

Lehrstuhl für Zellbiologie der Technischen Universität München

Wissenschaftszentrum Weihenstephan

Univ.-Prof. Dr. Bertold Hock, em.

**Funktion des Prion-Proteins in der neuronalen Ca^{2+} -Homöostase
und
Intravitalmikroskopische Untersuchung der Spine-Pathologie im
Verlauf der Prionerkrankung**

Martin Fuhrmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung
des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. (Univ. Kaposvári/Ungarn) J. Bauer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. B. Hock, em.

2. Univ.-Prof. Dr. J. Herms, Ludwig-Maximilians-Universität München

3. Univ.-Prof. Dr. E. Wolf, Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 05.10.06 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt am 19.12.06 angenommen.

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	8
1.1. HISTORIE DER TRANSMISSIBLEN SPONGIFORMEN ENZEPHALOPATHIEN	8
1.2. DIE PRION HYPOTHESE	11
1.3. DAS ZELLULÄRE PRION-PROTEIN	13
1.3.1. Das Prnp-Gen	13
1.3.2. Prnp Genexpression	14
1.3.3. Das Protein PrP ^C	14
1.3.4. Struktur von PrP ^C	15
1.3.5. Funktion von PrP ^C	17
1.4. DIE PATHOGENE ISOFORM DES PRION-PROTEINS	19
1.4.1. Struktur	19
1.4.2. Neurotoxizität	22
1.5. NEURODEGENERATION	24
1.6. SPANNUNGSGESTEUERTE CA ²⁺ -KANÄLE	26
1.7. NACHHYPERPOLARISATION – I _{AHP} UND S _{I_{AHP}}	29
1.8. IP ₃ -VERMITTELTE CA ²⁺ -FREISETZUNG AUS DEM ER	30
1.9. IN VIVO 2-PHOTONEN MIKROSKOPIE	34
1.10. ZIELSETZUNG	38
1.10.1. Physiologische Funktion von PrP ^C	38
1.10.2. Kinetik der Neurodegeneration bei Scrapie	38
2. MATERIAL UND METHODEN	39
2.1. INTRAVITALMIKROSKOPIE	39
2.1.1. Operation zur akuten Intravitalmikroskopie	39
2.1.2. Operation zur chronischen Intravitalmikroskopie	41
2.1.3. 2-Photonen Intravitalmikroskopie	42
2.1.4. Analyse und Auswertung	44
2.1.5. Material	45
2.2. ELEKTROPHYSIOLOGIE	47
2.2.1. Patch-Clamp-Elektroden	49
2.2.2. Elektrische Eigenschaften der Whole-Cell-Konfiguration	49
2.2.3. Aufbau des Messplatzes Elektrophysiologie/ Ca ²⁺ -Imaging	50
2.2.4. Herstellung von Kleinhirn- und Hippocampus-Hirnschnitten	52
2.2.5. Elektrophysiologische Messung von I _{AHPs}	52
2.2.6. Messung von Ca ²⁺ -Strömen über VGCCs	53
2.3. CA ²⁺ -IMAGING	53
2.3.1. Ca ²⁺ -Imaging und I _{AHP}	54
2.3.2. Messung IP ₃ -vermittelter Ca ²⁺ -Freisetzung aus dem ER von Purkinjezellen	56
2.4. MAUSLINIEN	58
2.4.1. C57BL6 x 129Sv und C57BL6 x 129Sv Prnp ^{-/-}	58
2.4.2. B6.Cg-Tg(Thyl-YFP)2Jrs/J	58
2.4.3. Genotypisierung	60
2.4.4. DNS-Isolation aus Mausschwanz-Biopsien	60
2.4.5. PCR	61
2.4.6. Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNS-Fragmenten	62
2.5. SONSTIGE METHODEN	62
2.5.1. Quantitative RT-PCR	62
2.5.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	63
2.5.3. Westernblot	64
2.5.4. Infektion mit 10%igem RML Hirnhomogenat	65
2.6. CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN	65
2.6.1. Lösungen und Puffer zur Protein-Analyse und Aufreinigung	65
2.6.2. Sonstige Chemikalien und Lösungen, Geräte und Verbrauchsmaterialien	66

