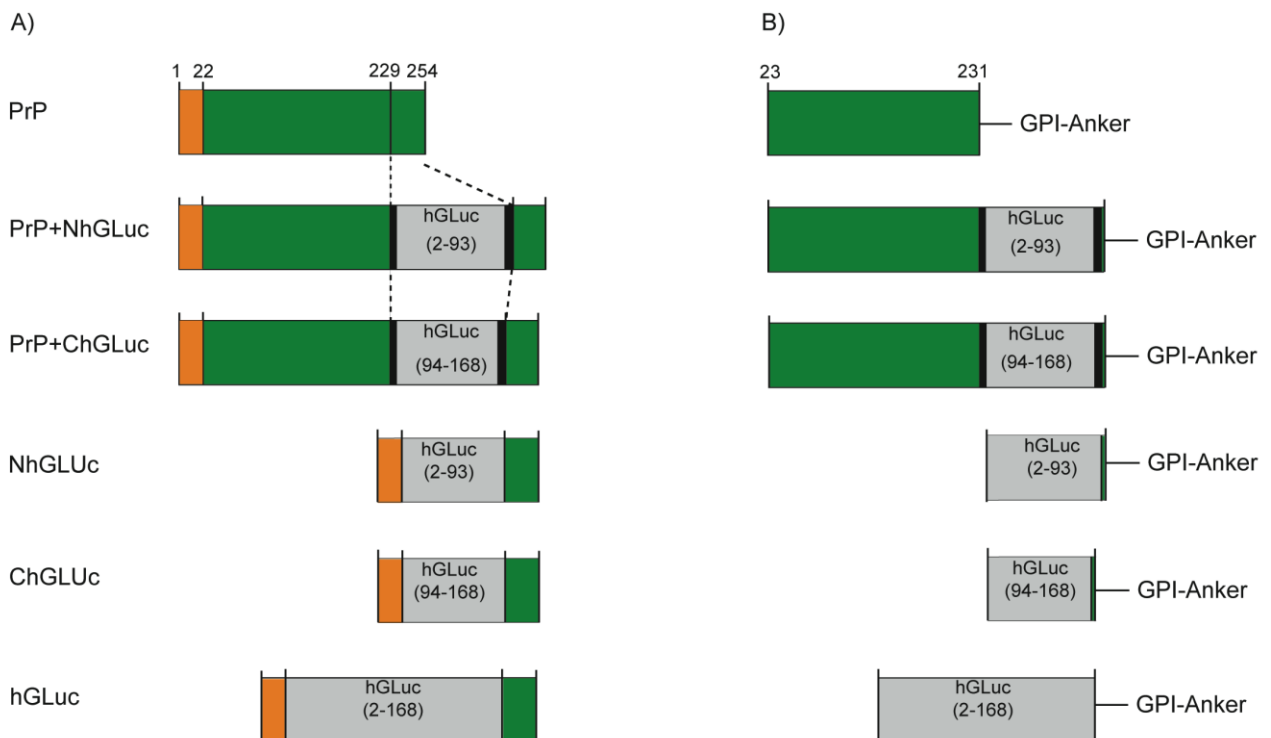
Zur Quantifizierung der Signalintensitäten von Banden im Western Blot wurde das Programm „Image Studio“ von LiCor verwendet. Zur Bestimmung der EC₅₀ von JTC-801 wurde zusätzlich das Graphikprogramm Origin (OriginLab, Origin 6.1) genutzt und die Signalintensität der PK-resistenten Western Blot-Banden relativ zur unbehandelten Kontrolle gegen die JTC-801 Konzentration aufgetragen. Die Werte dienten als Vorlage für eine sigmoidale Kurve, mit deren Gleichung die EC₅₀ Konzentration von JTC-801 bestimmt wurde.

3. Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung der Fusionskonstrukte

Zur Untersuchung der PrP-Dimerisierung wurden die in Abb 3.1 dargestellten Fusionskonstrukte generiert. Dabei handelt es sich um die murine Vollängenversion von PrP^C und PrP^C fusioniert mit der N-terminalen Hälfte von hGLuc (NhGLuc, AS 2-93) oder mit der C-terminale Hälfte (ChGLuc, AS 94-168), jeweils flankiert von zwei kurzen Linker-Sequenzen (4G2S) und der C-terminalen GPI-Signalsequenz. Im folgenden Text wird die Bezeichnung PrP-NhGLuc PrP-ChGLuc durch PrP-DC (PrP-double construct) abgekürzt. Als Kontrolle wurde ein Konstrukt aus der N- und C-terminalen Hälfte von hGLuc (NhGLuc; ChGLuc) genutzt, das jeweils von der N-terminalen PrP-Signalsequenz und der GPI-Signalsequenz flankiert war, jedoch keine PrP-Sequenz enthielt. Im folgenden Text ist dieses Konstrukt als DC-Kontrolle bezeichnet. Eine weitere Kontrolle stellte die Vollängenversion von hGLuc dar, die ebenfalls von der N-terminalen PrP-Signalsequenz und der GPI-Signalsequenz flankiert wurde.



3. Ergebnisse

Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Fusionskonstrukte

Dargestellt sind (von oben nach unten) die Proteine PrP^C, PrP+NhGLuc, PrP+ChGLuc, NhGLuc, ChGLuc, und hGLuc auf mRNA-Ebene (A) und Protein-Ebene (B). Die Nummern beziehen sich auf die Aminosäure-Positionen im murinen Prion-Protein (1-254) und verdeutlichen bei den Fusionsproteinen, an welcher Position die N- bzw. die C-terminale Hälfte von hGLuc eingeführt wurde. Als Bindeglied für die Fusion wurde ein flexibler (GGGS)₂-Linker verwendet (schwarzer Balken). An das C-terminale Ende der Fusionsproteine wurde die GPI-Signalsequenz von PrP^C angefügt (AS 230-254). Bei der Prozessierung der Fusionsproteine werden die N- und die C-terminalen Signalsequenzen abgespaltet und der GPI-Anker an Ser231 von PrP^C übertragen.

3.2 Expressionsnachweis von Fusionsproteinen im Western Blot

Lysate von nicht-transfizierten wildtyp RK13-Zellen und stabil transfizierten RK13 Zellen wurden biochemisch im Western Blot bezüglich der Expression der Fusionsproteine zwischen PrP und der hGLuc-Hälften untersucht (Abb. 3.1). Außer den nicht-transfizierten Zellen und den Zellen, die nur mit der Vollängenversion von hGLuc transfiziert wurden, wurden die Lysate auch mit PNGase F behandelt, was eine Deglycosylierung der Proteine bewirkt. Zur Detektion von PrP wurde der PrP-spezifische Antikörper Sha31 verwendet. In der ersten Spur sind keine Banden zu erkennen, da RK13-Zellen kein endogenes PrP exprimieren. Lysate der RK13+PrP-DC-Zellen in Spur 2 zeigen drei Einzelbanden, die die drei Glycosylierungsstufen von PrP darstellen und entsprechend der Größe des Fusionsproteins zwischen 40 und 50 kDa laufen. Nach Behandlung der RK13+PrP-DC-Zelllysate mit PNGase F sind in Spur 3 zwei nahe beieinander liegende Einzelbanden mit 37 und 39 kDa zu sehen, die die unglycosylierte Fraktion von PrP, fusioniert mit dem N- bzw. C-Terminus von hGLuc, darstellen. Die Spuren 4 und 5 zeigen die unbehandelten bzw. mit PNGase F verdauten Lysate der RK13+PrP_N-terminal-Zellen, die nur eine Kopie der PrP-Sequenz, fusioniert mit der N-terminalen hGLuc-Sequenz, besitzen. Auch hier ist das für PrP charakteristische dreifache Bandenmuster zwischen 40 und 50 kDa zu erkennen. Nach der Abspaltung der Zuckerreste durch PNGase F ist in Spur 5 eine Bande bei etwa 39 kDa zu erkennen, die die unglycosylierte PrP-Fraktion, gekoppelt mit der N-terminalen Hälfte von hGLuc, repräsentiert. Ein ähnliches Muster ist auch in den Spuren 6 und 7 zu erkennen; dort wurde RK13+PrP_C-terminal-Zelllysate aufgetragen, deren PrP mit der C-terminalen Hälfte von hGLuc fusioniert ist. Im Vergleich zu Spur 4 ist die obere Bande des Dreierbandenmusters schwächer ausgeprägt und läuft etwas tiefer, wie auch die Einzelbande nach PNGase F-Verdau in Spur 7, die bei etwa 37 kDa läuft. Da das Fusionsprodukt aus PrP und dem C-Terminus von hGLuc 15 Aminosäuren kürzer

3. Ergebnisse

ist als PrP und NhGLuc, ist dieser Größenunterschied im Western Blot zu beobachten. Die letzten drei Spuren zeigen kein Signal, da weder RK13+DC-Kontroll-Zellen, noch RK13+hGLuc-Zellen PrP exprimieren. Die β -Tubulin-Ladekontrolle zeigt, dass auch diese Spuren Protein enthalten.

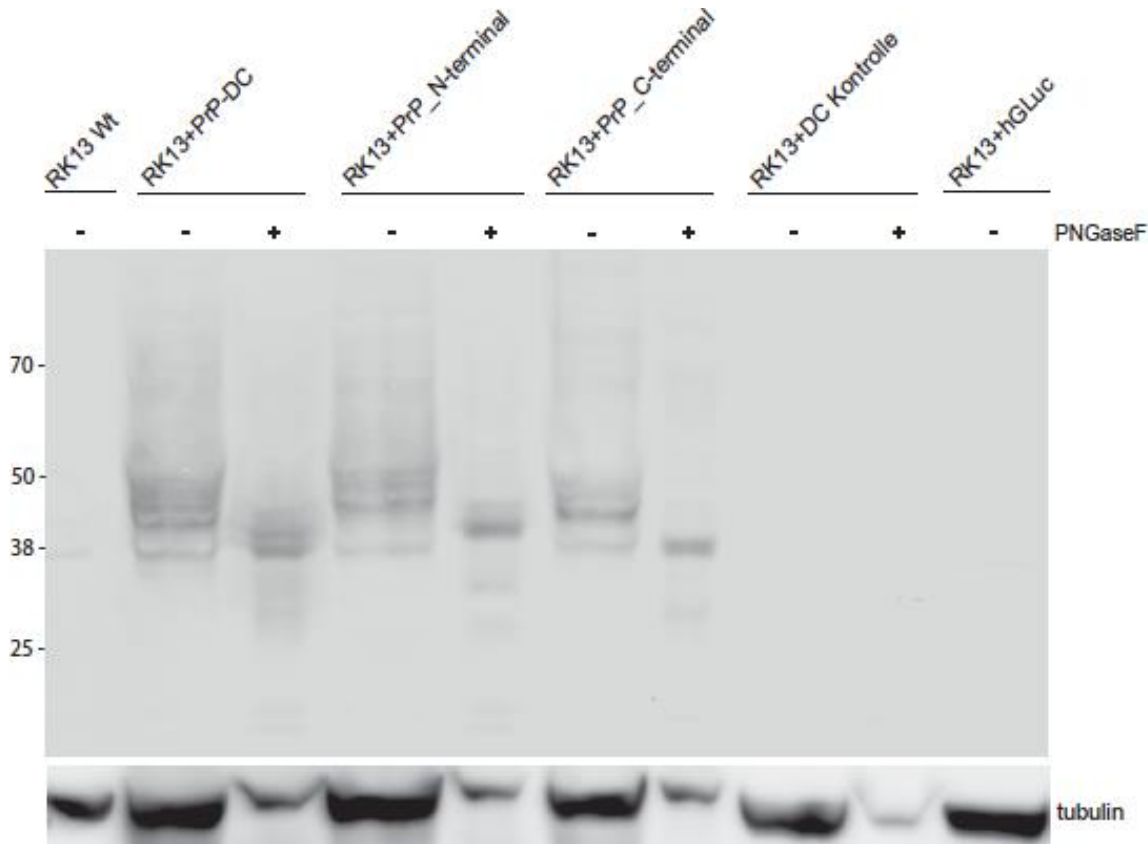


Abb. 3.1: Expressionsnachweis der Fusionsprodukte aus PrP und hGLuc im Western Blot. Im Gegensatz zu wildtyp RK13-Zellen (Spur 1) exprimieren RK13+PrP-DC-Zellen (Spuren 2 und 3), RK13+PrP_N-terminal-Zellen (Spuren 4 und 5), RK13+PrP_C-terminal-Zellen (Spuren 6 und 7) Fusionsproteine zwischen PrP und N- bzw. C-terminalem hGLuc. RK13-DC-Kontrolle-Zellen (Spuren 8 und 9) und RK13+hGLuc-Zellen (Spur 10) exprimieren kein PrP. Verdau mit PNGase F-Verdau zeigt, dass alle PrP-Fusionsproteine glycosyliert sind. Zur Detektion von PrP wurde der PrP-spezifische Antikörper Sha31 eingesetzt, als Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen β -Tubulin. Molekulargewicht in kDa.

Während Abb. 3.1 einen mit dem PrP-spezifischen Antikörper Sha31 gefärbten Western Blot zeigt, ist in Abb. 3.2 derselbe Blot mit Antikörpern gegen Gaussia-Luziferase zu sehen. Auch hier ist in der ersten Spur kein Signal detektierbar, da nicht-transfizierte wildtyp RK13-Zellen keine Luziferase exprimieren. Die Signale in den Spuren 2 und 4 ähneln denen aus Abb. 3.1, da es sich dabei um die Fusionsprodukte aus PrP und hGLuc handelt, die auch von dem Antikörper gegen Gaussia-Luziferase detektiert werden. Daher

3. Ergebnisse

ist auch hier das charakteristische PrP-Dreierbandenmuster zu erkennen. Die Signalintensität ist jedoch schwächer und es sind zusätzlich mehrere unspezifische Banden zwischen 30 kDa und etwa 15 kDa sichtbar, insbesondere bei den PNGase F-verdauten Proben (Spuren 3, 5, 7 und 9). Das Signal in den Spuren 6 und 7 fällt im Vergleich zum mit PrP-Antikörper gefärbten Blot und den Spuren 4 und 5 deutlich schwächer aus, obwohl vergleichbare Mengen Protein geladen wurden. Vorversuche hatten jedoch gezeigt, dass der verwendete polyklonale Antikörper gegen *Gaussia-Luziferase* hauptsächlich den N-Terminus von hGLuc erkennt und den C-Terminus kaum bindet. Die Spuren 8 und 9 zeigen das Signal der einzeln exprimierten hGLuc-Hälften in der RK13+DC-Kontrolle. Da hGLuc im Gegensatz zu PrP nicht glycosyliert wird, führt der PNGaseF-Verdau (Spur 9) hier zu keiner Veränderung des Molekulargewichts. Dies spiegelt sich in der vergleichbaren Größe der Bandenmuster in den beiden Spuren wider. Die letzte Spur stellt die Volllängeversion von hGLuc dar, die etwa 19 kDa groß ist.

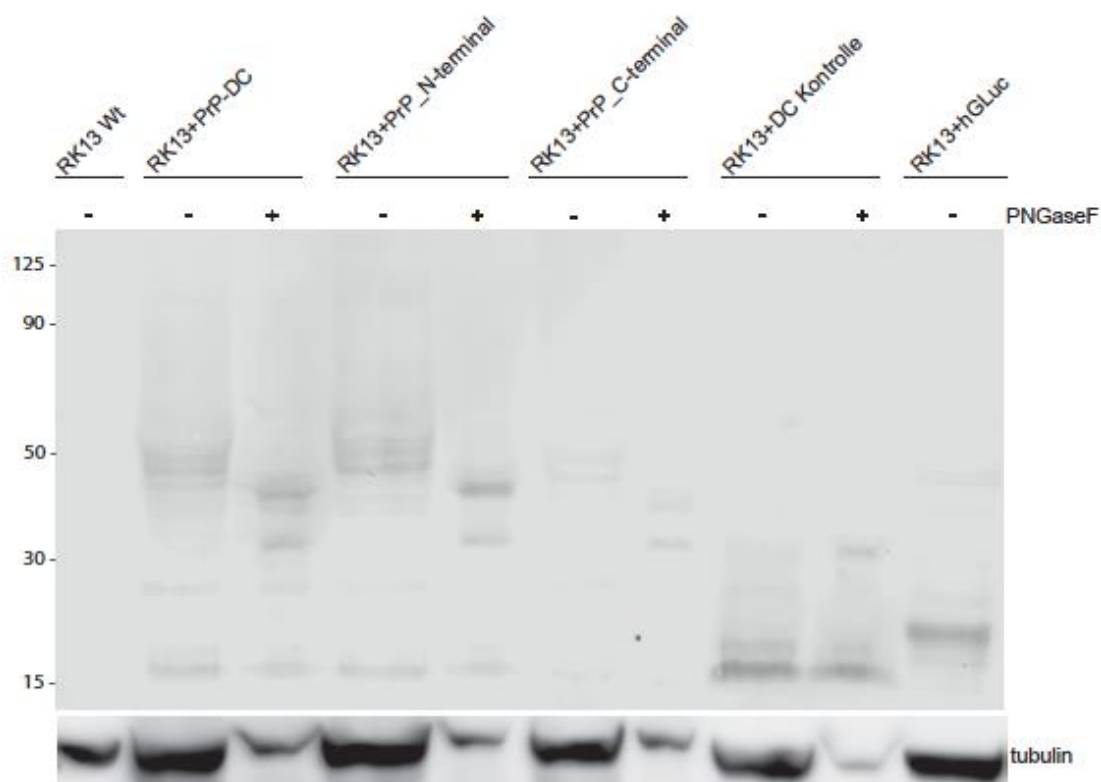


Abb. 3.2: Expressionsnachweis der Fusionsprodukte aus PrP und hGLuc im Western Blot. Im Gegensatz zu wildtyp RK13-Zellen (Spur 1) exprimieren RK13+PrP-DC-Zellen (Spuren 2 und 3), RK13+PrP_N-terminal-Zellen (Spuren 4 und 5), RK13+PrP_C-terminal-Zellen (Spuren 6 und 7) Fusionsproteine zwischen PrP und N- bzw. C-terminalem hGLuc. RK13-DC-Kontrolle-Zellen (Spuren 8 und 9) und RK13+hGLuc-Zellen (Spur 10) exprimieren kein PrP. Verdau mit PNGase F-Verdau zeigt, dass alle

3. Ergebnisse

PrP-Fusionsproteine glycosyliert sind. Zur Detektion von hGLuc wurde der hGLuc-spezifische Antikörper eingesetzt, als Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen β -Tubulin. Molekulargewicht in kDa.

Somit zeigen die Western Blots in Abb. 3.1 und 3.2, dass RK13-Zellen, die mit den PrP-Fusionskonstrukt transfiziert wurden, dieses in detektierbaren Mengen exprimieren. Das für PrP charakteristische Dreierbandenmuster zeigt zusätzlich, dass das Protein posttranslational zweifach glycosyliert wird. Diese Modifikation kann durch Behandlung mit PNGase F aufgehoben werden.

3.3 Expressionsnachweis mittels Immunzytochemie

Um zusätzlich zur Western Blot-Analyse die Expression und Lokalisation von PrP in den transfizierten RK13 -Zellen zu zeigen, wurden diese immunozytochemisch angefärbt. Der Zellfärbung ging eine drei bis vier tägige Kultivierung der entsprechenden Zellen auf Deckgläsern voraus. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit PrP-spezifischen Antikörpern angefärbt. In Abb. 3.3 sind PrP in grün und die Zellkerne in blau dargestellt. Das PrP-Signal kann vermehrt an der Zelloberfläche detektiert werden. Dies zeigt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die in Abb. 3.1 dargestellt sind, dass PrP in transfizierten RK13 -Zellen exprimiert wird und an der Zelloberfläche lokalisiert ist. Auch innerhalb der Zellen ist angefärbtes PrP erkennbar, dabei handelt es sich um neu synthetisiertes Protein, welches modifiziert zur Zelloberfläche transportiert wird, wo es durch den GPI-Anker angeheftet ist.

3. Ergebnisse

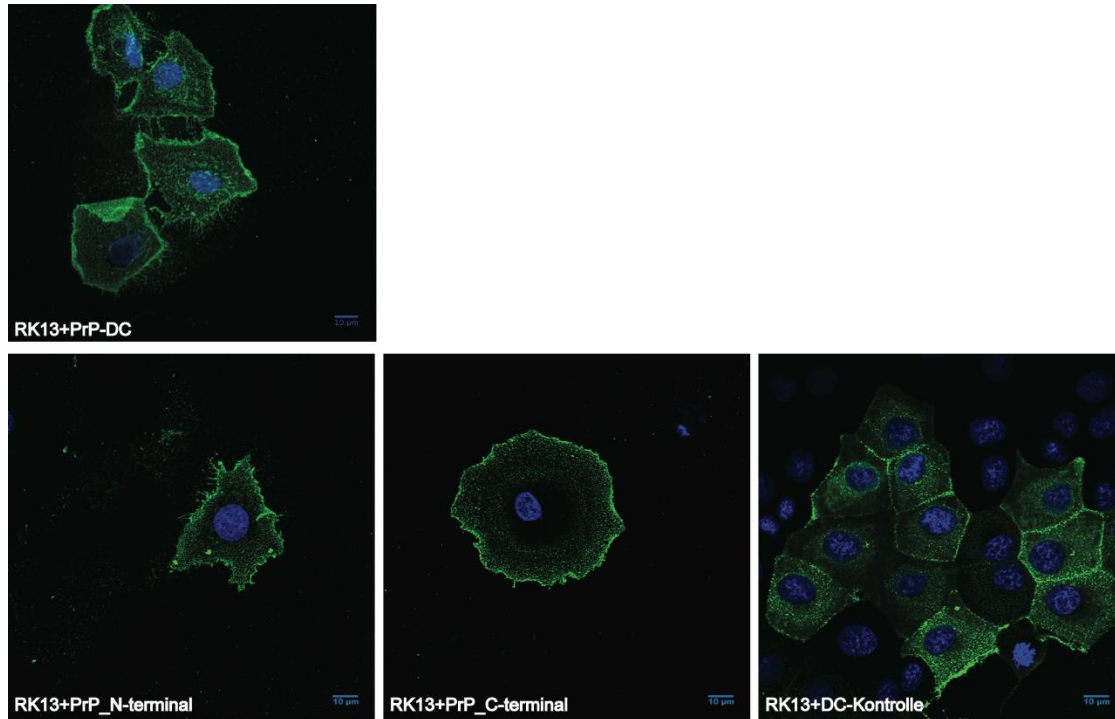


Abb. 3.3: Immunocytochemische Färbung der RK13+PrP-DC-, RK13+PrP_N-terminal-, RK13+PrP_C-terminal und RK13+DC-Kontroll-Zellen. PrP ist in grün dargestellt vermehrt an der Zelloberfläche lokalisiert, wo es durch einen GPI-Anker angeheftet ist. Bei angefärbtem PrP innerhalb der Zellen handelt es sich um neu synthetisiertes Protein. Der Zellkern ist mit DAPI gefärbt und in blau dargestellt. Maßstabsskala = 10 µm.

3.4. Nachweis der PrP-Dimerisierung in RK13+PrP-DC-Zellen mittels Biolumineszenzassay

Nach der Transfektion der RK13-Zellen mit dem Fusionskonstrukt aus PrP und dem C- bzw. N-terminalen Teil von hGLuc und der Kontrolle, dessen Expression im Western Blot sowie durch immunocytochemische Färbung nachgewiesen wurde, wurden die Zellen im Biolumineszenzassay eingesetzt. Mit Hilfe dieses Assays konnte die Dimerisierung des Prionproteins an der Zelloberfläche von lebenden RK13-Zellen gezeigt werden. Abb. 3.4 zeigt das Biolumineszenzsignal der RK13+PrP-DC-Zellen und den Kontrollen, die jeweils nur eine PrP-Kopie, entweder mit der N- oder C-terminalen Hälfte von hGLuc oder nur die geteilten hGLuc-Hälften ohne PrP exprimierten. Zusätzlich ist das Biolumineszenzsignal der RK13-Zellen mit Vollängen hGLuc zu sehen. Die Messung erfolgte 24 Stunden nach der Aussaat der Zellen. Das Biolumineszenzsignal der RK13+PrP-DC-Zellen mit über 10.000 RLU war im Vergleich zu den Negativkontrollen RK13+PrP_C-terminal und RK13+PrP_N-terminal deutlich erhöht. Das Signal der ungespalteten hGLuc fiel mit 180934 RLU deutlich höher aus. Dieses Ergebnis zeigte, dass der Assay die

3. Ergebnisse

Dimerisierung von PrP in den entsprechenden Zellen nachweisen konnte. Diese funktionierte nur in Zellen, die zwei PrP-Kopien, jeweils mit der N- und der C-terminalen hGLuc Hälfte fusioniert, exprimierten. Fehlte PrP, wie in den Kontrollen, war nur ein minimales Biolumineszenzsignal messbar, das dem Hintergrund entsprach. Folglich wurde das gemessene Signal durch die Dimerisierung von PrP und nicht durch eine unspezifische Dimerisierung der hGLuc-Hälften verursacht.

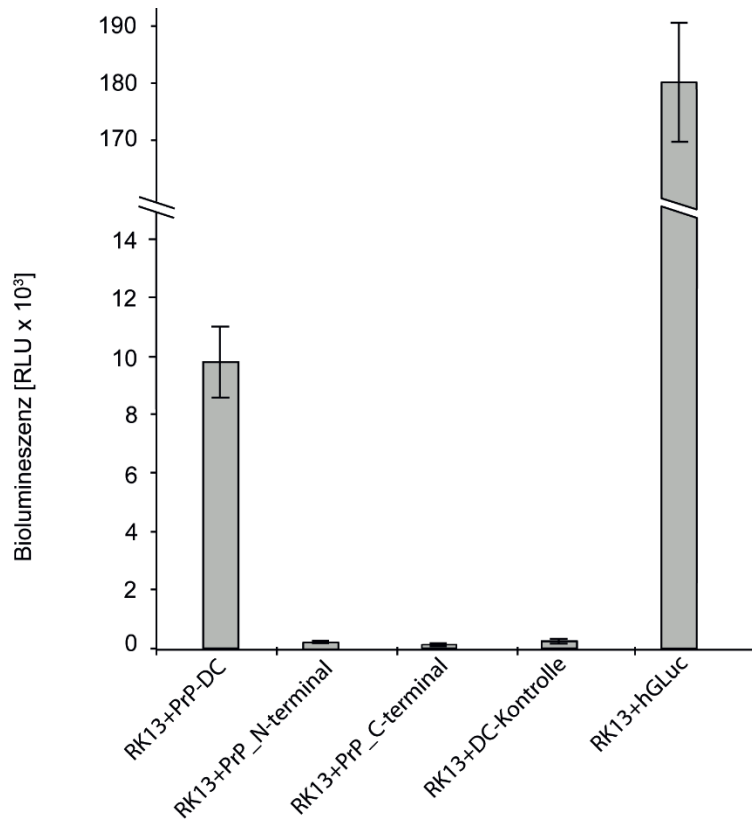


Abb. 3.4: Der entwickelte Biolumineszenzassay detektiert die Dimerisierung von PrP in RK13+PrP-DC-Zellen. Das Biolumineszenzsignal wurde 24 h nach Aussaat der Zellen gemessen. RK13+PrP_N-terminal, RK13+PrP_C-terminal und RK13+DC-Kontrolle stellen Negativkontrollen und RK13+hGLuc eine Positivkontrolle dar. Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar (n = 4).

3.5 Antikörper gegen die zentrale Region von PrP inhibieren die Dimerisierung des Proteins

Um zu untersuchen, welche Regionen des Prionproteins bei dessen Dimerisierung eine Rolle spielen, wurden im Biolumineszenzassay acht Antikörper mit verschiedenen spezifischen Bindungsregionen zur Behandlung der RK13+PrP-DC-Zellen eingesetzt. Die Bindungsregionen und die jeweiligen Epitope sind schematisch in Abb. 3.5, bzw. in Tabelle 1 dargestellt. Die Antikörper SAF32 und SAF34 binden an die Octarepeat-Region

3. Ergebnisse

am N-terminus des Proteins, während der 6D11-Antikörper die Aminosäuren 93-109 am N-terminus erkennt. Die Antikörper SAF83, SAF61 und Sha31 binden an die erste alpha-Helix von PrP. Der Antikörper EP1802Y erkennt das C-terminale Ende der dritten alpha-Helix von PrP. Außerdem wurde der Antikörper BAR236 eingesetzt, der ein konformations-spezifisches Epitop erkennt und daher nicht in Abb. 3.4 eingezeichnet ist.

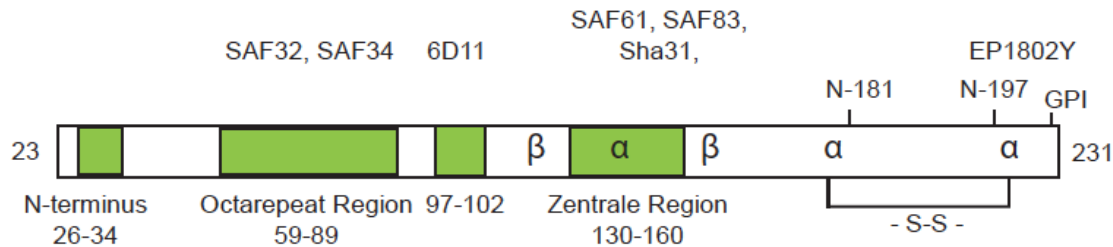


Abb. 3.5: Schematische Darstellung der Epitope von sieben im Biolumineszenzassay verwendeten PrP-spezifischen Antikörpern. Die Octarepeat Region (59-89), die Intermediäre Region (97-102) und die zentrale Region von PrP sind in grün dargestellt. Die Nummer beziehen sich auf Aminosäure-Positionen im Prionprotein (23-231). Zusätzlich sind die beiden Asparagine an Position 181 und 197, an die posttranslational ein Zuckerrest angehängt werden kann, und die interne Disulfid-Brücke eingezeichnet. GPI, Glycosylphosphatidylinositol, verändert nach Féraudet et al., 2004.

Tab.1: PrP-spezifische Antikörper mit ihren Epitopen und EC₅₀-Werten

Antikörper	Epitop	EC ₅₀ [µg/mL]	Quelle
SAF32	59-QPHGGGW(x4)-89	2.5	(Feraudet et al., 2005)
SAF34	59-QPHGGGW(x4)-89	1.0	(Feraudet et al., 2005)
6D11	97-QWNK-100	0.07	(Pankiewicz et al., 2006; Spinner et al., 2007)
SAF61	142-GSDYEDRYREN-153	2.5	(Feraudet et al., 2005)
SAF83	126-GYMLGSAMSRPMIHFGNDWE DRYRENMYRYPNQVYYRP-164	0.25	(Feraudet et al., 2005)
Sha31	145-YEDRYRE-152	0.1	(Feraudet et al., 2005)
BAR236	konformationsabhängig	0.1	(Feraudet et al., 2005)
EP1802Y	220-ESQAYYDGRSS-231	n. a.	(Doolan and Colby, 2015)

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse des Biolumineszenzassays (s. Abb. 3.6A) zeigen, dass die drei Antikörper, die an die Octarepeat-Region bzw. an die Intermediäre Region von PrP binden, eine Reduktion des Biolumineszenzsignals auf 64% bis 50% im Vergleich zu unbehandelten Zellen bewirken. SAF61, SAF83 und Sha31, die gegen die zentrale Region gerichtet sind, verringern das Signal um 70%. Der Antikörper BAR236 verursacht eine Reduktion des Biolumineszenzsignals auf 40%. Damit ist er effektiver als der gegen den C-Terminus gerichtete Antikörper EP1802Y, der eine Reduktion des Signals um 45% bewirkte. Die Behandlung der Zellen mit unspezifischem IgG-Serum als Negativkontrolle bewirkte keine Änderung des Signals. Die beobachteten inhibierenden Effekte der acht getesteten Antikörper auf die Dimerisierung von PrP waren somit auf die spezifische Bindung an die unterschiedlichen Epitope des Proteins zurückzuführen. Antikörper, die gegen die zentrale Region gerichtet sind und diese durch ihre Bindung unzugänglich machen, zeigen dabei die höchste Effektivität.

Um auszuschließen, dass sich die Behandlung mit PrP-spezifischen Antikörpern negativ auf die Zellviabilität auswirkt und der Rückgang des Biolumineszenzsignals darauf zurückzuführen ist, wurde nach 24 h Antikörperbehandlung ein MTT-Assay durchgeführt (Abb. 3.6B). Dieser zeigt, dass keiner der acht verwendeten PrP-Antikörper die Viabilität der Zellen beeinflusst, die vergleichbar mit der von unbehandelten Zellen ist. Als Positivkontrolle wurden Zellen 24 h mit 10% DMSO inkubiert, was toxisch für die Zellen ist.

3. Ergebnisse

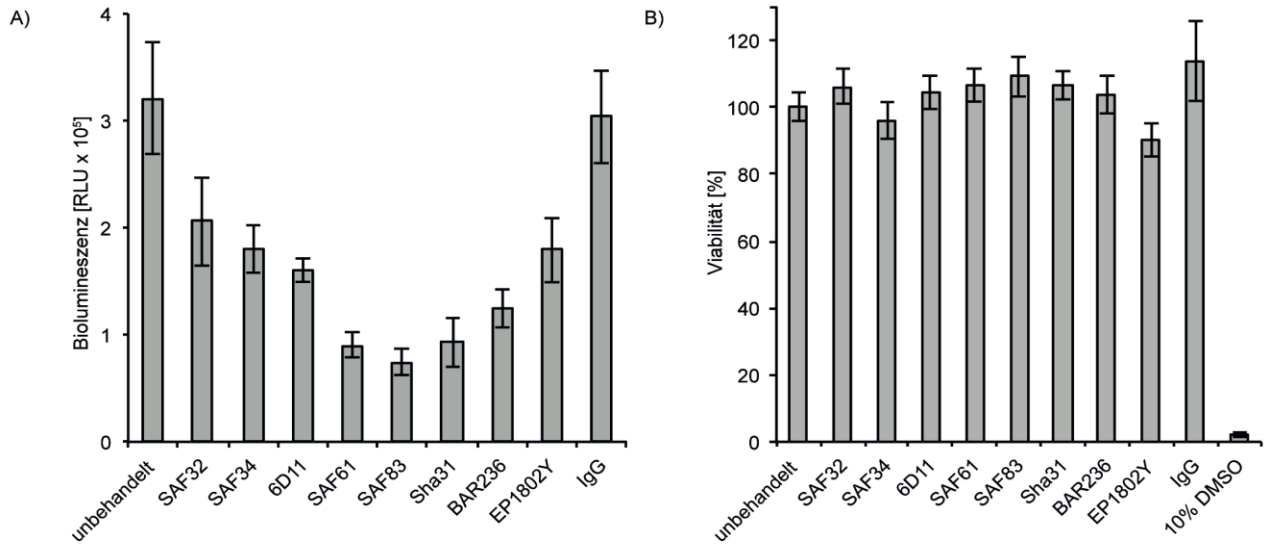


Abb. 3.6: Antikörper gegen verschiedene Domänen des Prionproteins inhibieren die PrP-Dimerisierung abhängig von ihrer Bindungsstelle ohne Toxizität. A) Biolumineszenz von RK13+PrP-DC-Zellen nach 24 h Inkubation mit und ohne Antikörper. Als Negativkontrolle wurde IgG eingesetzt. Die Konzentration der eingesetzten Antikörper betrug 10 µg/ml. Die Daten stellen den Mittelwert ± Standardabweichung dar (n = 7). B) Der MTT-Assay zeigt, dass keiner der eingesetzten Antikörper nach 24 h stark toxisch ist. Die Konzentration der eingesetzten Antikörper betrug 10 µg/ml. Als Positivkontrolle wurde 10% DMSO eingesetzt. Die Daten stellen den Mittelwert ± Standardabweichung dar (n = 7).

3.5.1 Antikörper gegen PrP inhibieren dessen Dimerisierung konzentrations- und zeitabhängig

Die beiden PrP-spezifischen Antikörper Sha31 und SAF83, die gegen die zentrale Region des Proteins gerichtet sind, zeigen bei einer Konzentration von 10 µg/ml und 24 h Inkubation einen deutlichen inhibierenden Effekt auf die Dimerisierung von PrP (Abb. 3.6A). Daher wurden diese beiden Antikörper in weiteren Biolumineszenzassays in steigenden Konzentrationen getestet. Abb. 3.7 zeigt einen konzentrationsabhängigen Rückgang des Biolumineszenzsignals. Bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml hat keiner der beiden Antikörper einen Einfluss auf das Signal, das für diese Konzentration vergleichbar mit der unbehandelten Kontrolle ist, während Sha31 bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml eine Signalreduktion von 28% gegenüber den unbehandelten Zellen verursacht. Das Signal der mit SAF83 behandelten Zellen unterscheidet sich bei dieser Konzentration nicht von der unbehandelten Kontrolle. Bei einer Konzentration von 1,0 µg/ml reduzieren beide Antikörper das Biolumineszenzsignal auf 57% bzw. 53% des Ursprungssignals. Die höchste in diesem Assay eingesetzte Antikörperkonzentration

3. Ergebnisse

betrug 10 $\mu\text{g/ml}$. Bei dieser Konzentration verursachen beide Antikörper eine Signalreduktion um 70%.

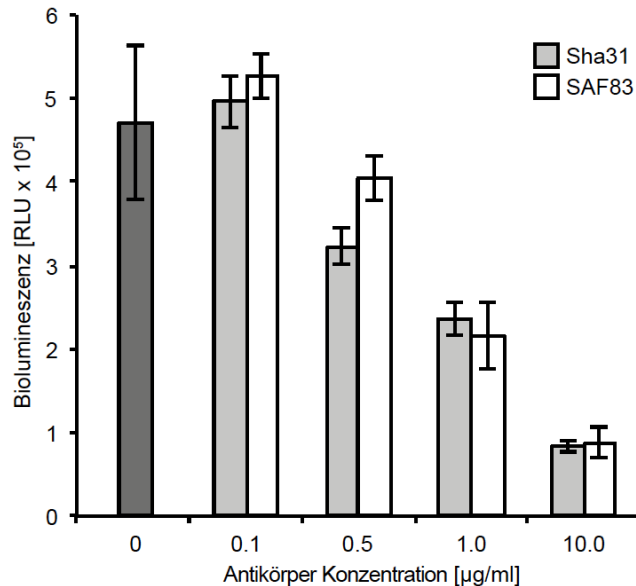


Abb. 3.7: Antikörper gegen die zentrale Region des Prionproteins inhibieren konzentrationsabhängig die Dimerisierung. Im Biolumineszenzassay wurden RK13+PrP-DC-Zellen für 24 h mit steigenden Antikörperkonzentrationen von Sha31 (hellgrau) oder SAF83 (weiß) behandelt. Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar (n = 6).

Zusätzlich wurden in einem Zeitreihenexperiment Behandlungszeiten von 1–24 h untersucht. In Abb. 3.8 ist das Biolumineszenzsignal in Abhängigkeit zur jeweiligen Inkubationszeit dargestellt. Stellvertretend für PrP-spezifische Antikörper wurden wie in Abb. 3.7 Sha31 und SAF83 eingesetzt. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen sowie Zellen, die mit unspezifischem IgG inkubiert wurden. Bereits nach einer Stunde Inkubationszeit fällt das Biolumineszenzsignal der mit PrP-spezifischen Antikörper behandelten Zellen geringer aus als das der Kontrollen, die sich in der Signalintensität nicht unterschieden. Nach drei Stunden ist bei den unbehandelten Zellen und bei der IgG-Kontrolle ein leichter Anstieg des Signals zu beobachten, der auf neu synthetisiertes Protein, das an der Zelloberfläche dimerisierte, zurückgeführt werden kann. Im Vergleich dazu bleibt das Signal der mit Sha31 bzw. SAF83 behandelten Zellen unverändert und entspricht zu diesem Zeitpunkt 50% der unbehandelten bzw. mit IgG behandelten Zellen. Nach 6 h Inkubationszeit verdoppelt sich das Biolumineszenzsignal aller Zellen in Vergleich zur ersten Messung und nach 24 h vervierfacht es sich. Auch wenn sich das

3. Ergebnisse

Signal der mit PrP-spezifischen Antikörper inkubierten Zellen auf Grund von Zellteilung und neu synthetisiertem Protein innerhalb von 24 Stunden vervierfacht, bleibt es deutlich unter dem der unbehandelten bzw. mit IgG behandelten Zellen.

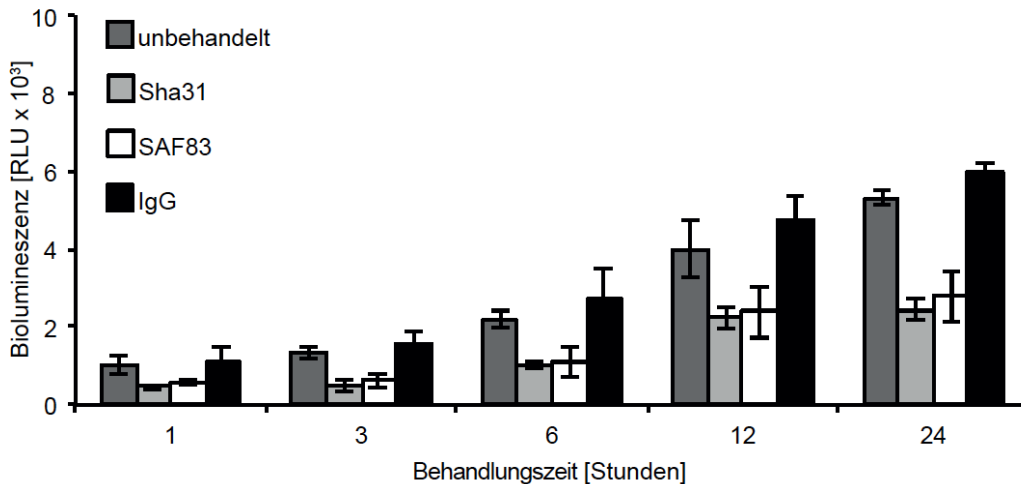


Abb. 3.8: Antikörper gegen die zentrale Region des Prionproteins inhibieren dessen Dimerisierung dauerhaft über 48 h. Dargestellt ist das zeitabhängige Biolumineszenzsignal von RK13+PrP-DC-Zellen ohne Behandlung (dunkelgrau) und bei Behandlung mit 10 µg/ml der PrP-spezifischen Antikörper Sha31 (hellgrau) und SAF83 (weiß) und unspezifischem IgG (schwarz). Die Daten stellen den Mittelwert ± Standardabweichung dar (n = 4).