3. ERGEBNISSE	67
3.1. UNTERSUCHUNG DER PHYSIOLOGISCHEN FUNKTION VON PRP ^C AN <i>PRNP</i> ^{-/-} -MÄUSEN	67
3.1.1. <i>Elektrophysiologische Analyse der späten Nachhyperpolarisation</i>	67
3.1.2. <i>Fluorimetrische Ca²⁺-Messung bei der späten Nachhyperpolarisation</i>	69
3.1.3. <i>IP3-vermittelte Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER</i>	72
3.1.4. <i>Elektrophysiologische Analyse von VGCCs</i>	73
3.1.5. <i>Protein- und mRNA-Expression von Ca²⁺-Kanaluntereinheiten</i>	76
3.2. <i>IN VIVO 2-PHOTONEN ANALYSE DER KINETIK DER NEURODEGENERATION BEI SCRAPIE</i>	78
3.2.1. <i>Analyse der Kurzzeit-Plastizität von Spines und Dendriten 100 versus 130 dpi</i>	79
3.2.2. <i>Kurzzeitiger Spine-Gewinn geht langsamem Spine-Verlust voraus</i>	82
3.2.3. <i>Entstehung von Varikositäten führt zu „dendritic Beading“</i>	87
3.2.4. <i>Spines verschwinden dort, wo Varikositäten entstehen</i>	89
4. DISKUSSION	92
4.1. VERÄNDERTE CA ²⁺ -HOMÖOSTASE IN HIPPOCAMPUS-CA1-NEURONEN VON <i>PRNP</i> ^{-/-} -MÄUSEN	92
4.2. LANGZEIT PLASTIZITÄT VON SPINES UND VARIKOSITÄTEN IM VERLAUF DER PRIONERKRANKUNG.....	97
5. ZUSAMMENFASSUNG	101
6. LITERATUR	102
7. EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	138
8. ANHANG	139
8.1. DANKSAGUNG	139
8.2. LEBENS LAUF	140

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: SCHEMA DER PRION-HYPOTHESE.....	12
ABB. 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SEKUNDÄRSTRUKTUR DES PRION-PROTEINS	15
ABB. 3: HISTOLOGIE VON CJD, PrP ^{Sc} -ABLAGERUNG UND FIBRILLEN.....	25
ABB. 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES SPANNUNGSAKTIVIERTEN CA ²⁺ -KANALS	28
ABB. 5: ZYTOARCHITEKTUR DES KLEINHIRNS	31
ABB. 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG IONOTROPER GLUTAMATREZEPTOREN	32
ABB. 7: VERGLEICH VON 1- UND 2-PHOTONEN MIKROSKOPIE.....	35
ABB. 8: 2-PHOTONEN <i>IN VIVO</i> MIKROSKOPIE 700 μM TIEF IM GEHIRN DER MAUS	37
ABB. 9: OPERATION ZUM EINBAU VON AKUTEN UND CHRONISCHEN KRANIALEN FENSTERN.....	40
ABB. 10: LANGZEIT 2-PHOTONEN INTRAVITALMIKROSKOPIE	43
ABB. 11: GENERIERUNG DER WHOLE-CELL-KONFIGURATION	48
ABB. 12: ERSATZSCHALTBILD DER WHOLE-CELL-KONFIGURATION.	49
ABB. 13: SCHEMA EINES ELEKTROPHYSIOLOGIE MESSPLATZES	51
ABB. 14: WHOLE-CELL-MODUS AM CA1-NEURON IM VITALEN HIPPOCAMPUS-SCHNITT	55
ABB. 15: PURKINJEZELLE IM VITALEN KLEINHIRNSCHNITT MIT STIMULATION DER PARALLELFASERN	56
ABB. 16: AGAROSEGEL ZUR GENOTYPISIERUNGEN VON <i>Prnp</i> ^{-/-} , <i>Prnp</i> ^{+/+} - UND <i>Prnp</i> ^{+/-} -MÄUSEN.....	58
ABB. 17: AGAROSEGEL ZUR GENOTYPISIERUNGEN VON MÄUSEN DER LINIE YFP-H	59
ABB. 18: KNOCKOUT- UND TRANSGEN-KONSTRUKTE DER VERWENDETEN MAUSLINIEN	60
ABB. 19: VERMINDERTE <i>I</i> _{AHP} STRÖME IN HIPPOCAMPUS- <i>Prnp</i> ^{-/-} -CA1-NEURONEN	68
ABB. 20: VERMINDERTE FREIE CA ²⁺ -KONZENTRATION IM SOMA VON <i>Prnp</i> ^{-/-} -CA1-NEURONEN.....	70
ABB. 21: CT _{MEM} UND CT _{CYT} SIND VERMINDERT BEI <i>Prnp</i> ^{-/-} -CA1-NEURONEN	71
ABB. 22: UNVERÄNDERTE CA ²⁺ -FREISETZUNG AUS DEM ER VON PURKINJEZELLEN	73
ABB. 23: ANALYSE DER VGCCS VON <i>Prnp</i> ^{-/-} - UND <i>Prnp</i> ^{+/+} -CA1-NEURONEN.....	75
ABB. 24: mRNAs UND PROTEINEXPRESSIONSLEVEL DER α- UND β-CA ²⁺ -KANALUNTEREINHEITEN	77
ABB. 25: TYPISCHE SPINE- UND DENDRITEN-VERÄNDERUNGEN IN SCRAPIE-INFIZIERTEN MÄUSEN	79
ABB. 26: KURZZEIT-PLASTIZITÄT VON SPINES UND VARIKOSITÄTEN.....	81
ABB. 27: LANGZEIT SPINE-PLASTIZITÄT IN SCRAPIE-INFIZIERTEN MÄUSEN.....	85
ABB. 28: LANGZEIT PLASTIZITÄT VON VARIKOSITÄTEN IN SCRAPIE-INFIZIERTEN MÄUSEN.....	88
ABB. 29: VARIKOSITÄTEN ENTSTEHEN AN SPINES UND SPINES VERSCHWINDEN AN VARIKOSITÄTEN	90

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: PRIMER UND SEQUENZEN	61
TABELLE 2: PCR-MIX FÜR DIE GENOTYPISIERUNG VON <i>Prnp</i> ^{+/+} -, <i>Prnp</i> ^{-/-} -, <i>Prnp</i> ^{+/-} -MÄUSEN	61
TABELLE 3: PCR-PROGRAMM P2, P4	61
TABELLE 4:PCR-MIX FÜR DIE GENOTYPISIERUNG VON YFP-H-MÄUSEN.....	61
TABELLE 5: PCR-PROGRAMM YFP-H	62
TABELLE 6: RT-PCR-PROGRAMM.....	63
TABELLE 7: PRIMER FÜR DIE QUANTITATIVE RT-PCR.....	63
TABELLE 8: TRANSIENTE UND PERSISTIERENDE SPINES	86

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
2PLSM	2-Photonen Laser Scan Mikroskop
Abb.	Abbildung
ACSF	Engl.: artificial cerebrospinal fluid
AHP	Engl.: afterhyperpolarization
AMPA	α -amino-3-hydroxy-methyl-4-isoxazole proprionic acid
APLP1	Engl.: amyloid precursor like protein 1
Asn	Asparagin
Bcl-2	Engl.: B cell lymphoma/leukemia-2
bp	Basenpaare
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
ca.	circa
cDNS	codierende DNS
CG-5N	Calcium green 5N (Ca^{2+} -sensitiver Fluoreszenzfarbstoff)
CHO	Engl.: carbohydrates
CJD	Engl.: Creutzfeld-Jakob-Disease
cm^2	Quadratcentimeter
CWD	Engl.: Cronic wasting disease
DAG	di-Acyl-Glycerol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dpi	Engl.: days post infection
Dpl	PrP-Homolog Doppel
dTOR	Engl.: daily turnover ratio
dTOR _v	tägliche Varikositäten Umsatzrate
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
engl.	Englisch
EPSC	Engl.: excitatory postsynaptic current
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
EZL	Extrazellulär Lösung
fEPSP	Feld Exzitatorische Postsynaptische Potenziale
FFI	Engl.: fatal familial insomnia
FITC	Fluorescein-isothiocyanate
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
FSE	Feline spongiforme Enzephalopathie
Fyn, p59 ^{fyn}	Engl.: nonreceptor tyrosine kinase, fyn
GFAP	Engl.: glial fibrillary acidic protein
PI	Glykosyl-Phosphatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
h	Stunde
HVA-Kanal	Engl.: high-voltage-activated Kanal
Hz	Hertz
i.p.	intraperitoneal
I_{AHP}	Engl.: afterhyperpolarization current
IL-2	Interleukin 2
IP3	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IR	Infrarot