Zusammenfassend zeigen die in den Abbildungen 3.6 bis 3.8 dargestellten Ergebnisse, dass sich die Dimerisierung des Prionproteins mit Hilfe des hier entwickelten Biolumineszenzassays messen lässt. Die hier durchgeführten Versuche mit acht PrP-spezifischen Antikörpern, die gegen verschiedene Domänen des Proteins gerichtet sind, zeigen, dass Antikörper, die an die zentrale Domäne binden, die Dimerisierung effektiver inhibieren als Antikörper, die C- bzw. N-terminale Bereiche des Prionproteins erkennen. Dieser Effekt ist abhängig von der eingesetzten Konzentration der Antikörper, aber nicht von der Inkubationszeit.

3.6 Eine akute Prioninfektion der RK13+PrP-DC-Zellen führt zu einem Anstieg des Biolumineszenzsignals

Wie bereits im vorherigen Abschnitt dargestellt wurde, kann der Biolumineszenzassay eingesetzt werden, um die Dimerisierung des Prionproteins *in vivo* zu untersuchen. Dabei handelt es sich um die zelluläre Form des Proteins (PrP^C). In weiterführenden

3. Ergebnisse

Experimenten wurde untersucht, ob der entwickelte Assay ebenfalls aggregiertes PrP^{Sc} detektieren kann. PrP^{Sc} steht für die pathogene, infektiöse Isoform von PrP^C. Dazu wurden RK13+PrP-DC-Zellen mit 10%igem Hirnhomogenat von Tga20 Mäusen infiziert, welche zuvor mit Prionen des RML-Stammes infiziert wurden und daran erkrankten. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen sowie Zellen, die mit 10%igem Hirnhomogenat von gesunden C56BL/6J-Mäusen behandelt wurden (Wt). Abb. 3.9 zeigt das Biolumineszenzsignal der drei Versuchsgruppen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Nach einer Inkubationsdauer von einem Tag ist das Signal der infizierten Zellen nicht von dem der uninfizierten Kontrollen unterscheidbar. Im Vergleich dazu kann nach drei Tagen ein Anstieg des Signals um mehr als 100% beobachtet werden, während die Biolumineszenz der uninfizierten Kontrollen nur leicht ansteigt. Dabei ist kein Unterschied zwischen den unbehandelten Zellen und den zur Kontrolle mit Hirnhomogenat von gesunden Wt-Mäusen behandelten Zellen feststellbar. Wie in Abb. 3.8 kann dieser leichte Anstieg durch neu synthetisiertes Protein, welches an der Zelloberfläche dimerisiert, verursacht werden. Im Vergleich zu dreitägiger Inkubationszeit ist das Signal nach fünf Tagen kaum verändert.

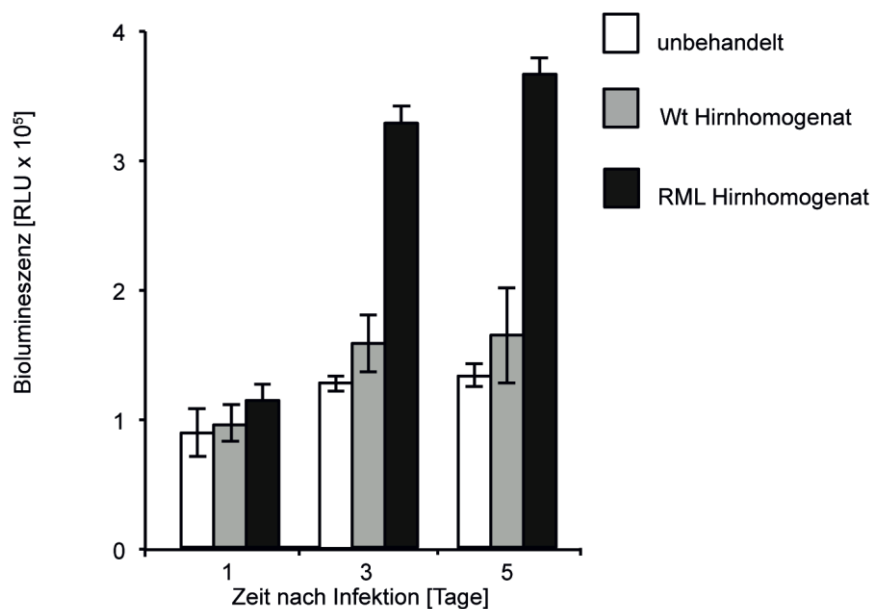


Abb. 3.9: Die Dimerisierung von PrP nimmt nach akuter Infektion mit RML Prionen zu. Im Biolumineszenzassay mit RK13+PrP-DC-Zellen steigt im Vergleich zu unbehandelten Zellen (weiß), und Zellen, die mit 10%igem Hirnhomogenat gesunder Wt-Mäuse (grau) behandelt wurden, das Signal bei Infektion der Zellen mit 10%igem RML-Hirnhomogenat (schwarz). Die Daten stellen Mittelwert \pm Standardabweichung dar (n = 10).

3. Ergebnisse

3.6.1 Die Behandlung mit Quinacrine hemmt die Prioninfektion

Nachdem deutlich gezeigt werden konnte, dass bei einer Prioninfektion das Biolumineszenzsignal infizierter RK13+PrP-DC-Zellen steigt, sollte untersucht werden, ob der gegen Prionen gerichtete Wirkstoff Quinacrine, dessen Wirkungsmechanismus unbekannt ist (Doh-Ura et al., 2000; Korth et al., 2001), auch in diesem Assay wirksam ist (Abb. 3.10). Nach fünftägiger Inkubationszeit unterschied sich das Biolumineszenzsignal der unbehandelten Zellen und der Zellen, die mit Hirnhomogenat von gesunden C56BL/6J-Mäusen (Wt) behandelt wurden, nicht signifikant von einander, während das Signal der infizierten Zellen, wie schon in Abb. 3.9 gezeigt, signifikant höher war. Nach fünftägiger Quinacrine-Behandlung war bei den unbehandelten und bei den mit Wt-Hirnhomogenat behandelten Zellen kein Unterschied zu den entsprechenden Zellen feststellbar, die nicht mit Quinacrine behandelt worden waren. Das Signal der mit RML Hirnhomogenat infizierten Zellen war nach der Quinacrine -Behandlung jedoch signifikant reduziert.

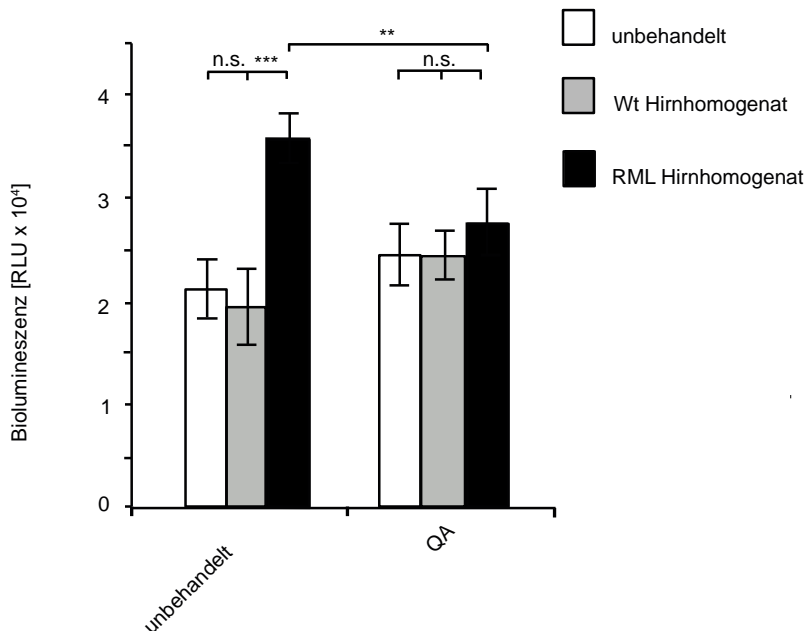


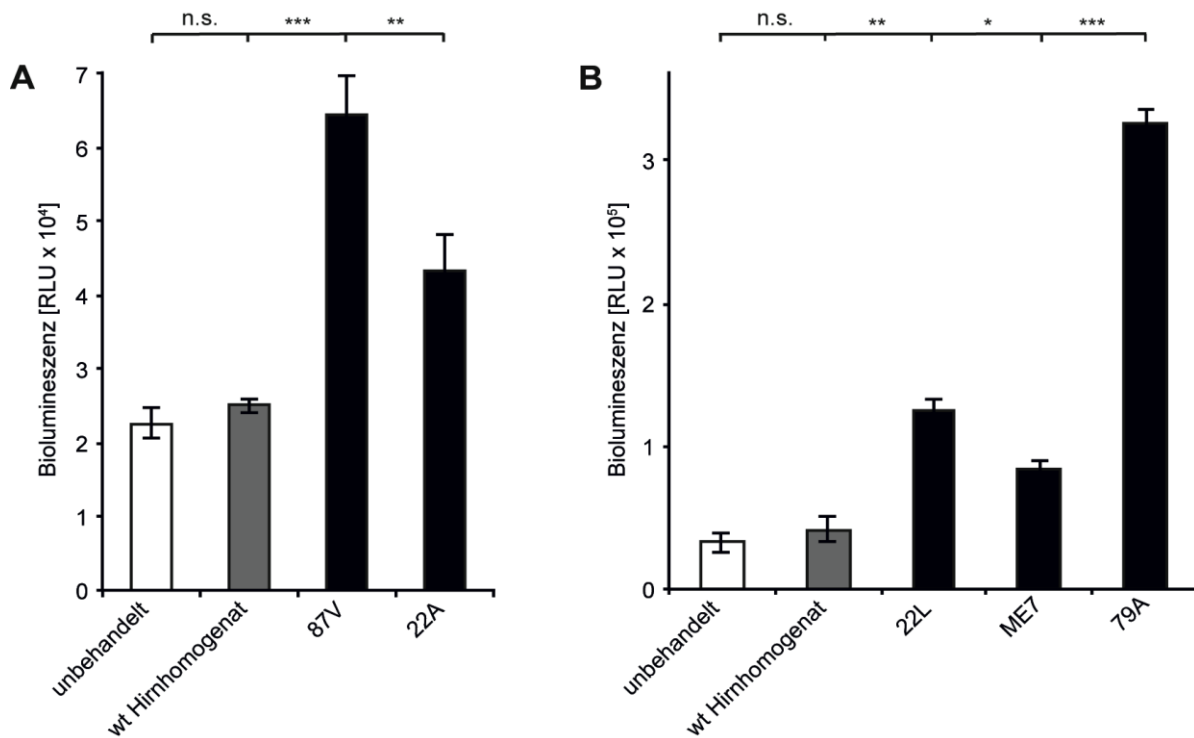
Abb. 3.10: Behandlung mit dem anti-Prion Wirkstoff Quinacrine (QA) inhibiert die Infektion von RK13+PrP-DC-Zellen. Im Biolumineszenzassay mit RK13+PrP-DC-Zellen ist zu erkennen, dass nach 5 d im Vergleich zu unbehandelten Zellen (weiß), und Zellen, die mit 10%igem Hirnhomogenat gesunder Wt-Mäuse behandelt wurden (grau), Zellen, die mit 10%igem RML-Hirnhomogenat behandelt wurden (schwarz), ein höheres Signal aufweisen, das allerdings bei gleichzeitiger Behandlung mit 400 nM Quinacrine nach 5 d stark vermindert ist und dem von nicht-infizierten Zellen gleicht. Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar (n = 7; ***p < 0,001; **p < 0,01; Kruskal-Wallis Rang-Summen-Test).

3. Ergebnisse

3.6.2 Eine akute Infektion von RK13+PrP-DC-Zellen kann für weitere fünf Prionstämme nachgewiesen werden

Die in den Abb. 3.9 und 3.10 dargestellten Ergebnisse bezogen sich auf eine Infektion der RK13+PrP-DC-Zellen mit Prionen des RML Stammes. Zusätzlich hierzu wurden fünf weitere Prionstämme genutzt, um die Zellen zu infizieren und anschließend das Biolumineszenzsignal zu messen. Abb. 3.11 zeigt das Biolumineszenzsignal der unbehandelten Zellen fünf Tage nach der Einsaat, bzw. nach fünf Behandlungstagen mit Hirnhomogenat von gesunden C56BL/6J-Mäusen (Wt) und mit 87V, bzw. 22A Prionen, die in *Prnp*-B exprimierenden VM Mäusen passagiert wurden (Abb. 3.11 A). Zusätzlich wurden 22L, ME7 und 79A Prionen, die wie RML Prionen in C57BL/6 Mäusen passagiert wurden, welche *Prnp*-A exprimieren, (Abb.3.11 B) genutzt.

Eine Behandlung mit Hirnhomogenat von gesunden C56BL/6J-Mäusen verursachte keine Veränderung des Signals im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Die Infektion der Zellen mit 87V-Prionen löste dagegen eine Verdreifachung des Signals aus, eine Infektion mit Prionen des 79A Stammes löste ein sechsfach höheres Biolumineszenzsignal aus. 22A, 22L und ME7-Prionen bewirkten einen leichten aber signifikanten Anstieg des Biolumineszenzsignals.



3. Ergebnisse

Abb. 3.11 Der Biolumineszenzassay detektiert die Infektion von RK13+PrP-DC-Zellen nach Inkubation mit fünf verschiedenen Prionstämmen. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen (weiß) oder Zellen, die mit 10%igem Hirnhomogenat gesunder C56BL/6J-Mäusen (wt) inokuliert wurden (grau), induziert eine Inokulierung mit 10%igen Hirnhomogenaten von Mäusen, die je mit einem von fünf verschiedenen Prionstämmen infiziert waren, das Biolumineszenzsignal. Die Daten stellten den Mittelwert \pm Standardabweichung dar (n = 10; ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05 Kruskal-Wallis Rang-Summen-Test).

Zusammenfassend zeigen die in den Abbildungen 3.9 bis 3.11 dargestellten Ergebnisse, dass eine akute Infektion von RK13+PrP-DC-Zellen mit RML Prionen bereits nach drei Tagen nachweisbar ist. Eine Infektion von RK13+PrP-DC-Zellen konnte für insgesamt 6 verschiedene Prionstämme nachgewiesen werden, während eine Behandlung mit Hirnhomogenat von gesunden Wt-Mäusen das Biolumineszenzsignal nicht beeinflusste. Der entwickelte Biolumineszenzassay detektiert somit nicht nur die Dimerisierung des Prionproteins *in vivo* sondern auch eine durch Infektion induzierte Aggregation des Proteins. Eine gleichzeitige Behandlung der infizierten Zellen mit dem Anti-Prion Wirkstoff Quinacrine inhibiert die Prioninfektion.

3.7 Chronisch infizierte RK13+PrP-DC-Zellen zeigen nach Quinacrine-Behandlung einen Rückgang des Biolumineszenzsignals

Zusätzlich zu den akut infizierten RK13+PrP-DC-Zellen (Abb. 3.9) wurden chronisch infizierte Zellklone etabliert. Diese behielten ihre Infektion nach Entfernen des ursprünglich für die Infektion eingesetzten RML-Hirnhomogenats über mehrere Passagen bei. Zur Charakterisierung des Infektionsstaus wurde das Biolumineszenzsignal der chronisch infizierten Klone gemessen. Zusätzlich wurden sie, wie schon die akut infizierten Zellen, vor der Durchführung des Biolumineszenzassays fünf Tage lang mit dem Anti-Prion-Wirkstoff Quinacrine behandelt. Zwei Klone, ScRK13+PrP-DC Klon 14 und 17, zeichneten sich durch einen deutlichen Rückgang des Biolumineszenzsignals nach Quinacrine-Behandlung aus. Abb. 3.12A zeigt das Biolumineszenzsignal des chronisch infizierten ScRK13+PrP-DC Klon 14 und unbehandelten RK13+PrP-DC-Zellen. Der chronisch infizierte Klon zeichnete sich durch ein höheres Biolumineszenzsignal im Vergleich zu unbehandelten RK13+PrP-DC-Zellen aus. Nach fünftägiger Quinacrine-Behandlung war das Signal des infizierten Klons deutlich reduziert, während die Behandlung bei den unbehandelten Zellen keinen Einfluss auf die Biolumineszenz zeigte. Um auszuschließen, dass der Rückgang des Signals durch einen

3. Ergebnisse

toxischen Effekt auf die Viabilität der Zellen verursacht wurde, wurde nach fünf Behandlungstagen mit Quinacrine ein MTT-Assay durchgeführt. Wie in Abb. 3.12B dargestellt, hatte die Quinacrine-Behandlung keine Auswirkung auf die Viabilität der behandelten Zellen. Der Rückgang des Biolumineszenzsignals der chronisch infizierten Zellen nach Quinacrine-Behandlung war somit auf den Effekt des Wirkstoffs auf die PrP-Aggregate zurückzuführen, während die Dimere der unbehandelten, nicht-infizierten Zellen unbeeinflusst blieben.

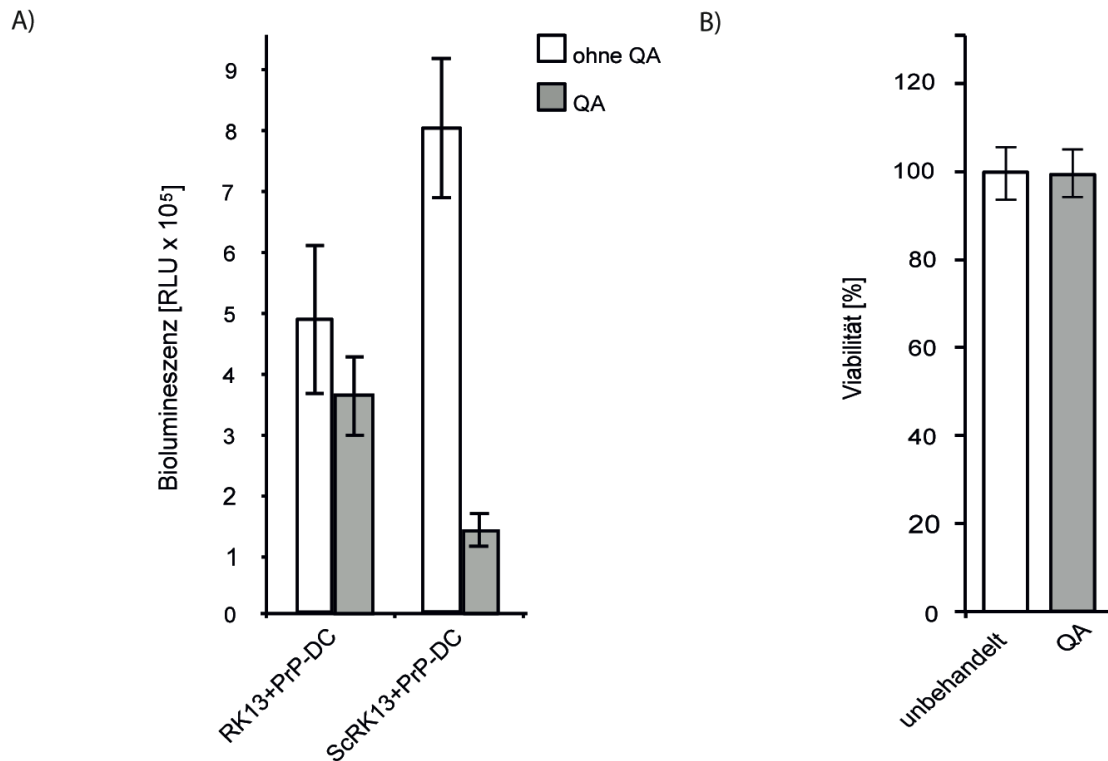


Abb. 3.12: Quinacrine reduziert die Biolumineszenz von chronisch infizierten Zellklonen. A) Im Gegensatz zu unbehandelten Zellen (weiß), verursacht die Behandlung mit 400 nM Quinacrine (QA) (grau) für 5 d einen Rückgang des Biolumineszenzsignals bei infizierten ScRK13+PrP-DC-Zellen, aber nicht bei nicht-infizierten RK13+PrP-DC-Zellen. Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar (n = 8). B) QA hat keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen. Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar (n = 8).

3.8 Tga20 Mäuse, die mit Lysat der chronisch infizierten und Quinacrine-sensitiven ScRK13+PrP-DC-Zellen infiziert wurden, zeigen weder Krankheitssymptome noch eine verkürzte Lebensdauer

Da die chronisch infizierten Zellklone 14 und 17 nach Behandlung mit proteinase K kein Signal im Western Blot zeigten, sollte deren Infektiosität im Tierversuch nachgewiesen werden. Dazu wurden in einem Tierversuch Tga20-Mäuse intrazerebral mit Lysat von

3. Ergebnisse

beiden ScRK13+PrP-DC-Zellklonen infiziert, die durch ein erhöhtes Biolumineszenzsignal und durch einen Rückgang des Signals nach Quinacrine-Behandlung aufgefallen waren (Abb. 3.12). Tga20-Mäuse, die mit Lysat unbehandelter RK13+PrP-DC-Zellen injiziert wurden dienten als Negativkontrolle. RML-Hirnhomogenat-infizierte Mäuse wurden als Positivkontrolle eingesetzt.

Die Überlebenskurve in Abb. 3.13 zeigt die Überlebensrate der drei Versuchsgruppen. Tga20-Mäuse, die mit RML-Hirnhomogenat infiziert wurden, zeigten bereits 56, bzw. 57 Tage nach der Infektion charakteristische neurologische Symptome einer Prionerkrankung wie z. B. ausgeprägte Kyphosis, Schwierigkeiten bei der Fortbewegung, sprödes Fell und lethargisches Verhalten. Sie wurden daraufhin getötet und die Gehirne für die Analyse im Western Blot aufbereitet. Von den sieben Kontrolltieren, die mit Lysat nicht infizierter RK13+PrP-DC Zellen inokuliert wurden („Kontrolle“), verstarben zwei Tiere nach 49 und 556 Tagen aufgrund interkurrenter Erkrankung ohne vorherige Symptome. Die restlichen fünf Mäuse wurden, nachdem sie ein Alter von über 600 Tagen erreicht hatten, getötet. Drei von ihnen zeigten zu diesem Zeitpunkt eine milde Kyphosis und hatten Probleme bei der Fortbewegung. Jedoch wies keines der Tiere klare Anzeichen einer Prionerkrankung auf. Aus der Gruppe der Tga20 Mäuse, die mit Lysat der ScRK13+PrP-DC inokuliert wurden, starben vier Mäuse 272, 280, 485 und 535 Tage nach der Inokulation ohne zuvor auffällige Symptome gezeigt zu haben. Bei den letzten drei Tieren war keine Entnahme des Gehirns möglich. Eine Maus musste 520 Tage nach der Inokulation getötet werden, da sie lethargisch wirkte und ein stark aufgeblähtes Abdomen hatte. Die weiteren elf Mäuse aus dieser Versuchsgruppe wurden getötet, nachdem sie ein Alter von über 600 Tagen erreicht hatten. Zu diesem Zeitpunkt zeigten alle Mäuse milde bis starke Kyphosis, kahle Stellen im Fell sowie verkrampfte und unbewegliche Krallen, aber keine klaren Anzeichen einer Prionerkrankung. Die Gehirne dieser Mäuse wurden entnommen und für die Analyse im WB vorbereitet.

3. Ergebnisse

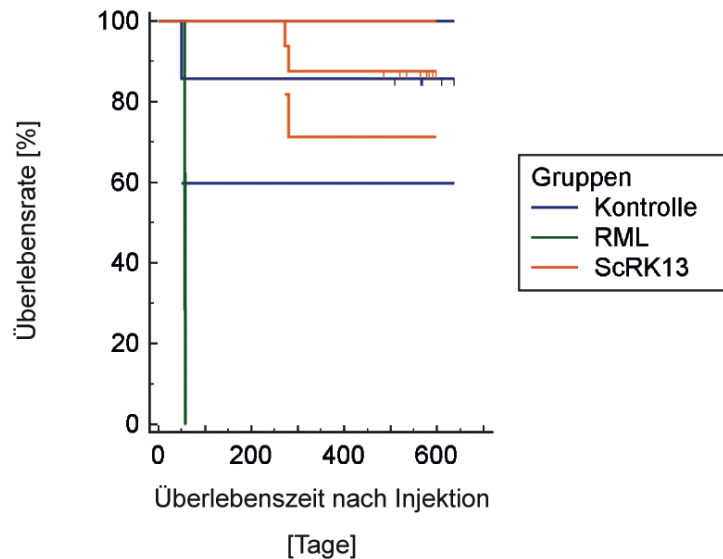


Abb. 3.13: Die Überlebenskurven der drei Versuchsgruppen zeigen, dass Tga20 Mäuse, die mit Lysat von chronisch infizierten ScRK13+PrP-DC-Zellen infiziert wurden (orange) keine verkürzte Lebensdauer im Vergleich zu Kontroll-Mäusen, die mit Lysat von nicht-infizierten Zellen infiziert wurden (blau) zeigen. Tga20 Mäuse, die mit RML-Hirnhomogenat infiziert wurden (grün) starben 56, bzw. 57 Tage nach der Injektion.

3.9 In Hirnhomogenat von Tga20-Mäusen, die mit chronisch infizierten ScRK13+PrP-DC infiziert wurden, war kein PrPSc nachweisbar

Da die Tga20-Mäuse, die mit Lysat von chronisch infizierten ScRK13+PrP-DC-Zellen inokuliert wurden, im Gegensatz zu RML-infizierten Mäusen keine neurologischen Anzeichen einer Prionerkrankung entwickelten, wurden die Gehirne aller Versuchstiere biochemisch auf eine subklinische Erkrankung hin untersucht. Der Western Blot in Abb. 3.14 stellte exemplarisch das PrP-Signal aus dem Hirnhomogenat von jeweils einem Versuchstier pro Gruppe vor und nach Behandlung mit proteinase K (PK) dar. Ausser bei RML-infizierten Tga20-Mäusen war nach dem Verdau mit PK bei keinem der Versuchstiere ein Signal im Western Blot zu sehen. Nach dem PK-Verdau war für die RML-infizierten Tiere ein charakteristisch verschobenes PrP-Signal im Western Blot detektierbar. Das Enzym verdaut in diesem Fall nur den PrP-N-Terminus, wohingegen der C-Terminus PK-resistent ist und somit noch nach dem Verdau im Western Blot nachweisbar bleibt. Insgesamt war auch auf Western Blot-Ebene kein Unterschied zwischen Tga20 Mäusen, die mit Lysat von chronisch infizierten ScRK13+PrP-DC-Zellen inokuliert wurden und den nicht-infizierten Kontrollen erkennbar.

3. Ergebnisse

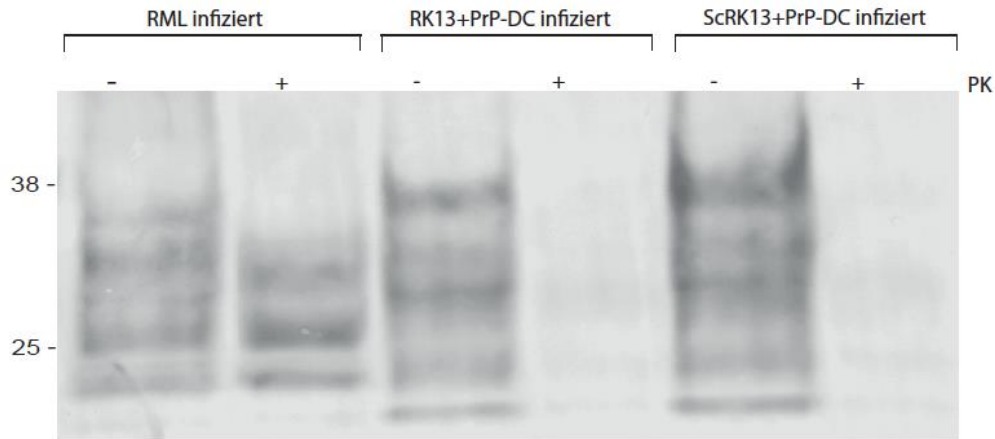


Abb. 3.14: Tga20-Mäuse, die mit Lysat von ScRK13+PrP-DC-Zellen infiziert wurden akkumulierten keine proteinase K (PK)-resistenten Prionen im Gehirn. Hirnhomogenat von RML-infizierten Tga20 Mäusen (Spur 1 und 2) zeigt im Gegensatz zu Hirnhomogenat von RK13+PrP-DC-infizierten Mäusen (Spur 3 und 4) und Hirnhomogenat von ScRK13+PrP-DC-infizierten Mäusen (Spur 5 und 6) nicht nur vor dem PK-Verdau (Spuren 1, 3 und 5), sondern auch danach (Spuren 2, 4 und 6) ein Signal für PrP mit niedrigerem Molekulargewicht im Western Blot. Es wurde der PrP-spezifische Antikörper Sha31 verwendet. Molekulargewicht in kDa.

3.10 Das Wirkstoff-Screening identifiziert eine Substanz, die Dimerisierung und Aggregation von PrP inhibiert

Im Anschluss an die Etablierung des Biolumineszenzassays, der, wie die vorherigen Ergebnisse zeigten, sowohl PrP-Dimere als auch infektionsinduzierte PrP-Aggregate detektieren konnte, wurde der Assay für ein Wirkstoff-Screening genutzt. Dabei wurde nach Wirkstoffen gesucht, die die PrP-Dimerisierung inhibieren und somit auch gegen PrP-Aggregate in infizierten Zellen wirksam wären.

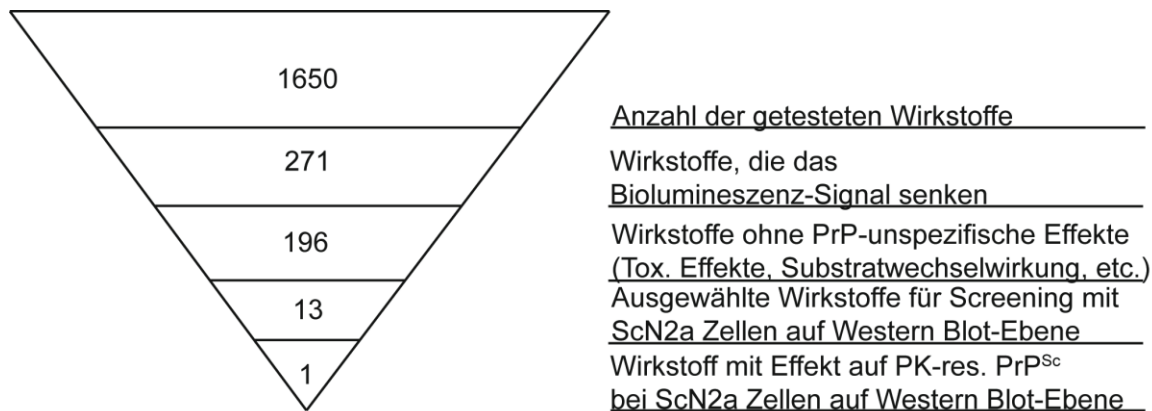


Abb. 3.15: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Eingrenzung der Wirkstoffe im Screening mit RK13+PrP-DC- und ScN2a-Zellen

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieses Screenings wurden insgesamt 1650 Wirkstoffe der „Pharmacologically Active Compound Library“ der Firma Selleckchem untersucht, die pharmakologisch aktive Wirkstoffe wie Inhibitoren, Rezeptorliganden oder bereits zugelassene Medikamente enthält. Um die Zahl der Wirkstoffe einzugrenzen, wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt, die in Abb. 3.15 schematisch dargestellt sind. Zunächst wurden alle 1650 Wirkstoffe auf RK13+PrP-DC-Zellen getestet. Daraus ergaben sich 240 Wirkstoffe, die eine Reduktion des Biolumineszenzsignals verursachten und somit die PrP-Dimerisierung inhibierten. Weiterhin wurde untersucht, ob der beobachtete Rückgang des Signals PrP-spezifisch oder auf Wechselwirkung mit dem Substrat oder auf toxische Effekte auf die Zellen zurückzuführen war. Dazu wurden RK13-Zellen, die die Volllänge Version von hGLuc exprimierten, mit diesen 240 Wirkstoffen behandelt. Da 73 Wirkstoffe auch bei diesen Zellen einen Rückgang des Biolumineszenzsignals verursachten, wurden diese vom weiteren Screening ausgeschlossen. Die verbliebenen 167 Wirkstoffe wurden entsprechend ihrer Wirksamkeit auf die PrP-Dimere sortiert. Die 13 effektivsten wurden anschließend ausgewählt, um ScN2a-Zellen zu behandeln und die Wirkung auf PrP-Aggregate zu testen. Vor der Behandlung wurden die ScN2a-Zellen fünf Tage lang mit den ausgewählten Wirkstoffen in Konzentrationen von 0,01 μM bis 10 μM inkubiert. Mit Hilfe des im Anschluss durchgeführten MTT-Assays wurden die Wirkstoffkonzentrationen ermittelt, die zur Behandlung der ScN2a-Zellen eingesetzt wurden. Zwei Wirkstoffe zeigten schon bei 0,01 μM negative Auswirkungen auf die Zellviabilität und wurden daher nicht für die Behandlung eingesetzt.

Tabelle 3.2: Trivialnamen, bekannte Zielstrukturen und Konzentrationen der für die Behandlung von ScN2a-Zellen ausgewählten Wirkstoffe.

Wirkstoff	Zielstruktur	Konzentration [μM]
17-DMAG HCl (Alvespimycin)	HSP (e.g. HSP90)	0,01
Flavopiridol (Alvocidib) HCl	CDK	0,01
Ponatinib (AP24534)	Bcr-Abl	0,01
Dapivirine	Reverse Transcriptase	0,1
R406	FLT3	0,1
Elaiophyllin (Azalomycin-B)		0,1
AZD5363	Akt	0,5
Etravirine (TMC125)	Reverse Transcriptase	0,5
Idebenone		0,5

3. Ergebnisse

Cobicistat (GS-9350)	P450 (e.g. CYP17)	0,5
AST-1306	EGFR	0,5
JTC-801	Opioid Receptor	0,5
AEE788 (NVP-AEE788)	EGFR	0,5

ScN2a-Zellen wurden 5 Tage mit den 13 Wirkstoffen mit den in Tabelle 3.2 angegebenen Konzentrationen behandelt, wobei das Medium alle zwei Tage gewechselt wurde. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Lysate für die Untersuchung im Western Blot vorbereitet. Die Quantifizierung der in Abbildungen 3.15 und 3.16 dargestellten Western Blots zeigen, dass unter den 13 untersuchten Wirkstoffen nur JTC-801 gegen Prionen wirksam ist.

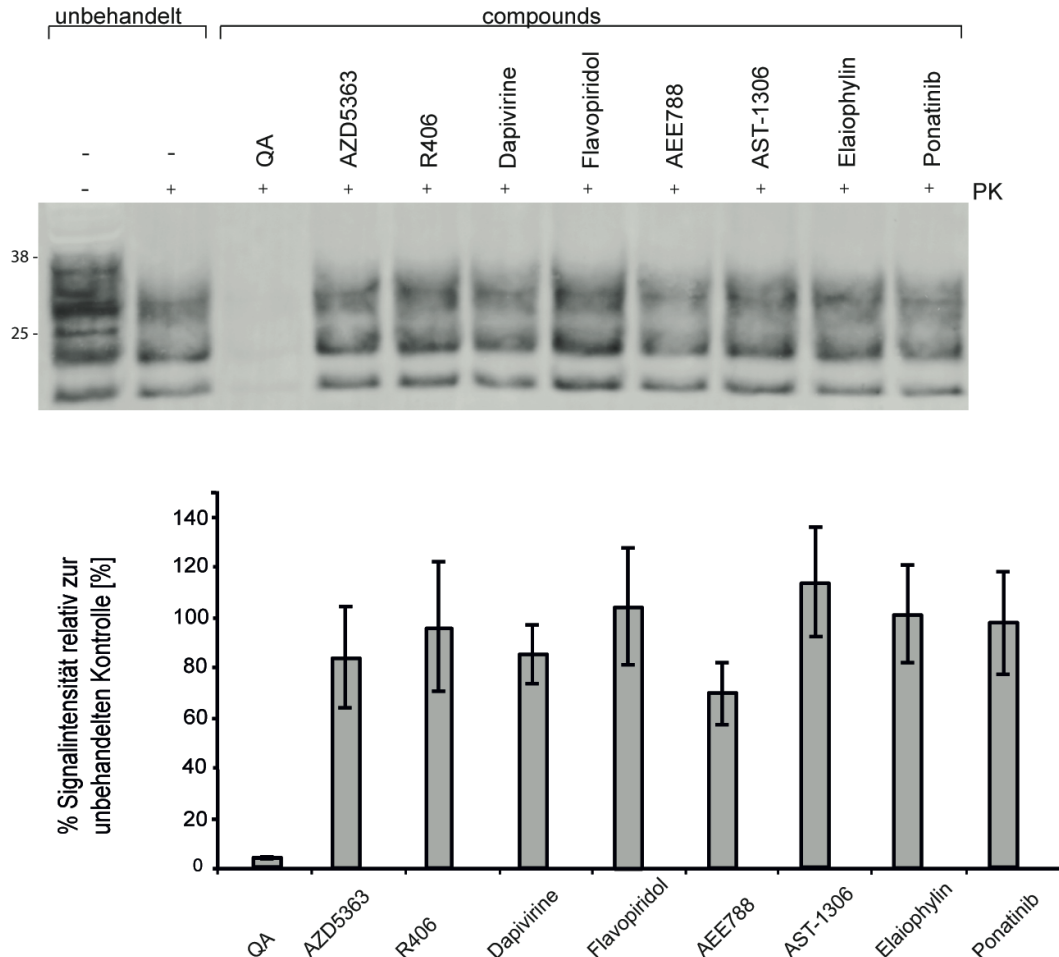


Abb. 3.16 Keiner der hier mit ScN2a-Zellen getesteten Wirkstoffe aus dem Screening führte zu einer zuverlässigen Reduktion des PK-res. PrP^{Sc} Signals

A) Ein exemplarischer Western Blot zeigt das Signal von ScN2a-Zellen nach 5 d Behandlung mit den angegebenen Wirkstoffen. Die verwendeten Wirkstoffkonzentrationen sind in Tabelle 3.2 angegeben. QA wurde hier mit 1 μ M als Positivkontrolle eingesetzt. Es wurde der PrP-spezifische Antikörper Sha31

3. Ergebnisse

verwendet. Molekulargewicht in kDa. B) Densitometrische Quantifizierung der Signalintensität von mindestens drei Western Blots. Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar.

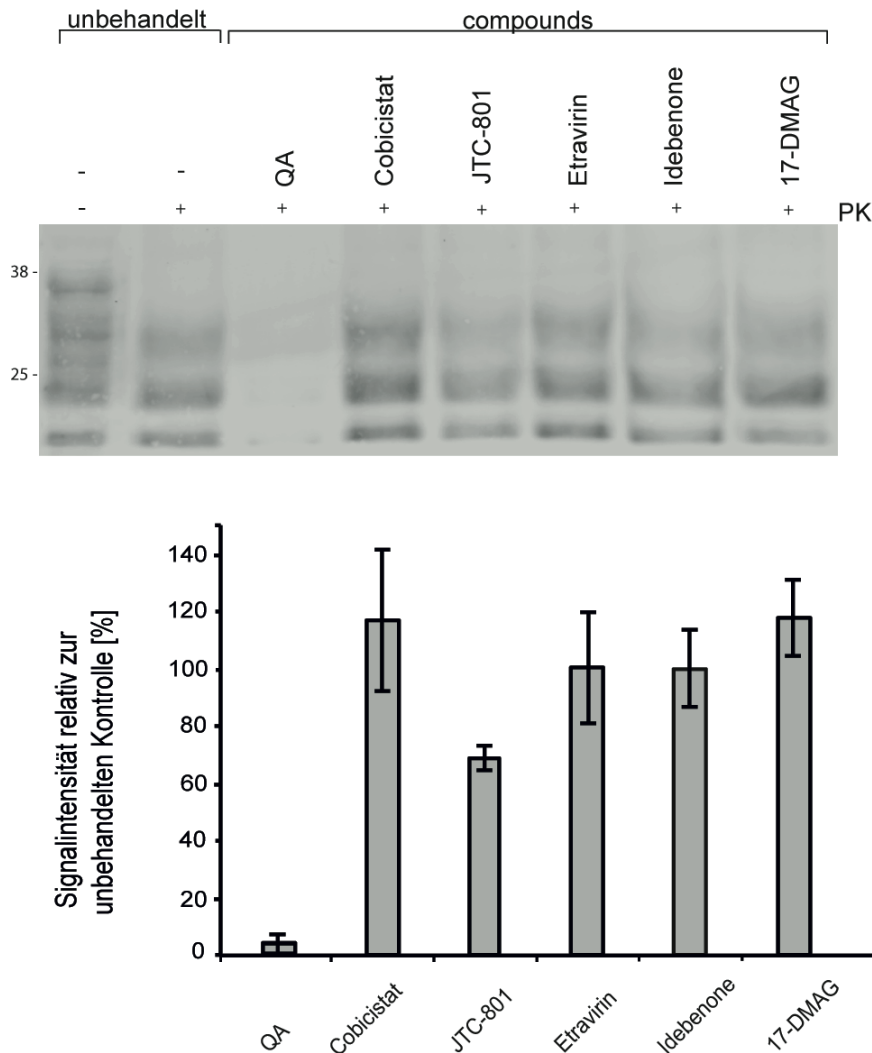


Abb. 3.17 Der im Screening gefundene Wirkstoff JTC-801 ist wirksam gegen Prionen in ScN2a-Zellen. A) Ein exemplarischer Western Blot zeigt das Signal von ScN2a-Zellen nach 5 d Behandlung mit den angegebenen Wirkstoffen. Die verwendeten Wirkstoffkonzentrationen sind in Tabelle 3.2 angegeben. QA wurde hier mit 1 μ M als Positivkontrolle eingesetzt. Es wurde der PrP-spezifische Antikörper Sha31 verwendet. Molekulargewicht in kDa. B) Densitometrische Quantifizierung der Signalintensität von mindestens drei Western Blots. Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar.

Auf der Grundlage der ausgewerteten Western Blots wurde JTC-801 für weitere Behandlungen ausgewählt. Um die EC_{50} von JTC-801 zu bestimmen, wurde eine Titrationsreihe durchgeführt, bei der ScN2a-Zellen mit Konzentrationen von JTC-801 zwischen 0,1-1,0 μ M für fünf Tage behandelt wurden. Anschließend wurden die Zellysate mit PK behandelt und im Western Blot analysiert (Abb. 3.18A). Dieser Versuch zeigt, dass der im Screening gefundene Wirkstoff JTC-801 bei fünftägiger Behandlungsdauer und

3. Ergebnisse

steigender Wirkstoffkonzentration das PK-resistente PrP^{Sc}-Signal in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration reduziert. Nach der densitometrischen Quantifizierung der Signalintensitäten der PK-resistenten PrP-Banden relativ zur unbehandelten Kontrolle wurden diese gegen die JTC-801-Konzentration aufgetragen (Abb. 3.18B). Die Werte dienten als Vorlage für eine sigmoidale Kurve, mit deren Gleichung für JTC-801 eine EC₅₀ von 383 nM bestimmt wurde. Um auszuschließen, dass der Rückgang des Signals durch einen toxischen Effekt auf die Viabilität der Zellen verursacht wurde, wurde nach fünf Behandlungstagen mit JTC-801 ein MTT-Assay durchgeführt. Wie in Abb. 3.18C dargestellt, hatte die JTC-801-Behandlung bis zu einer eingesetzten Konzentration von 5 µM keine Auswirkung auf die Viabilität der behandelten Zellen, bei einer Konzentration von 10 µM war JTC-801 jedoch toxisch. Diese Konzentration wurde für die Antiprion-Behandlung der ScN2a Zellen nicht eingesetzt.

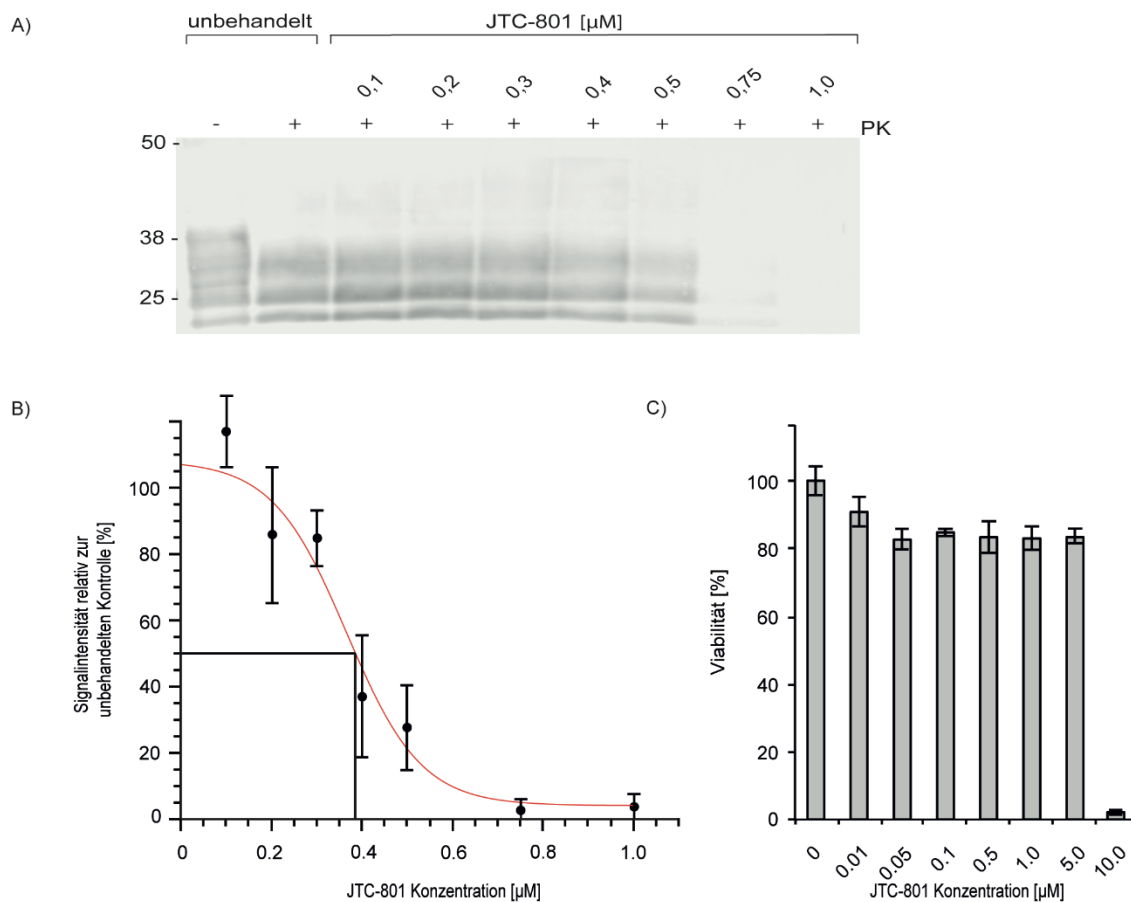


Abb. 3.18: Titrationsreihe zur Bestimmung der EC₅₀ von JTC-801 in ScN2a-Zellen und Viabilitätstest nach JTC-801 Behandlung mit steigenden JTC-801-Konzentrationen.

A) Im Western Blot wurden Lysate von unbehandelten ScN2a-Zellen ohne PK-Verdau (Spur 1) und nach PK-Verdau (Spur 2) und nach PK-Verdau nach fünf-tägiger Behandlung mit steigenden JTC-801-

Konzentrationen aufgetragen (Spuren 3-9). Es wurde der PrP-spezifische Antikörper Sha31 verwendet. Molekulargewicht in kDa. B) Der Western Blot wurde densitometrisch quantifiziert und die Werte relativ zu den von unbehandelten Zellen in Abhängigkeit von der JTC-801-Konzentration aufgetragen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Diese Werte wurden einer sigmoidalen Ausgleichskurve angepasst, anhand derer für JTC-801 eine EC_{50} von 383 nM bestimmt wurde. C) Der MTT-Assay zeigt, dass JTC-801 nur in einer Konzentration von 10 μ M toxisch ist. Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar (n = 9)

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Biolumineszenzassays, der sowohl die Dimerisierung, als auch die Aggregation von PrP *in vivo* messen kann. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass es mit dem neuentwickelten Testverfahren möglich ist, wichtige Aspekte der Dimerbildung und der Aggregation des Prionproteins und damit verbundene Fragen zu untersuchen. Darüber hinaus konnte in einem auf diesem Testverfahren basierenden Wirkstoff-Screening ein Wirkstoff gefunden werden, der Prion-infizierte ScN2a Zellen von Prionen kurieren konnte.

4.1 PrP-Dimerisation

Das zentrale Ereignis bei den übertragbaren, erblichen als auch bei den sporadisch auftretenden Prionerkrankungen ist die Umwandlung von PrP^C in die infektiöse, fehlgefaltete Isoform PrP^{Sc} (Prusiner, 1998). Eine der vielen noch offenen Fragen der Prionenforschung beschäftigt sich mit den Mechanismen, die dieser Umwandlung und der Replikation von PrP^{Sc} zu Grunde liegen. Ein besseres Verständnis ist auch im Hinblick auf die Entwicklung von Anti-Prion-Medikamenten und Behandlungsmöglichkeiten wichtig. Der Gedanke, dass PrP Dimere bildet, welche eine wichtige Rolle bei der Replikation von Prionen spielen könnten, lässt sich schon zu einem frühen Zeitpunkt in der Fachliteratur finden (A.G. Dickinson, 1979) und wurde seitdem durch *in vitro* und *in vivo* Studien bestätigt (Warwicker, 2000; Warwicker and Gane, 1996); (Aguzzi et al., 2008; Meyer et al., 2000). Auch die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die von RK13-Zellen exprimierte PrP-Fusionskonstrukte dimerisieren und lassen darauf schließen, dass PrP^C *in vivo* Dimere bildet. Die immunozytochemische Färbung macht zudem deutlich, dass die PrP-Fusionskonstrukte hauptsächlich an der äußeren Zellmembran lokalisiert sind. Der Vorgang der Dimerisation konnte mit Hilfe des hier entwickelten Biolumineszenzassays zellbasiert gemessen und nachgewiesen werden. Dass es sich dabei um eine von PrP-vermittelte Dimerisation handelt, wurde anhand der Negativkontrollen deutlich, die nur die zwei hGLuc-Hälften exprimieren und kein wesentlich messbares Biolumineszenzsignal aufweisen. Die Voraussetzung für ein messbares Biolumineszenzsignal waren zwei PrP-Kopien. Es war außerdem zu

4. Diskussion

beobachten, dass die PrP-Dimere sich spontan bilden. Diese Ergebnisse stimmen mit Computersimulationen und thermodynamischen Modellen (Harrison et al., 1999) überein und sprechen für die Tendenz von PrP^C Dimere zu bilden.

4.2 Der Effekt PrP-spezifischer Antikörper auf die Dimerisation

Im angesprochenen Zeitreihenexperiment und in zwei weiteren Versuchen (Abb. 3.6 und 3.7) wurden PrP-spezifische Antikörper eingesetzt. Sie wurden entsprechend ihrer Epitope und ihrer Fähigkeit PrP zu binden ausgesucht. Im Biolumineszenzassay zeigte sich, dass sie das Biolumineszenzsignal abhängig vom Epitop und von der eingesetzten Konzentration senken. Dies wird vermutlich durch die Bindung der Antikörper an PrP ausgelöst, die die Dimerisation des Proteins und damit die räumliche Nähe zwischen den Luziferasehälften verhindert. Antikörper, die an die zentrale Region von PrP binden, sind dabei am effektivsten. Ein toxischer Effekt der Antikörper konnte durch einen Toxizitätsassay ausgeschlossen werden.

In einer 2005 veröffentlichten Studie (Feraudet et al., 2005) wurden 145 Anti-PrP-Antikörper anhand ihrer Epitope charakterisiert und mit Hilfe von Prionen-infizierten N2a-Zellen auf ihre Anti-Prion-Eigenschaften getestet, u.a. auch die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper SAF32, SAF34, SAF61, SAF83, Sha31 und BAR236. Die gegen die Octarepeat-Domäne gerichteten Antikörper (SAF32 und SAF34) konnten die PrP^{Sc}-Mengen in infizierten ScN2a-Zellen um 70% reduzieren, die gegen die zentrale Region gerichteten Antikörper (SAF83 und Sha31) bewirkten eine Reduktion von 80%-90%. Obwohl in der zitierten Studie (Feraudet et al., 2005) die Wirkung der Antikörper auf PrP^{Sc} im Mittelpunkt stand, lassen sich Gemeinsamkeiten zu den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen finden. Zum einen waren SAF83 und Sha31, wie in Abb. 3.6 zu sehen, mit SAF61 die effektivsten Antikörper, zum anderen zeigte sich bei allen getesteten Antikörpern ein konzentrationsabhängiger Effekt (Abb. 3.7). Für Sha31 und SAF83 wurde in der zitierten Studie eine IC₅₀ von <0,3 µg/ml bestimmt, während die IC₅₀ für SAF61 mit 2,5 µg/ml deutlich höher war. In der vorliegenden Arbeit war SAF61 dagegen genauso effektiv wie Sha31 und SAF83, allerdings lag der Fokus auf der Inhibierung von PrP-Dimeren. Feraudet et al. zeigten zusätzlich eine positive Korrelation zwischen der

4. Diskussion

Antikörperbindung an PrP^C und der Fähigkeit des entsprechenden Antikörpers, infizierte Zellen zu kurieren und schlussfolgerten unter Berücksichtigung von weiteren Studien (Enari et al., 2001; Peretz et al., 2001), dass diese Wirkung auf die Inhibierung des PrP^C – PrP^{Sc} Kontakts als auf die Bindung an spezifischen Epitopen zurückzuführen ist. Mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit kann ergänzt werden, dass Antikörper, die die PrP^{Sc}-Konzentration besonders effektiv senken, bereits bei der Inhibierung von PrP^C-Homodimeren wirksam sind. Die hierbei beobachteten epitopspezifischen Unterschiede (Abb. 3.6A) lassen darauf schließen, dass die zentrale Region von PrP bei der Dimerisation eine besondere Rolle spielt. Dieses Ergebnis findet sich bei auf CD- und NMR-Analysen basierenden Studien bestätigt (Morrissey and Shakhnovich, 1999; Ziegler et al., 2003). Andere Arbeiten zeigen hingegen, dass der C-Terminus und insbesondere die Region zwischen den beiden alpha-Helix-Strukturen bei der Dimerbildung wichtig ist (Haire et al., 2004; Knaus et al., 2001). Im Biolumineszenzassay wurde der C-Terminus durch den Antikörper EP1802Y abgedeckt (AS 220-231). Dieser inhibierte die PrP-Dimere jedoch weniger effektiv als die Antikörper gegen die Zentrale Region. Die Verwendung von PrP-Antikörpern gegen verschiedene Epitope des Proteins im Biolumineszenzassay kann einen Hinweis geben, welche Regionen *in vivo* bei der Dimerisierung involviert sind. Insgesamt sind weitere hochauflösende Strukturmodelle von PrP^C und PrP^{Sc} nötig, um herauszufinden, welche Regionen bei der Dimerisierung und schließlich bei der Umwandlung zu PrP^{Sc} involviert sind (Singh and Udgaonkar, 2015).

Zusätzlich zur sterischen Hinderung der Dimerisation durch die Antikörperbindung könnten Antikörper auch beim Transport oder bei der Degradierung von PrP eine Rolle spielen. Es wurde beispielsweise berichtet, dass SAF61 die Halbwertszeit von PrP^C an der Zelloberfläche von fünf auf drei Stunden verkürzt, während SAF34 kaum Einfluss auf die Halbwertszeit hat (Perrier et al., 2004). Im Biolumineszenzassay könnte dies mit dem deutlich geringeren Biolumineszenzsignal nach Behandlung mit SAF61 im Vergleich zu SAF34 korrelieren. Die Epitope von SAF34 und SAF61 entsprechen unterschiedlichen Bindestellen des PrP-Laminin-Rezeptors (Hundt et al., 2001). Vermutlich könnte eine Bindung von SAF61 PrP destabilisieren und so zu einer schnelleren Degradation des Proteins beitragen (Leucht et al., 2003).

4. Diskussion

Entgegen der Ergebnisse aus dem Biolumineszenzassay, die eine antikörperinduzierte Inhibierung von PrP-Dimeren zeigen, weisen andere Studien auf ein „Crosslinking“ von PrP-Monomeren durch PrP-Antikörper hin, das zu Apoptose in Neuronen des Hippokampus und Zerebellums führt (Solforosi et al., 2004). Mittlerweile gibt es jedoch auch Studien, die das „Crosslinking-Modell“ und den damit verbundenen Zelltod von Neuronen in Frage stellen (Klohn et al., 2012). In beiden Studien wurden C57BL/10 Mäuse intrazerebral mit den PrP-Antikörpern injiziert, daher ist ein direkter Vergleich zu den mit dem Biolumineszenzassay erhobenen Daten schwierig.

Zusammenfassend stellt der Einsatz von PrP-Antikörpern einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung von Prionerkrankungen dar (White et al., 2003). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einem hohen Anti-PrP-Antikörpertiter nach anschließender Infektion mit 139A-Prionen symptomfrei blieben (Goni et al., 2008). Der Ansatz der Antikörpertherapie wurde auch auf andere neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer (Schenk et al., 1999) und Parkinson (Masliah et al., 2005) übertragen.

Die Ergebnisse des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Biolumineszenzassays weisen daraufhin, dass die acht hier verwendeten Antikörper bereits auf PrP-Dimerebene aktiv sind, insbesondere wenn sie gegen die zentrale Region von PrP gerichtet sind. Dies stellt scheinbar eine gute Voraussetzung für die Behandlung von Prion-infizierten Zellen dar.

4.3 Detektion Infektions-induzierter Aggregation von PrP

Neben der Detektion von PrP-Homodimeren und den damit verbundenen Schlussfolgerungen zu deren Bildung und dem Einfluss verschiedener Antikörper und Epitope ist es mit dem Biolumineszenzassay auch möglich, Infektions-induzierte Aggregation von PrP zu messen. Nach drei Behandlungstagen war das Biolumineszenzsignal der mit RML-Hirnhomogenat infizierten Zellen signifikant höher als das der nicht-infizierten Kontrollen (Abb.3.9). In einer 2011 veröffentlichten Studie wurde beschrieben, dass die Infektion und die Synthese von PrP^{Sc} schon eine Minute nach Inkubation mit RML-Prionen stattfindet (Goold et al., 2011). Diese Ergebnisse beruhen auf der Auswertung von Immunofluoreszenzdaten einzelner Zellen (50-300 Zellen pro

4. Diskussion

Versuch), während im Biolumineszenzassay mindestens 5000 RK13+PrP-DC-Zellen benötigt wurden, um ein messbares Signal zu generieren. Ein infektionsinduzierter Anstieg des Biolumineszenzsignals kann im Biolumineszenzassay nach dreitägiger Inkubation gemessen werden. Das nach 24 Stunden messbare Signal der mit RML-Prionen infizierten RK13+PrP-DC Zellen enthält möglicherweise schon PrP-Aggregate, lässt sich jedoch noch nicht, wie nach drei- und fünftägiger Inkubation, vom Signal der uninfizierten Kontrollen unterscheiden.

Das Signal der uninfizierten Kontrollen spiegelt dabei die Konzentration von PrP-Homodimeren wider. Der Signalanstieg nach Infektion mit RML-Prionen wird dagegen von PrP^{Sc}-Aggregaten ausgelöst. Es ist mittlerweile weitgehend akzeptiert, dass Prionen hauptsächlich aus fehlgefaltetem und aggregiertem Prionprotein bestehen (Prusiner, 1998). Somit kann davon ausgegangen werden, dass PrP^{Sc} mit dem von RK13 Zellen exprimierten PrP^C-Fusionsprodukten interagiert, was zu einer Rekrutierung von PrP^C-Fusionsprodukten in PrP^{Sc}-Aggregate führt und eventuell zur Übertragung der PrP^{Sc} Konformation auf die PrP-Fusionsproteine. Möglicherweise bilden sich zusätzlich intermediäre PrP^C-PrP^{Sc}-Heterodimer-Komplexe und PrP^{Sc}-Dimere aus rekrutiertem PrP^C, wie sie in Modellen zur PrP^C-PrP^{Sc}-Umwandlung vorgeschlagen werden (Come et al., 1993; Prusiner and DeArmond, 1990; Tompa et al., 2002).

4.4 QA-Behandlung infizierter RK13+PrP-DC-Zellen

Aus dem Anstieg des Biolumineszenzsignals in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer (Abb. 3.9) geht nicht hervor, welchen Anteil PrP^{Sc}-Aggregate oder intermediäre Produkte daran haben. Darüber gaben die Experimente, bei denen die akut und chronisch infizierten RK13+PrP-DC-Zellen mit QA behandelt wurden Aufschluss (Abb. 3.10). Der inhibierende Effekt von QA auf die PrP^{Sc}-Akkumulation in Zellen, die mit Maus- oder Hamster-adaptierten Prionen infiziert wurden, wurde mehrfach beschrieben (Barret et al., 2003; Doh-Ura et al., 2000; Korth et al., 2001). Als Wirkmechanismus wird ein destabilisierender Effekt auf Cholesterin-reiche Membranstrukturen diskutiert, der eine verringerte PrP-Konzentration zur Folge hat (Klingenstein et al., 2006). Andere Studien zeigen eine unspezifische Bindung und Stabilisierung von PrP^C, die durch QA-Behandlung ausgelöst wird (Kamatari et al., 2013). Bei Arbeiten mit rekombinantem PrP

4. Diskussion

wurde zudem beobachtet, dass QA die Entstehung von PrP-Oligomeren verhindert, indem es die Protein-Struktur verändert (Georgieva et al., 2006). Der Biolumineszenzassay zeigt, dass die QA-Behandlung keinen Einfluss auf PrP^C-Dimere hat, sondern nur die Bildung von Infektions-induzierten PrP^{Sc}-Aggregaten inhibiert. Somit wirkt QA PrP^{Sc}-spezifisch. Dies würde eher für eine durch QA ausgelöste Strukturänderung und die damit verbundene Inhibierung der PrP^{Sc}-Oligomere oder Aggregate sprechen, da eine Störung von Cholesterin-reichen Membranstrukturen sich auch auf PrP^C auswirken würde. Bei chronisch infizierten ScRK13+PrP-DC Zellen ging das Biolumineszenzsignal nach QA-Behandlung um mehr als 80% zurück (Abb. 3.12), was einem hohen Anteil an PrP^{Sc}-Aggregaten am Gesamt-Biolumineszenzsignal entsprechen würde. Das Biolumineszenzsignals bei akut infizierten RK13+PrP-DC Zellen nach QA-Behandlung war im Gegensatz zu unbehandelten Zellen signifikant verringert, der Unterschied war aber nicht so deutlich wie bei chronisch infizierten Zellen, es entsprach der Konzentration der PrP-Dimere (Abb 3.10). Möglicherweise lag die Konzentration an PrP^{Sc}-Aggregaten zu diesem Zeitpunkt der Infektion noch nicht in dem Umfang vor wie in chronisch infizierten Zellen, so dass sich das gemessene Signal hauptsächlich aus PrP^C-Dimeren zusammensetzte. Die Wirkung von QA ist, wie bereits erwähnt, in der Literatur ausführlich beschrieben. Studien mit Prion-infizierten ScN2a Zellen ergaben eine EC₅₀ von 300 nM (Korth et al., 2001). Eine komplette Inhibierung von PK-resistentem PrP^{Sc} wurde bei einer Konzentration von 400 nM beobachtet, ohne dabei toxisch für die Zellen zu sein (Korth et al., 2001). Diese Werte lagen den für diese Arbeit durchgeführten QA-Behandlungen zu Grunde und führten zu der beobachteten Reduktion des Biolumineszenzsignals.

4.5 Nachweis der Infektiosität im Mausversuch

Zur Validierung des Infektionsstatus der chronisch infizierten Zellen wurden Tga20 Mäuse interzerebral mit Zelllysat infiziert. Die Mäuse zeigten daraufhin weder eine verkürzte Lebensdauer noch PK-resistentes PrP im Hirnhomogenat (Abb. 3.13). Dies kann an der, bereits in der Einleitung erläuterten Speziesbarriere liegen. Die Speziesbarriere besteht aufgrund von Unterschieden in der Primärstruktur von PrP zwischen verschiedenen Spezies, die eine Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} stören und die auf Grund des

4. Diskussion

Fusionsprodukts aus PrP und hGLuc einerseits und dem endogenen PrP der Tga20 Mäuse andererseits nicht überwunden werden konnte. Außerdem wurde berichtet, dass es bei Mäusen, die ein Fusionsprodukt aus PrP und EGFP sowie endogenes PrP^C exprimieren zu „Konkurrenz“ um die PrP^{Sc}-Bindung kommt. Dadurch soll der Prozess der PrP^{Sc}-Ausbreitung verlangsamt worden sein (Barmada and Harris, 2005). Möglicherweise war die Menge an PrP^{Sc}-Aggregaten zwar ausreichend, um eine Steigerung des Biolumineszenzsignals und eine Reaktion auf die QA-Behandlung auszulösen, aber zu gering, um Tga20 Mäuse zu infizieren. Darüber hinaus ist bereits gezeigt worden, dass die PrP^{Sc}-Konzentration nicht zwingend mit der Infektiosität korreliert (Lasmezas et al., 1997; Manson et al., 1999). Trotzdem ist der Nachweis von PrP^{Sc} das Hauptkriterium zur Bewertung der Infektiosität sowohl bei Tier- als auch bei humanen Prionerkrankungen (Piccardo et al., 2007). Traditionell wird PrP^{Sc} als PK-resistent beschrieben. Mehrere Studien zeigen jedoch die Existenz PK-sensitiver, löslicher PrP-Oligomere, die bei verschiedenen Prionerkrankungen, beispielsweise CJD, auftreten. (Cronier et al., 2008; Pastrana et al., 2006; Sajani et al., 2012; Tzaban et al., 2002). Somit können die RK13+PrP-DC Zellen trotz der fehlenden Übertragbarkeit der Infektiosität auf Tga20 Mäuse und der Abwesenheit von PK-resistentem PrP^{Sc} als infiziert angesehen werden. Dafür spricht der Anstieg des Biolumineszenzsignals gegenüber den Kontrollen und die Reaktion auf den Anti-Prion-Wirkstoff QA. Als weiterführender Versuch wäre die Passage von Hirnhomogenaten der möglicherweise subklinischen Tga20 Mäuse in weitere Versuchstiere denkbar.

4.6 Infektion mit unterschiedlichen Prion-Stämmen

Die Diversität der existierenden Prionstämme wird mit der Variabilität der Konformation von PrP^{Sc} begründet (Bessen and Marsh, 1994). Trotz vielfältiger Forschungsbemühungen ist dies jedoch noch nicht abschließend geklärt. Prionstämme lassen sich anhand biochemischer Eigenschaften wie der Stabilität gegenüber Hitze oder chaotropischen Salzen, ihres Glykosylierungsmusters oder der PK-Resistenz charakterisieren (Bessen and Marsh, 1994; Collinge et al., 1996; Khalili-Shirazi et al., 2005; Parchi et al., 1996; Safar et al., 1998). *In vivo* sind beispielsweise die auftretenden klinischen Symptome, die Inkubationszeit oder die betroffenen Organe und Gehirnareale

4. Diskussion

je nach Prionen-Stamm unterschiedlich (Bruce, 1993; Fraser, 1993; Westaway et al., 1987). Auch in dieser Arbeit ließen sich Prionstamm-spezifische Unterschiede beobachten. Der Anstieg des Biolumineszenzsignals war nach Inkubation mit 22L- und 87V-Prionen deutlich höher als nach Inkubation mit 22A-Prionen. ME7 und 79A-Prionen verursachten dagegen keinen signifikanten Anstieg des Signals und führten demnach auch nicht zu einer Infektion der RK13+PrP-DC-Zellen (vgl. Abb. 3.11). Alle in dieser Arbeit untersuchten Prionenstämme waren Maus-adaptiert und von Scrapie-Material aus Schafen abgeleitet. Zwei Zellkulturstudien, in denen ebenfalls RK13 Zellen mit ME7- und 22L-Prionen infiziert wurden, kamen zu einem ähnlichen Ergebnis: Die Infektion mit 22L-Prionen führte zur Amplifikation von PrP^{Sc}, welches im Western Blot nachgewiesen werden konnte, während nach Infektion mit ME7-Prionen kein PrP^{Sc} detektierbar war (Courageot et al., 2008; Vorberg et al., 2004).

N2a Zellen sind die am häufigsten genutzte Zelllinie bei Experimenten zu zellulären Aspekten bei der Verbreitung von Prionen. Da PrP^{Sc} hauptsächlich in Zellen des Zentralen Nervensystems vorkommt, wird angenommen, dass neuronale Zellen besonders anfällig für die Akkumulation und Verbreitung von Prionen sind. Ähnliche wie die Epithelzelllinie RK13 sind N2a Zellen mit 22L und 87V Prionen infizierbar, jedoch nicht mit ME7-Prionen (Courageot et al., 2008; Vorberg et al., 2004). Auch Arbeiten mit N2a Subklonen CAD5-, R33-, LD9- und PK1 Zellen zeigten, dass 22L-Prionen „virulenter“ sind als ME7-Prionen, die nur zwei der getesteten Zell-Linien infizierten (Mahal et al., 2007). Dies spricht dafür, dass die geringe Infektiosität der ME7-Prionen nicht Zelllinien-spezifisch, sondern mit spezifischen Eigenschaften des Prionstammes verbunden ist. Thackray et al. verglichen einige biochemische Eigenschaften RML- und ME7-Prionen und zeigten u.a. Unterschiede des Glykosylierungsprofils auf, was in einem veränderten Bandenmuster deutlich wurde. Zusätzlich waren ME7-Prionen stabiler gegenüber proteolytischem Verdau, was eine Konsequenz aus den verschiedenen Glykosylierungsstufen sein kann. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass RML-Prionen aus kleineren und instabilen PrP^{Sc} Oligomeren zusammengesetzt sind als ME7-Prionen (Thackray et al., 2007). Interessanterweise konvertierten besonders diese kleineren Oligomere PrP^C sehr effizient, mit zunehmender Größe der PrP^{Sc}-Oligomere nahm diese Fähigkeit ab. (Kim et al., 2012). Möglicherweise ist dieses Phänomen auch die Ursache für die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede zwischen RML- und ME7-Prionen.

4. Diskussion

Während RML- und 22L-Prionen klassischerweise für Infektiositätsstudien genutzt werden, gibt es für 79A-Prionen weniger Arbeiten, die für Vergleiche herangezogen konnten. Ursprünglich stammen 79A-Prionen aus Hirnmaterial von Scrapie-infizierten Schafen, welches zunächst in Ziegen und anschließend in Mäusen passagiert wurde. Da sie nie direkt von Schafen entnommen wurden, wird vermutet, dass sie in Ziegen, die an sog. „goat-scrapie“ erkrankten, entstanden sind (Dickinson, 1976). Die N2a-Subklone (CAD Zellen, LD9 Zellen und PK1 Zellen) ließen sich mit 79A-Prionen infizieren, in diesem Zusammenhang fiel eine große Ähnlichkeit zu RML-Prionen auf. Die in dieser Studie verwendeten Kriterien bezogen auf die Infizierbarkeit der genannten Zell-Linien sowie die Reaktion auf die Prion-Inhibitoren Swainsonine und Kifunensine (Oelschlegel et al., 2012). Diese Beobachtung deckt sich nicht mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen, die zeigten, dass RK13+PrP-DC Zellen nicht mit 79A-, aber mit RML-Prionen infiziert werden konnten. Möglicherweise lässt sich dies durch den neuronalen, bzw. nicht-neuronalen Ursprung der in der zitierten Studie und in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zell-Linien erklären.

Die Fähigkeit von Prionen bestimmte Spezies infizieren zu können, andere jedoch nicht ist, ein neben der Existenz der diversen Prionen-Stämme ein weiteres, interessantes Kennzeichen dieser Gruppe von Krankheitserregern. Für eine erfolgreiche Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} müssen die Sequenz des Wirtproteins und die des von außen kommenden PrP^{Sc} kompatibel sein. Sequenzunterschiede können wiederum zu Konformationsänderungen von PrP führen, womit sich, wie bereits angesprochen, die Diversität der Prionstämme, aber auch die selektive Infektiosität von PrP^{Sc} erklären lässt (Chen and Gambetti, 2002; Jones and Surewicz, 2005; Vanik et al., 2004).

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigten, dass das Phänomen der unterschiedlichen Prionstämme im entwickelten Biolumineszenzassay reproduziert werden konnte. Dies eröffnet die Möglichkeit, weitere Aspekte, wie beispielsweise die Koinfektion von verschiedenen Prionstämmen zu untersuchen. Bereits seit den 80er Jahren ist bekannt, dass eine Koinfektion von Mäusen mit bestimmten Prion-Stämmen zu veränderten Inkubationszeiten und PrP^{Sc}-Ablagerungsmustern im Vergleich zur „einfachen“ Infektion führte. Dabei konnten „langsame“ Prion-Stämme die Inkubationszeit

4. Diskussion

von „schnelleren“ verlängern (Dickinson et al., 1975; Kimberlin and Walker, 1985). Auch neuere Studien zeigten, dass es bei der Infektion eines Wirtstieres mit zwei unterschiedlichen Prionstämmen zur Interaktion dieser beiden Stämme kam (Langenfeld et al., 2016). Anstatt ähnliche Versuche im Tiermodell durchzuführen, könnten verschiedene Prionstammkombinationen schnell und ressourcenschonend im Biolumineszenzassay getestet werden. Eine mögliche therapeutische Relevanz der Koinfektion mit Prionstämmen bleibt jedoch abzuwarten.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit wäre die Untersuchung von Zell- und Prionstamm-spezifischen Faktoren im Hinblick auf die Speziesbarriere. Dazu könnte das PrP-hGLuc-Konstrukt in weitere nicht-neuronale und neuronale Zelllinien übertragen und mit unterschiedlichen Prionstämmen infiziert werden, wobei auch die Ausweitung auf humanes oder bovines PrP möglich ist. Darüber hinaus sind bestimmte Polymorphismen des Gens für PrP bekannt, die eine Spezies mehr oder weniger anfällig für eine Prionerkrankung machen (Baylis and Goldmann, 2004; Collinge et al., 1991; Hauw et al., 2000; Lee et al., 2001). Beim Design der PrP-Sequenzen könnten diese berücksichtigt werden, um ihren Einfluss bei der Infektion mit unterschiedlichen Prionstämmen zu untersuchen. Es ist jedoch zu bedenken, dass es sich bei dem vorgestellten Experiment mit verschiedenen Prionstämmen um eine akute Infektion handelt, da das infektiöse Hirnhomogenat während der gesamten Inkubationszeit und auch der Biolumineszenzmessung in Kontakt mit den RK13+PrP-DC Zellen ist. Die Synthese von PrP^{Sc} in dieser Phase ist hauptsächlich vom PrP^{Sc}-Gehalt des Inokulums abhängig und führt nicht zwangsläufig zu einer stabilen, persistierenden Infektion, wobei Zell- bzw. Prion-spezifische Faktoren, die dies begünstigen, noch nicht geklärt sind (Vorberg et al., 2004). Prionstämme zeichnen sich auch dadurch aus, dass ihre charakteristischen Merkmale wie beispielsweise ihr Glykosylierungsprofil oder die Infektiosität reproduzierbar sind und über mehrere Passagen erhalten bleiben. Im Bezug auf den Biolumineszenzassay wäre es daher bei zukünftigen Experimenten interessant, die Zellen nach akuter Infektion ohne Hirnhomogenat weiter zu kultivieren und dabei regelmäßig das Biolumineszenzsignal zu messen.

4. Diskussion

4.7 Wirkstoff-Screening basierend auf dem Biolumineszenzassay

Die bisher diskutierten Ergebnisse zeigen, dass der in dieser Arbeit entwickelte Biolumineszenzassay genutzt werden konnte, um Aspekte zur PrP-Dimerisierung und Aggregation, zum Verhalten unterschiedlicher Prionstämme und zur Wirkung von QA zu untersuchen. Im folgenden wird erläutert, dass es zudem möglich war, im Rahmen eines Screenings, basierend auf dem Biolumineszenzassay, einen Wirkstoff zu finden, der RML-infizierte ScN2a-Zellen kurieren konnte. Prionerkrankungen enden für Mensch und Tier unweigerlich tödlich. Obwohl das Wissen, beispielsweise um die Struktur von PrP^C und PrP^{Sc}, die Mechanismen der Umwandlung und Fehlfaltung, die Verbreitung von PrP^{Sc} oder um mögliche Interaktionspartner, zusehends wächst, gibt es bis heute keine Medikamente oder Behandlungsmöglichkeiten. Die Ansätze, daran etwas zu ändern sind vielfältig und reichen von *in silico*, über *in vitro* bis zu *in vivo* Studien. Ansatzpunkte für mögliche Wirkstoffe sind etwa eine Reduktion der PrP^C-Konzentration als Substrat für die PrP^C-PrP^{Sc}-Umwandlung, die Inhibierung der PrP^C-PrP^{Sc}-Interaktion, das infektiöse PrP^{Sc} selbst oder die Behandlung der von PrP^{Sc} ausgelösten Neurodegeneration. Dabei wurden einige vielversprechende Wirkstoffe entdeckt. Die Übertragbarkeit von Ergebnissen, die im Zellkulturmodell gewonnen wurden, auf *in vivo*-Versuchsreihen war jedoch nicht immer gegeben. QA wirkt, wie bereits erwähnt, sehr effizient gegen PK-resistentes PrP^{Sc} in RML-Infizierten N2a-Zellen (Korth et al., 2001), im Mausmodell konnte jedoch kein Effekt beobachtet werden (Collins et al., 2002; Doh-ura et al., 2004). Pentosan Polysulphat (PPS) aus der Gruppe der Glycoaminoglycane wirkte auf Zellebene (Caughey et al., 1994; Caughey and Raymond, 1993) sowie in Prion-infizierten Mäusen (Doh-ura et al., 2004; Ehlers and Diringer, 1984) bei der Anwendung an CJD-Patienten war PPS jedoch wirkungslos. Einer der vielversprechendsten Ansätze scheint zurzeit die Immunisierung mit PrP-Antikörpern zu sein, da sie, wenn zu einem frühen Stadium der Infektion damit begonnen wird, das Einsetzen von neurologischen Symptomen bei Mäusen verzögern konnte (Trevitt and Collinge, 2006; White et al., 2003). Der einzige Ansatz, den Ausbruch der Erkrankung zu verhindern besteht im „Knock-out“ von PrP^C (Mallucci et al., 2003). Für die klinische Anwendung hat dies jedoch zur Zeit kaum Relevanz. In beiden zuletzt vorgestellten Ansätzen wird bereits auf die PrP^C-Konzentration im Infektionsprozess eingegriffen. Die Idee des im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Wirkstoff-

4. Diskussion

Screenings war es, zuerst Wirkstoffe zu finden, die die Dimerisierung von PrP^C inhibieren und anschließend die effektivsten Kandidaten auf infizierten ScN2a Zellen zu testen. Hinsichtlich der praktischen Handhabung hat diese Herangehensweise den Vorteil, dass zunächst ohne infizierte Zellen, also auf S1-Ebene, gearbeitet wird. Erst zu einem späteren Zeitpunkt und mit stark eingegrenzter Anzahl an Wirkstoffen werden infizierte Zellen benötigt. Von 1650 Wirkstoffen wirkten 167 spezifisch auf PrP^C-Dimere, indem sie das Biolumineszenzsignal im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle senkten, ohne toxisch zu sein oder Nebenwirkungen, beispielsweise auf das Substrat, zu zeigen. Die 13 effektivsten Dimer-Inhibitoren wurden auf ScN2a-Zellen getestet. In zukünftigen Experimenten könnte die Anzahl jedoch noch ausgeweitet werden. Einer dieser 13 Wirkstoffe, JTC-801, war wirksam gegen PK-resistentes PrP^{Sc} bei RML-infizierten ScN2a Zellen. Als EC₅₀ wurde eine Konzentration von 383 nM bestimmt, zum Vergleich dazu liegt die EC₅₀ von QA bei 300 nM (Korth et al., 2001). Somit ist JTC-801 in Bezug auf die Wirkung gegen RML-Prionen ähnlich sensitiv wie QA. JTC-801 und QA besitzen beide einen Quinolin-Ring und gehören zur Gruppe der Quinolin-Derivate. Die Effektivität der Anti-Prion-Wirkung ist dabei abhängig von der Struktur des Quinolin-Rings: Quinolin-Derivate mit einer Seitenkette an Position 2 des Quinolin-Rings sind effektiver als Chemikalien, die eine Seitenkette an der vierten Position haben. Ein Austausch des Quinolin-Rings durch einen Pyridin-Ring führte ebenfalls zu einer geringeren Effektivität (Murakami-Kubo et al., 2004). Somit kann durch gezielte Austauschreaktionen eine Optimierung der Effektivität von Wirkstoffen vorgenommen werden. Diese bezieht sich allerdings auf die im Zellkulturmodell bestimmte EC₅₀, also die Wirkstoffkonzentration im Zellkulturmedium, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. *In vivo*-Systemen müssen jedoch pharmokokinetische Aspekte berücksichtigt werden, etwa der Unterschied zwischen der Gesamtwirkstoffkonzentration und der freiverfügbaren Wirkstoffkonzentration. Eine mögliche Erklärung für die Wirkungslosigkeit von QA in CJD-Patienten und Scrapie-infizierten Schafen ist, dass es selbst bei toxischen verabreichten Konzentrationen von QA nicht möglich ist, eine Konzentration von 300 nM im Liquor zu erreichen (Gayrard et al., 2005). Die gleiche Studie fand auch heraus, dass QA die Blut-Hirn-Schranke überwindet und sich im Gehirn in den Lysosomen anreichert. Möglicherweise ist die QA-Konzentration nicht der limitierende Faktor, sondern der Wirkmechanismus, der in der Zellkultur effektiv ist, aber nicht auf die Situation *in vivo*

4. Diskussion

übertragen werden kann. Bei Langzeit-QA-Behandlung von Mäusen und teilungsinhibierten Zellen kam es zudem zur Bildung von QA-resistentem PrP^{Sc}, das im Vergleich zu unbehandeltem PrP^{Sc} eine geringere Stabilität seiner Konformation aufwies (Ghaemmaghami et al., 2009). Eine Subpopulation von QA-resistentem PrP^{Sc} könnte ein weiterer Grund für die Ineffektivität von QA *in vivo* sein. Auch die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass QA spezifisch auf PrP^{Sc} wirkte, da eine QA-Behandlung von nicht-infizierten RK13+PrP-DC Zellen keinen Einfluss auf die PrP-Dimerisation hatte; JTC-801 wirkte dagegen bereits auf Dimerebene. JTC-801 ist ein Antagonist des Nociceptin/Orphanin FQ-Rezeptors und ist damit hirngängig. Im Tierversuch zeigte JTC-801 eine schmerzlindernde Wirkung (Shinkai et al., 2000; Yamada et al., 2002). Da aus diesem Zusammenhang schon Daten zur Dosierung für Mausversuche existieren, wäre es denkbar JTC-801 in Prion-infizierten Mäusen zu testen. Am Beispiel der zuvor diskutierten Anti-Prion-Wirkstoffe zeigt sich jedoch deutlich, dass Wirkstoffe, die auf Zellkulturebene effektiv sind, nicht automatisch auch *in vivo* wirken. Die Wirksamkeit der Wirkstoffe bezog sich, wie in den zitierten Zellkulturstudien, auch in dieser Arbeit auf die Effektivität gegenüber PK-resistentem PrP. Wie bereits zu Beginn der Diskussion angesprochen, ist PK-resistentes PrP^{Sc} zwar eng mit Prionerkrankungen assoziiert, bei CJD oder FFI existieren jedoch auch PK-sensitive, lösliche PrP-Oligomere und eine geringe Menge an PK-resistentem PrP^{Sc} (Cronier et al., 2008; Jackson et al., 2009; Pastrana et al., 2006; Sajani et al., 2012; Tzaban et al., 2002). Daher war die Idee der vorliegenden Arbeit, ein Testverfahren zu entwickeln, das unabhängig von PK-resistentem PrP^{Sc} PrP-Dimere detektieren kann. Auch zeigt eine kürzlich veröffentlichte Studie, dass die protektive Wirkung des V127-Polymorphismus des Prionproteins darin besteht, die PrP-Dimerisierung und damit auch die Bildung von stabilen Fibrillen zu erschweren (Zhou et al., 2016). Dies spricht für die zugrunde liegende Idee, bei der Suche nach Anti-Prion-Wirkstoffen bereits PrP-Dimere mit einzubeziehen, da die Dimerisation von PrP offenbar ein wichtiger Schritt bei der Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} ist.

5. Abkürzungsverzeichnis

5. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	vollständiger Name
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Disease
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CWD	chronisch zehrende Erkrankung der Hirschartigen (<i>Chronic wasting disease</i>)
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	Fetales Rinderserum (engl.: fetal bovine serum)
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot
g	G-Kraft
G	Glycin
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde(n)
H	Histidin
HD	Hydrophobe Domäne
hGLuc	Humanisierte Gaussia Luziferase
IRES	Internal ribosomal entry site
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Lysogeny Broth-Medium
mA	Milli-Ampere
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minute(n)
mM	Millimolar
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid)
N2a Zellen	murine Neuroblast-Zellen
NGS	<i>Normal goat serum</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
N-Terminus	Amino-Terminus

5. Abkürzungsverzeichnis

p	Wahrscheinlichkeit (engl.: probability)
P	Prolin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCA	Protein-fragment complementation assay
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pen/Strep	Penizillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PK	Proteinase K
Prion	<i>Proteinaceous infectious particle</i>
PrP	Prion-Protein
PrPC	zelluläres Prion Protein
PrPSc	Scrapie Prion Protein
Q	Glutamin
RK13-Zellen	Nierenepithelzellen von Kaninchen (<i>Rabbit kidney epithelial cells</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
ScN2a-Zellen	prioninfizierte N2a-Zellen
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,05% Tween-20
TSE	<i>Transmissible spongiform encephalopathies</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
vgl.	Vergleiche/Vergleicht
W	Tryptophan
w/v	Gewicht/Volumen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp, wildtypisch

6. Zusammenfassung

Prionenerkrankungen wie z. B. die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit bei Menschen oder die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rindern gehören zu den neurodegenerativen Erkrankungen. Grundlage aller Prionen-Krankheiten ist das zelluläre Prion-Protein (PrP^C) und die infektiöse Isoform PrP^{Sc}, die im Gegensatz zu PrP^C vermehrt β -Faltblattstrukturen und Aggregate formt. Es gibt Hinweise darauf, dass PrP^C Dimere bilden kann und diese eine Grundlage für die Entstehung von PrP^{Sc}-Aggregaten sein könnten. Um die Dimerisierung von PrP zu untersuchen, wurden zwei Fusionsprodukte aus PrP mit der N- bzw. C-terminalen Hälfte von *Gussia* Luziferase kloniert, die an der Oberfläche von RK13 Zellen exprimiert wurden. RK13 Zellen exprimieren endogen kein PrP^C. Dimerisierte PrP^C an der Oberfläche von transfizierten RK13 Zellen, komplementierten sich beide Luziferasehälften und wurden biolumineszent. Die Dimerisierung von PrP^C konnte mit Antikörpern, die gegen die zentrale Region von PrP^C gerichtet waren, blockiert werden. Dies zeigte, dass die zentrale Region für die Dimerisierung von PrP^C eine wichtige Rolle spielte. Eine Infektion der RK13-Zellen mit Hirnhomogenat erkrankter Mäuse, die sechs verschiedene mausadaptierte Prionstämme beinhalteten, führte zu einem Anstieg des Biolumineszenzsignals, während Hirnhomogenat gesunder Tiere keine Auswirkungen auf das Biolumineszenzsignal hatte. Die Behandlung mit dem Antiprion-Wirkstoff Quinacrine führte nur bei den infizierten Zellen zu einer Reduktion des Biolumineszenzsignals.

Darüberhinaus wurde die Biolumineszenzuntersuchung dazu genutzt, Wirkstoffe zu identifizieren, die gegen Prionen wirksam sein könnten. Dazu wurde eine Sammlung von 1650 Wirkstoffen verwendet. Wirkstoffe, die ohne toxisch zu sein, die Dimerisierung von PrP^C inhibierten, wurden an prioninfizierten N2a-Zellen auf ihre Wirksamkeit untersucht, diese Zellen von PrP^{Sc} zu bereinigen. Dabei wurde der Wirkstoff JTC-801 identifiziert, der bereits in nanomolaren Konzentrationen die PrP^{Sc}-Menge in den infizierten Zellen senken konnte.

Die mithilfe der Biolumineszenzuntersuchung erhobenen Ergebnisse zeigten, dass PrP an der Zelloberfläche als Dimer vorlag, wobei die Zentrale Region des Proteins im Prozess der Dimerisierung eine wichtige Rolle spielte. Eine Prioninfektion der RK13-Zellen führte zu einem Anstieg des Biolumineszenzsignals. Die Biolumineszenz-

6. Zusammenfassung

untersuchung konnte zudem genutzt werden, einen Wirkstoff zu identifizieren, der prioninfizierte N2a-Zellen von PrP^{Sc} bereinigen konnte. Daraus könnte abgeleitet werden, dass die Dimerisierung von PrP^C einen zentralen Schritt bei der Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} darstellt.

7. Summary

7. Summary

Prion diseases like Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) are fatal neurodegenerative disorders that are triggered by misfolding of the cellular prion protein (PrP^{C}) to an infectious isoform rich in β -sheet structure termed PrP^{Sc} . There is evidence that PrP^{C} possibly forms dimers indicating that dimerization of PrP^{C} may be an essential intermediate step for the formation of PrP^{Sc} aggregates upon infection.

To study PrP dimerization and PrP aggregation upon infection, a bimolecular complementation assay was developed using RK13 cells that lack endogenous PrP expression and stably expressed two fusion constructs between PrP and each half of split Gaussia luciferase. In these cells bioluminescence only occurred when PrP dimerized or aggregated and the two split luciferase halves complemented each other.

Using a panel of eight antibodies directed against different PrP domains, the central domain of PrP^{C} was identified to be critical for dimerization.

Unlike normal brain homogenate infection of RK13 cells with brain homogenates from diseased animals containing six different mouse-adapted prion strains, RML, 22L, ME7, 87V, 79A, and 22A, lead to an increase in bioluminescence. In contrast, treatment of chronically infected but not uninfected RK13 cells with the anti-prion compound quinacrine reduced bioluminescence.

Finally, a compound-screening with a compound library including 1650 bioactive compounds based on the bimolecular complementation assay identified JTC-801 as one compound that inhibited PrP^{C} -dimerization. Treatment of ScN2a cells with JTC-801 reduced PrP^{Sc} levels in these cells at nanomolar concentrations.

Overall, these results showed that PrP^{C} clearly dimerizes in cells and that prion infection led to increased bioluminescence in the newly developed bimolecular complementation assay. The identification of JTC-801 as a bioactive compound that inhibited PrP^{C} -dimerization and reduced PrP^{Sc} -levels in ScN2a cells at nanomolar concentrations suggested that PrP^{C} dimerization may be a critical step in the conversion process of PrP^{C} to PrP^{Sc} .

8. Literaturverzeichnis

8. Literaturverzeichnis

A.G. Dickinson, G.W.O. (1979). A.G. Dickinson, G.W. Outram. WJ Hadlow, SB Prusiner (Eds), *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System*, Academic Press, New York.

Aguzzi, A. (2006). Prion diseases of humans and farm animals: epidemiology, genetics, and pathogenesis. *J Neurochem* 97, 1726-1739.

Aguzzi, A., Sigurdson, C., and Heikenwaelder, M. (2008). Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 3, 11-40.

Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A., and Clarke, M.C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214, 764-766.

Atarashi, R., Moore, R.A., Sim, V.L., Hughson, A.G., Dorward, D.W., Onwubiko, H.A., Priola, S.A., and Caughey, B. (2007). Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein. *Nat Methods* 4, 645-650.

Atarashi, R., Satoh, K., Sano, K., Fuse, T., Yamaguchi, N., Ishibashi, D., Matsubara, T., Nakagaki, T., Yamanaka, H., Shirabe, S., *et al.* (2011). Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med* 17, 175-178.

Bainbridge, J., and Walker, K.B. (2005). The normal cellular form of prion protein modulates T cell responses. *Immunol Lett* 96, 147-150.

Baldwin, M.A., Pan, K.M., Nguyen, J., Huang, Z., Groth, D., Serban, A., Gasset, M., Mehlhorn, I., Fletterick, R.J., Cohen, F.E., *et al.* (1994). Spectroscopic characterization of conformational differences between PrPC and PrPSc: an alpha-helix to beta-sheet transition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 343, 435-441.

Barmada, S.J., and Harris, D.A. (2005). Visualization of prion infection in transgenic mice expressing green fluorescent protein-tagged prion protein. *J Neurosci* 25, 5824-5832.

Barret, A., Tagliavini, F., Forloni, G., Bate, C., Salmons, M., Colombo, L., De Luigi, A., Limido, L., Suardi, S., Rossi, G., *et al.* (2003). Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases. *J Virol* 77, 8462-8469.

Baylis, M., and Goldmann, W. (2004). The genetics of scrapie in sheep and goats. *Curr Mol Med* 4, 385-396.

Belay, E.D. (1999). Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu Rev Microbiol* 53, 283-314.

Belay, E.D., Holman, R.C., and Schonberger, L.B. (2005). Creutzfeldt-Jakob disease surveillance and diagnosis. *Clin Infect Dis* 41, 834-836.

8. Literaturverzeichnis

Bendheim, P.E., Brown, H.R., Rudelli, R.D., Scala, L.J., Goller, N.L., Wen, G.Y., Kascsak, R.J., Cashman, N.R., and Bolton, D.C. (1992). Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* 42, 149-156.

Bessen, R.A., and Marsh, R.F. (1992a). Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol* 66, 2096-2101.

Bessen, R.A., and Marsh, R.F. (1992b). Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J Gen Virol* 73 (Pt 2), 329-334.

Bessen, R.A., and Marsh, R.F. (1994). Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* 68, 7859-7868.

Bessen, R.A., Shearin, H., Martinka, S., Boharski, R., Lowe, D., Wilham, J.M., Caughey, B., and Wiley, J.A. (2010). Prion shedding from olfactory neurons into nasal secretions. *PLoS Pathog* 6, e1000837.

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.

Bremer, J., Baumann, F., Tiberi, C., Wessig, C., Fischer, H., Schwarz, P., Steele, A.D., Toyka, K.V., Nave, K.A., Weis, J., *et al.* (2010). Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci* 13, 310-318.

Brown, D.R. (2001). Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci* 24, 85-90.

Bruce, M.E. (1993). Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull* 49, 822-838.

Budka, H., Aguzzi, A., Brown, P., Brucher, J.M., Bugiani, O., Gullotta, F., Haltia, M., Hauw, J.J., Ironside, J.W., Jellinger, K., *et al.* (1995). Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol* 5, 459-466.

Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, 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., Aguet, 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.

8. Literaturverzeichnis

Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., and Soto, C. (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 121, 195-206.

Caughey, B., Baron, G.S., Chesebro, B., and Jeffrey, M. (2009). Getting a grip on prions: oligomers, amyloids, and pathological membrane interactions. *Annu Rev Biochem* 78, 177-204.

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., Raymond, G.J., and Bessen, R.A. (1998). Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem* 273, 32230-32235.

Caughey, B., Brown, K., Raymond, G.J., Katzenstein, G.E., and Thresher, W. (1994). Binding of the protease-sensitive form of PrP (prion protein) to sulfated glycosaminoglycan and congo red [corrected]. *J Virol* 68, 2135-2141.

Caughey, B., and Raymond, G.J. (1993). Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol* 67, 643-650.

Caughey, B., Raymond, G.J., Kocisko, D.A., and Lansbury, P.T., Jr. (1997). Scrapie infectivity correlates with converting activity, protease resistance, and aggregation of scrapie-associated prion protein in guanidine denaturation studies. *J Virol* 71, 4107-4110.

Caughey, B.W., Dong, A., Bhat, K.S., Ernst, D., Hayes, S.F., and Caughey, W.S. (1991). Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30, 7672-7680.

Chen, B., Morales, R., Barria, M.A., and Soto, C. (2010). Estimating prion concentration in fluids and tissues by quantitative PMCA. *Nat Methods* 7, 519-520.

Chen, S.G., and Gambetti, P. (2002). A journey through the species barrier. *Neuron* 34, 854-856.

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.

Cobb, N.J., Sonnichsen, F.D., McHaourab, H., and Surewicz, W.K. (2007). Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18946-18951.

Collinge, J., Sidle, K.C., Meads, J., Ironside, J., and Hill, A.F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383, 685-690.

Collinge, J., Palmer, M.S., and Dryden, A.J. (1991). Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 337, 1441-1442.

8. Literaturverzeichnis

Collinge, J., Sidle, K.C., Meads, J., Ironside, J., and Hill, A.F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* **383**, 685-690.

Collins, S.J., Lewis, V., Brazier, M., Hill, A.F., Fletcher, A., and Masters, C.L. (2002). Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model. *Ann Neurol* **52**, 503-506.

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.

Courageot, M.P., Daude, N., Nonno, R., Paquet, S., Di Bari, M.A., Le Dur, A., Chapuis, J., Hill, A.F., Agrimi, U., Laude, H., *et al.* (2008). A cell line infectible by prion strains from different species. *J Gen Virol* **89**, 341-347.

Cronier, S., Gros, N., Tattum, M.H., Jackson, G.S., Clarke, A.R., Collinge, J., and Wadsworth, J.D. (2008). Detection and characterization of proteinase K-sensitive disease-related prion protein with thermolysin. *Biochem J* **416**, 297-305.

DeMarco, M.L., and Daggett, V. (2004). From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2293-2298.

Diringer, H., Beekes, M., Ozel, M., Simon, D., Queck, I., Cardone, F., Pocchiari, M., and Ironside, J.W. (1997). Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size. *Intervirology* **40**, 238-246.

Dickinson, A.G. (1976). Scrapie in sheep and goats. *Front Biol* **44**, 209-241.

Dickinson, A.G., Fraser, H., and Outram, G.W. (1975). Scrapie incubation time can exceed natural lifespan. *Nature* **256**, 732-733.

Doh-ura, K., Ishikawa, K., Murakami-Kubo, I., Sasaki, K., Mohri, S., Race, R., and Iwaki, T. (2004). Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol* **78**, 4999-5006.

Doh-Ura, K., Iwaki, T., and Caughey, B. (2000). Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol* **74**, 4894-4897.

Doolan, K.M., and Colby, D.W. (2015). Conformation-dependent epitopes recognized by prion protein antibodies probed using mutational scanning and deep sequencing. *J Mol Biol* **427**, 328-340.

Downing, D.T., and Lazo, N.D. (1999). Molecular modelling indicates that the pathological conformations of prion proteins might be beta-helical. *Biochem J* **343 Pt 2**, 453-460.

8. Literaturverzeichnis

Edgeworth, J.A., Jackson, G.S., Clarke, A.R., Weissmann, C., and Collinge, J. (2009). Highly sensitive, quantitative cell-based assay for prions adsorbed to solid surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3479-3483.

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.

Ehlers, B., and Diringler, H. (1984). Dextran sulphate 500 delays and prevents mouse scrapie by impairment of agent replication in spleen. *J Gen Virol* 65 (Pt 8), 1325-1330.

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.

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.

Fraser, H. (1993). Diversity in the neuropathology of scrapie-like diseases in animals. *Br Med Bull* 49, 792-809.

Gabizon, R., McKinley, M.P., and Prusiner, S.B. (1987). Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 4017-4021.

Gayraud, V., Picard-Hagen, N., Viguie, C., Laroute, V., Andreoletti, O., and Toutain, P.L. (2005). A possible pharmacological explanation for quinacrine failure to treat prion diseases: pharmacokinetic investigations in a ovine model of scrapie. *Br J Pharmacol* 144, 386-393.

Georgieva, D., Schwark, D., von Bergen, M., Redecke, L., Genov, N., and Betzel, C. (2006). Interactions of recombinant prions with compounds of therapeutical significance. *Biochem Biophys Res Commun* 344, 463-470.

Ghaemmighami, S., Ahn, M., Lessard, P., Giles, K., Legname, G., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (2009). Continuous quinacrine treatment results in the formation of drug-resistant prions. *PLoS Pathog* 5, e1000673.

Goni, F., Prelli, F., Schreiber, F., Scholtzova, H., Chung, E., Kascsak, R., Brown, D.R., Sigurdsson, E.M., Chabalgoity, J.A., and Wisniewski, T. (2008). High titers of mucosal and systemic anti-PrP antibodies abrogate oral prion infection in mucosal-vaccinated mice. *Neuroscience* 153, 679-686.

Goold, R., Rabbanian, S., Sutton, L., Andre, R., Arora, P., Moonga, J., Clarke, A.R., Schiavo, G., Jat, P., Collinge, J., *et al.* (2011). Rapid cell-surface prion protein conversion revealed using a novel cell system. *Nat Commun* 2, 281.

8. Literaturverzeichnis

Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S.B., and Cohen, F.E. (2004). Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8342-8347.

Haire, L.F., Whyte, S.M., Vasisht, N., Gill, A.C., Verma, C., Dodson, E.J., Dodson, G.G., and Bayley, P.M. (2004). The crystal structure of the globular domain of sheep prion protein. *J Mol Biol* 336, 1175-1183.

Haraguchi, T., Fisher, S., Olofsson, S., Endo, T., Groth, D., Tarentino, A., Borchelt, D.R., Teplow, D., Hood, L., Burlingame, A., *et al.* (1989). Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* 274, 1-13.

Harrison, P.M., Chan, H.S., Prusiner, S.B., and Cohen, F.E. (1999). Thermodynamics of model prions and its implications for the problem of prion protein folding. *J Mol Biol* 286, 593-606.

Hauw, J.J., Sazdovitch, V., Laplanche, J.L., Peoc'h, K., Kopp, N., Kemeny, J., Privat, N., Delasnerie-Laupretre, N., Brandel, J.P., Deslys, J.P., *et al.* (2000). Neuropathologic variants of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and codon 129 of PrP gene. *Neurology* 54, 1641-1646.

Hope, J. (1994). The nature of the scrapie agent: the evolution of the virino. *Ann N Y Acad Sci* 724, 282-289.

Hsiao, K., and Prusiner, S.B. (1990). Inherited human prion diseases. *Neurology* 40, 1820-1827.

Huang, Z., Prusiner, S.B., and Cohen, F.E. (1996). Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Fold Des* 1, 13-19.

Imran, M., and Mahmood, S. (2011). An overview of animal prion diseases. *Viol J* 8, 493.

Hundt, C., Peyrin, J.M., Haik, S., Gauczynski, S., Leucht, C., Rieger, R., Riley, M.L., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmezas, C.I., *et al.* (2001). Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *EMBO J* 20, 5876-5886.

Imran, M., and Mahmood, S. (2011). An overview of animal prion diseases. *Viol J* 8, 493.

Ironside, J.W., Bishop, M.T., Connolly, K., Hegazy, D., Lowrie, S., Le Grice, M., Ritchie, D.L., McCardle, L.M., and Hilton, D.A. (2006). Variant Creutzfeldt-Jakob disease: prion protein genotype analysis of positive appendix tissue samples from a retrospective prevalence study. *BMJ* 332, 1186-1188.

Jackson, G.S., Murray, I., Hosszu, L.L., Gibbs, N., Waltho, J.P., Clarke, A.R., and Collinge, J. (2001). Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8531-8535.

8. Literaturverzeichnis

Jarrett, J.T., and Lansbury, P.T., Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73, 1055-1058.

Jackson, W.S., Borkowski, A.W., Faas, H., Steele, A.D., King, O.D., Watson, N., Jasanoff, A., and Lindquist, S. (2009). Spontaneous generation of prion infectivity in fatal familial insomnia knockin mice. *Neuron* 63, 438-450.

Jones, E.M., and Surewicz, W.K. (2005). Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids. *Cell* 121, 63-72.

Jones, M., Peden, A.H., Prowse, C.V., Groner, A., Manson, J.C., Turner, M.L., Ironside, J.W., MacGregor, I.R., and Head, M.W. (2007). In vitro amplification and detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease PrPSc. *J Pathol* 213, 21-26.

Kahana, E., Alter, M., Braham, J., and Sofer, D. (1974). Creutzfeldt-jakob disease: focus among Libyan Jews in Israel. *Science* 183, 90-91.

Kamatari, Y.O., Hayano, Y., Yamaguchi, K., Hosokawa-Muto, J., and Kuwata, K. (2013). Characterizing antiprion compounds based on their binding properties to prion proteins: implications as medical chaperones. *Protein Sci* 22, 22-34.

Khalili-Shirazi, A., Summers, L., Linehan, J., Mallinson, G., Anstee, D., Hawke, S., Jackson, G.S., and Collinge, J. (2005). PrP glycoforms are associated in a strain-specific ratio in native PrPSc. *J Gen Virol* 86, 2635-2644.

Kimberlin, R.H., and Walker, C.A. (1985). Competition between strains of scrapie depends on the blocking agent being infectious. *Intervirology* 23, 74-81.

Kim, C., Haldiman, T., Surewicz, K., Cohen, Y., Chen, W., Blevins, J., Sy, M.S., Cohen, M., Kong, Q., Telling, G.C., *et al.* (2012). Small protease sensitive oligomers of PrPSc in distinct human prions determine conversion rate of PrP(C). *PLoS Pathog* 8, e1002835.

Klingenstein, R., Lober, S., Kujala, P., Godsave, S., Leliveld, S.R., Gmeiner, P., Peters, P.J., and Korth, C. (2006). Tricyclic antidepressants, quinacrine and a novel, synthetic chimera thereof clear prions by destabilizing detergent-resistant membrane compartments. *J Neurochem* 98, 748-759.

Klohn, P.C., Farmer, M., Linehan, J.M., O'Malley, C., Fernandez de Marco, M., Taylor, W., Farrow, M., Khalili-Shirazi, A., Brandner, S., and Collinge, J. (2012). PrP antibodies do not trigger mouse hippocampal neuron apoptosis. *Science* 335, 52.

Knaus, K.J., Morillas, M., Swietnicki, W., Malone, M., Surewicz, W.K., and Yee, V.C. (2001). Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat Struct Biol* 8, 770-774.

8. Literaturverzeichnis

Kocisko, D.A., Come, J.H., Priola, S.A., Chesebro, B., Raymond, G.J., Lansbury, P.T., and Caughey, B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* *370*, 471-474.

Korth, C., May, B.C., Cohen, F.E., and Prusiner, S.B. (2001). Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 9836-9841.

Krasemann, S., Zerr, I., Weber, T., Poser, S., Kretzschmar, H., Hunsmann, G., and Bodemer, W. (1995). Prion disease associated with a novel nine octapeptide repeat insertion in the PRNP gene. *Brain Res Mol Brain Res* *34*, 173-176.

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

Langedijk, J.P., Fuentes, G., Boshuizen, R., and Bonvin, A.M. (2006). Two-rung model of a left-handed beta-helix for prions explains species barrier and strain variation in transmissible spongiform encephalopathies. *J Mol Biol* *360*, 907-920.

Langenfeld, K.A., Shikiya, R.A., Kincaid, A.E., and Bartz, J.C. (2016). Incongruity between Prion Conversion and Incubation Period following Coinfection. *J Virol* *90*, 5715-5723.

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.

Lee, H.S., Brown, P., Cervenakova, L., Garruto, R.M., Alpers, M.P., Gajdusek, D.C., and Goldfarb, L.G. (2001). Increased susceptibility to Kuru of carriers of the PRNP 129 methionine/methionine genotype. *J Infect Dis* *183*, 192-196.

Leucht, C., Simoneau, S., Rey, C., Vana, K., Rieger, R., Lasmezas, C.I., and Weiss, S. (2003). The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. *EMBO Rep* *4*, 290-295.

Liao, Y.C., Lebo, R.V., Clawson, G.A., and Smuckler, E.A. (1986). Human prion protein cDNA: molecular cloning, chromosomal mapping, and biological implications. *Science* *233*, 364-367.

Linden, R., Martins, V.R., Prado, M.A., Cammarota, M., Izquierdo, I., and Brentani, R.R. (2008). Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* *88*, 673-728.

Mahal, S.P., Baker, C.A., Demczyk, C.A., Smith, E.W., Julius, C., and Weissmann, C. (2007). Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 20908-20913.

8. Literaturverzeichnis

Mahal, S.P., Demczyk, C.A., Smith, E.W., Jr., Klohn, P.C., and Weissmann, C. (2008). Assaying prions in cell culture: the standard scrapie cell assay (SSCA) and the scrapie cell assay in end point format (SCEPA). *Methods Mol Biol* 459, 49-68.

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.

Manson, J.C., Jamieson, E., Baybutt, H., Tuzi, N.L., Barron, R., McConnell, I., Somerville, R., Ironside, J., Will, R., Sy, M.S., *et al.* (1999). A single amino acid alteration (101L) introduced into murine PrP dramatically alters incubation time of transmissible spongiform encephalopathy. *EMBO J* 18, 6855-6864.

Manson, J.C., Clarke, A.R., Hooper, M.L., Aitchison, L., McConnell, I., and Hope, J. (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 8, 121-127.

Mattei, V., Garofalo, T., Misasi, R., Circella, A., Manganelli, V., Lucania, G., Pavan, A., and Sorice, M. (2004). Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. *FEBS Lett* 560, 14-18.

Mattei, V., Garofalo, T., Misasi, R., Circella, A., Manganelli, V., Lucania, G., Pavan, A., and Sorice, M. (2004). Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. *FEBS Lett* 560, 14-18.

Masliyah, E., Rockenstein, E., Adame, A., Alford, M., Crews, L., Hashimoto, M., Seubert, P., Lee, M., Goldstein, J., Chilcote, T., *et al.* (2005). Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron* 46, 857-868.

McCarthy, J.M., Franke, M., Resenberger, U.K., Waldron, S., Simpson, J.C., Tatzelt, J., Appelhans, D., and Rogers, M.S. (2013). Anti-prion drug mPPIg5 inhibits PrP(C) conversion to PrP(Sc). *PLoS One* 8, e55282.

Mead, S., Stumpf, M.P., Whitfield, J., Beck, J.A., Poulter, M., Campbell, T., Uphill, J.B., Goldstein, D., Alpers, M., Fisher, E.M., *et al.* (2003). Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. *Science* 300, 640-643.

Meyer, R.K., Lustig, A., Oesch, B., Fatzer, R., Zurbriggen, A., and Vandevelde, M. (2000). A monomer-dimer equilibrium of a cellular prion protein (PrP^C) not observed with recombinant PrP. *J Biol Chem* 275, 38081-38087.

Miller, M.W., and Williams, E.S. (2004). Chronic wasting disease of cervids. *Curr Top Microbiol Immunol* 284, 193-214.

Moore, R.A., Vorberg, I., and Priola, S.A. (2005). Species barriers in prion diseases--brief review. *Arch Virol Suppl*, 187-202.

8. Literaturverzeichnis

Morrissey, M.P., and Shakhnovich, E.I. (1999). Evidence for the role of PrP(C) helix 1 in the hydrophilic seeding of prion aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11293-11298.

Mornon, J.P., Prat, K., Dupuis, F., Boisset, N., and Callebaut, I. (2002). Structural features of prions explored by sequence analysis. II. A PrP(Sc) model. *Cell Mol Life Sci* 59, 2144-2154.

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.

Murakami-Kubo, I., Doh-Ura, K., Ishikawa, K., Kawatake, S., Sasaki, K., Kira, J., Ohta, S., and Iwaki, T. (2004). Quinoline derivatives are therapeutic candidates for transmissible spongiform encephalopathies. *J Virol* 78, 1281-1288.

Oelschlegel, A.M., Fallahi, M., Ortiz-Umpierre, S., and Weissmann, C. (2012). The extended cell panel assay characterizes the relationship of prion strains RML, 79A, and 139A and reveals conversion of 139A to 79A-like prions in cell culture. *J Virol* 86, 5297-5303.

Orru, C.D., Wilham, J.M., Hughson, A.G., Raymond, L.D., McNally, K.L., Bossers, A., Ligios, C., and Caughey, B. (2009). Human variant Creutzfeldt-Jakob disease and sheep scrapie PrP(res) detection using seeded conversion of recombinant prion protein. *Protein Eng Des Sel* 22, 515-521.

Orru, C.D., Wilham, J.M., Raymond, L.D., Kuhn, F., Schroeder, B., Raeber, A.J., and Caughey, B. (2011). Prion disease blood test using immunoprecipitation and improved quaking-induced conversion. *MBio* 2, e00078-00011.

Orru, C.D., Wilham, J.M., Vascellari, S., Hughson, A.G., and Caughey, B. (2012). New generation QuIC assays for prion seeding activity. *Prion* 6, 147-152.

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

Pankiewicz, J., Prelli, F., Sy, M.S., Kascsak, R.J., Kascsak, R.B., Spinner, D.S., Carp, R.I., Meeker, H.C., Sadowski, M., and Wisniewski, T. (2006). Clearance and prevention of prion infection in cell culture by anti-PrP antibodies. *Eur J Neurosci* 23, 2635-2647.

Pastrana, M.A., Sajnani, G., Onisko, B., Castilla, J., Morales, R., Soto, C., and Requena, J.R. (2006). Isolation and characterization of a proteinase K-sensitive PrPSc fraction. *Biochemistry* 45, 15710-15717.

Pattison, I.H., and Millson, G.C. (1961). Further experimental observations on scrapie. *J Comp Pathol* 71, 350-359.

8. Literaturverzeichnis

Peden, A.H., McGuire, L.I., Appleford, N.E., Mallinson, G., Wilham, J.M., Orru, C.D., Caughey, B., Ironside, J.W., Knight, R.S., Will, R.G., *et al.* (2012). Sensitive and specific detection of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease brain prion protein using real-time quaking-induced conversion. *J Gen Virol* 93, 438-449.

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.

Peretz, D., Williamson, R.A., Legname, G., Matsunaga, Y., Vergara, J., Burton, D.R., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., and Scott, M.R. (2002). A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain. *Neuron* 34, 921-932.

Perini, F., Frangione, B., and Prelli, F. (1996). Prion protein released by platelets. *Lancet* 347, 1635-1636.

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.

Piccardo, P., Manson, J.C., King, D., Ghetti, B., and Barron, R.M. (2007). Accumulation of prion protein in the brain that is not associated with transmissible disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4712-4717.

Pocchiari, M., Puopolo, M., Croes, E.A., Budka, H., Gelpi, E., Collins, S., Lewis, V., Sutcliffe, T., Guilivi, A., Delasnerie-Laupretre, N., *et al.* (2004). Predictors of survival in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and other human transmissible spongiform encephalopathies. *Brain* 127, 2348-2359.

Priola, S.A., Caughey, B., Wehrly, K., and Chesebro, B. (1995). A 60-kDa prion protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP. *J Biol Chem* 270, 3299-3305.

Prusiner, S.B. (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13363-13383.

Prusiner, S.B., and DeArmond, S.J. (1990). Prion diseases of the central nervous system. *Monogr Pathol*, 86-122.

Prusiner, S.B., Groth, D., Serban, A., Stahl, N., and Gabizon, R. (1993). Attempts to restore scrapie prion infectivity after exposure to protein denaturants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2793-2797.

Prusiner, S.B., Groth, D.F., Bolton, D.C., Kent, S.B., and Hood, L.E. (1984). Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* 38, 127-134.

Prusiner, S.B., Scott, M., Foster, D., Pan, K.M., Groth, D., Mirinda, C., Torchia, M., Yang, S.L., Serban, D., Carlson, G.A., *et al.* (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 63, 673-686.

8. Literaturverzeichnis

Remy, I., and Michnick, S.W. (2006). A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase. *Nat Methods* 3, 977-979.

Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., and Wuthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* 382, 180-182.

Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R., and Wuthrich, K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett* 413, 282-288.

Saa, P., Castilla, J., and Soto, C. (2006a). Presymptomatic detection of prions in blood. *Science* 313, 92-94.

Saa, P., Castilla, J., and Soto, C. (2006b). Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *J Biol Chem* 281, 35245-35252.

Saborio, G.P., Permanne, B., and Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411, 810-813.

Safar, J., Roller, P.P., Gajdusek, D.C., and Gibbs, C.J., Jr. (1993a). Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem* 268, 20276-20284.

Safar, J., Roller, P.P., Gajdusek, D.C., and Gibbs, C.J., Jr. (1993b). Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Protein Sci* 2, 2206-2216.

Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F.E., and Prusiner, S.B. (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 4, 1157-1165.

Sajnani, G., Silva, C.J., Ramos, A., Pastrana, M.A., Onisko, B.C., Erickson, M.L., Antaki, E.M., Dynin, I., Vazquez-Fernandez, E., Sigurdson, C.J., *et al.* (2012). PK-sensitive PrP is infectious and shares basic structural features with PK-resistant PrP. *PLoS Pathog* 8, e1002547

Safar, J.G., Kellings, K., Serban, A., Groth, D., Cleaver, J.E., Prusiner, S.B., and Riesner, D. (2005). Search for a prion-specific nucleic acid. *J Virol* 79, 10796-10806.

Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., *et al.* (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173-177.

Shinkai, H., Ito, T., Iida, T., Kitao, Y., Yamada, H., and Uchida, I. (2000). 4-Aminoquinolines: novel nociceptin antagonists with analgesic activity. *J Med Chem* 43, 4667-4677.

8. Literaturverzeichnis

Silveira, J.R., Raymond, G.J., Hughson, A.G., Race, R.E., Sim, V.L., Hayes, S.F., and Caughey, B. (2005). The most infectious prion protein particles. *Nature* 437, 257-261.

Singh, J., and Udgaonkar, J.B. (2015). Molecular Mechanism of the Misfolding and Oligomerization of the Prion Protein: Current Understanding and Its Implications. *Biochemistry* 54, 4431-4442.

Solfrosi, L., Criado, J.R., McGavern, D.B., Wirz, S., Sanchez-Alavez, M., Sugama, S., DeGiorgio, L.A., Volpe, B.T., Wiseman, E., Abalos, G., *et al.* (2004). Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science* 303, 1514-1516.

Soto, C. (2011). Prion hypothesis: the end of the controversy? *Trends Biochem Sci* 36, 151-158.

Soto, C., Estrada, L., and Castilla, J. (2006). Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. *Trends Biochem Sci* 31, 150-155.

Sparkes, R.S., Simon, M., Cohn, V.H., Fournier, R.E., Lem, J., Klisak, I., Heinzmann, C., Blatt, C., Lucero, M., Mohandas, T., *et al.* (1986). Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 7358-7362.

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. *Journal of leukocyte biology* 81, 1374-1385.

Stahl, N., Baldwin, M.A., Teplow, D.B., Hood, L., Gibson, B.W., Burlingame, A.L., and Prusiner, S.B. (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 32, 1991-2002.

Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., and Prusiner, S.B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51, 229-240.

Stork, M., Giese, A., Kretschmar, H.A., and Tavan, P. (2005). Molecular dynamics simulations indicate a possible role of parallel beta-helices in seeded aggregation of poly-Gln. *Biophys J* 88, 2442-2451.

Surewicz, W.K., Mantsch, H.H., and Chapman, D. (1993). Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry* 32, 389-394.

Tamguney, G., Miller, M.W., Wolfe, L.L., Sirochman, T.M., Glidden, D.V., Palmer, C., Lemus, A., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (2009). Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces. *Nature* 461, 529-532.

8. Literaturverzeichnis

Telling, G.C., Parchi, P., DeArmond, S.J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P., and Prusiner, S.B. (1996). Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274, 2079-2082.

Terry, L.A., Howells, L., Hawthorn, J., Edwards, J.C., Moore, S.J., Bellworthy, S.J., Simmons, H., Lizano, S., Estey, L., Leathers, V., *et al.* (2009). Detection of PrP^{Sc} in blood from sheep infected with the scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Virol* 83, 12552-12558.

Thackray, A.M., Hopkins, L., Klein, M.A., and Bujdoso, R. (2007). Mouse-adapted ovine scrapie prion strains are characterized by different conformers of PrP^{Sc}. *J Virol* 81, 12119-12127.

Tixador, P., Herzog, L., Reine, F., Jaumain, E., Chapuis, J., Le Dur, A., Laude, H., and Beringue, V. (2010). The physical relationship between infectivity and prion protein aggregates is strain-dependent. *PLoS Pathog* 6, e1000859.

Tompa, P., Tusnady, G.E., Friedrich, P., and Simon, I. (2002). The role of dimerization in prion replication. *Biophys J* 82, 1711-1718.

Trevitt, C.R., and Collinge, J. (2006). A systematic review of prion therapeutics in experimental models. *Brain* 129, 2241-2265.

Tzaban, S., Friedlander, G., Schonberger, O., Horonchik, L., Yedidia, Y., Shaked, G., Gabizon, R., and Taraboulos, A. (2002). Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of heterogeneous sizes. *Biochemistry* 41, 12868-12875.

van der Merwe, J., Aiken, J., Westaway, D., and McKenzie, D. (2015). The standard scrapie cell assay: development, utility and prospects. *Viruses* 7, 180-198.

van Rheede, T., Smolenaars, M.M., Madsen, O., and de Jong, W.W. (2003). Molecular evolution of the mammalian prion protein. *Mol Biol Evol* 20, 111-121.

Vanik, D.L., Surewicz, K.A., and Surewicz, W.K. (2004). Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions. *Mol Cell* 14, 139-145.

Vorberg, I., Raines, A., and Priola, S.A. (2004). Acute formation of protease-resistant prion protein does not always lead to persistent scrapie infection in vitro. *J Biol Chem* 279, 29218-29225.

Warwicker, J. (2000). Modeling a prion protein dimer: predictions for fibril formation. *Biochem Biophys Res Commun* 278, 646-652.

Warwicker, J., and Gane, P.J. (1996). A model for prion protein dimerisation based on alpha-helical packing. *Biochem Biophys Res Commun* 226, 777-782.

8. Literaturverzeichnis

Weissmann, C., Enari, M., Klohn, P.C., Rossi, D., and Flechsig, E. (2002). Transmission of prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 *Suppl 4*, 16378-16383.

Will, R.G. (2003). Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. *Br Med Bull* 66, 255-265.

Westaway, D., Goodman, P.A., Mirenda, C.A., McKinley, M.P., Carlson, G.A., and Prusiner, S.B. (1987). Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* 51, 651-662.

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.

Wille, H., Bian, W., McDonald, M., Kendall, A., Colby, D.W., Bloch, L., Ollesch, J., Borovinskiy, A.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., *et al.* (2009). Natural and synthetic prion structure from X-ray fiber diffraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16990-16995.

Wille, H., Michelitsch, M.D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F.E., Agard, D.A., and Prusiner, S.B. (2002). Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3563-3568.

Yamada, H., Nakamoto, H., Suzuki, Y., Ito, T., and Aisaka, K. (2002). Pharmacological profiles of a novel opioid receptor-like1 (ORL1) receptor antagonist, JTC-801. *Br J Pharmacol* 135, 323-332.

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

Zhou, S., Shi, D., Liu, X., Liu, H., and Yao, X. (2016). Protective V127 prion variant prevents prion disease by interrupting the formation of dimer and fibril from molecular dynamics simulations. *Sci Rep* 6, 21804.

Ziegler, J., Sticht, H., Marx, U.C., Muller, W., Rosch, P., and Schwarzinger, S. (2003). CD and NMR studies of prion protein (PrP) helix 1. Novel implications for its role in the PrPC- \rightarrow PrPSc conversion process. *J Biol Chem* 278, 50175-50181.

9. Danksagung

Ich bedanke mich an erster Stelle bei Herrn PD Dr. Erdem Tamgüney für die Möglichkeit, dieses interessante Thema im Rahmen meiner Doktorarbeit bearbeiten zu dürfen. Auch wenn es nicht immer einfach war konnte ich mich während der gesamten Zeit auf Ihn und seine Ratschläge verlassen. Das habe ich nie für selbstverständlich angesehen. Herzlichen Dank.

Herrn Professor Höhfeld danke ich für die unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens.

Gleiches gilt für Herrn Prof. Hofmann und Herrn Prof. Kistemann, die dankenswerterweise die Posten des Dritt- und Viertgutachtens übernahmen.

Ein großes Dankeschön an meine lieben Kolleginnen und Kollegen aus dem DZNE Bonn, die stets für eine entspannte Arbeitsatmosphäre sorgten. Für ihre konstruktiven Ratschläge, Kollegialität und Unterstützung bin ich sehr dankbar.

Mein tiefster Dank gilt, neben meinen Eltern, meinem Mann Dorian. Er weiß immer, wann Zuspruch, Motivation oder einfach nur ein offenes Ohr notwendig sind. Seinen Rückhalt habe ich der nahezu unendlichen Geduld, besonders in den vielen wochenendlosen Wochen zu verdanken, selbst wenn er immer die höchsten Wellen meiner Frustration abbekam. Seine Unterstützung bedeutet mir mehr, als er sich vielleicht vorstellen kann und beschränkt sich nicht nur auf die Promotion. Dafür werde ich ihm immer dankbar sein.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Freunden und Verwandten die mich besonders in den letzten Jahren angespornt und unterstützt haben. Ich kann mich glücklich schätzen, so viel Zuspruch erhalten zu haben

10. Erklärung

10. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir persönlich, selbständig und ohne jede unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Die aus anderen Quellen übernommenen Daten, Abbildungen und Konzepte sind unter Angabe der jeweiligen Quelle gekennzeichnet. Die vorliegende Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht. Ich habe früher noch keinen Promotionsversuch unternommen.

Katharina Annick Wüsten,
Bonn, den 23.2.2017

11. Wissenschaftliche Publikationen:

11. Wissenschaftliche Publikationen:

Prion-like propagation of human brain derived alpha-synuclein in transgenic mice expressing human wild-type alpha-synuclein. Bernis ME, Babila, JT, Breid S, **Wüsten KA**, Wüllner U, Tamgüney G. Acta Neuropathologies Communications 2015 November 26; 3:75.

An easy method for bacterial expression and purification of wild-type and mutant superoxide dismutase 1 (SOD1).Tachu JB, **Wüsten KA**, Tamgüney G. Protein Expression and Purification (in Revision)

A cellular bioluminescence assay detects prion protein dimerization and aggregation upon infection. **Wüsten KA**, Tamgüney G. (zur Veröffentlichung eingereicht)

Veröffentlichung der Diplomarbeit:

Wahrnehmung schwacher elektrischer Signale bei Glatthaien (*Mustelus mustelus*) und Marmorrochen (*Raja undulata*)