IZL	Intrazellulär-Lösung
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
L5B	Engl.: layer 5 B
LSM	Laser Scan Mikroskopie
LTD	Engl.: long term depression
LTP	Engl.: long term potentiation
LVA-Kanal	Engl.: low-voltage-activated Kanal
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	Engl.: mitogen activated protein kinase
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
mGluR	metabotroper Glutamat Rezeptor
MHz	Megahertz
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
µM	mikromolar
mM	millimolar
mOsm	milliosmolar
mRNS	Engl.: messenger RNS
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
NA	Numerische Apertur
nA	Nanoampere
NCAM	Engl.: neural cell adhesion molecule
NDD	Engl.: non descanned detector
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
NMR	Engl.: nuclear magnetic resonance
nvCJD	Engl.: new variant CJD
Ø	Durchmesser
OGB-1	Oregon green Bapta-1 (Ca ²⁺ -sensitiver Fluoreszenzfarbstoff)
ORF	Engl.: open reading frame
pA	Pikoampere
PBS	Engl.: phosphate buffered saline
PCR	Engl.: polymerase chain reaction
PI3K	Engl.: phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	Phospho-inositol-bis-Phosphat
PIPLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PK	Proteinase K
PKA	Engl.: cAMP-dependent protein kinase A
PLC-β1	Phospholipase-C-β1
PMT	Photomultiplier

PMT	Photomultiplier
<i>Prnp</i>	Prion-Protein-Gen der Maus
<i>PRNP</i>	Prion-Protein-Gen des Menschen
PrP	Prion-Protein
PrP ^C	zelluläres (Engl.: cellular) Prion-Protein
PrP ^{Sc}	"scrapie" Prion-Protein
pS	Pikosiemens
RNS	Ribonukleinsäure
ROI	Engl.: region of interest
rPrP	rekombinantes PrP
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Engl.: reverse transcriptase-PCR
sec	Sekunde
s.c.	Subkutan
SAF	Scrapie-assoziierte Fibrillen
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Engl.: standard error of the mean
<i>sI_{AHP}</i>	Engl.: slow afterhyperpolarization current
SK-Kanal	Engl.: small conductance channel
STII	Engl.: stress-inducible protein
T _m	Schmelztemperatur
TME	Transmissible Mink Enzephalopathie
TSE	Transmissible spongiforme Enzephalopathie
TTL-Signal	Transistor-Transistor-Logik-Signal
TTX	Tetrodotoxin (Kugelfischgift)
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VGCCs	Engl.: voltage-gated-calcium-channels
w/v	Engl.: weight per volume
YFP	Engl.: yellow-fluorescent-protein
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nerven System

1. Einleitung

1.1. Historie der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien

Übertragbare (engl.: transmissible) spongiforme Enzephalopathien (TSE) oder Prionkrankheiten sind seltene immer zum Tod führende neurodegenerative Erkrankungen, die sowohl beim Menschen als auch bei diversen Tierarten auftreten. Die Inkubationszeit reicht von Monaten bis zu mehreren Jahren bis Jahrzehnten.

Die seit 1732 bekannte Traberkrankheit, die bei Schafen und Ziegen auftritt und auch Scrapie genannt wird, weil von der Krankheit betroffene Tiere sich kratzen (vergleiche Englisch: „to scrape“, kratzen), ist die am längsten bekannte TSE (Stockmann 1913; McGowan 1922). Außerdem sind die „Bovine spongiforme Enzephalopathie“ beim Rind (BSE) (Wells et al. 1987), die übertragbare spongiforme Hirndegeneration bei Nerzen (TME, „Transmissible Mink Enzephalopathy“) (Hartsough und Burger 1965), die chronisch zehrende Krankheit der Hirschartigen (CWD, „Cronic Wasting Disease“) (Williams und Young 1980), die „Feline spongiforme Enzephalopathie“ der Katzen (FSE) (Wyatt et al. 1991) sowie weitere spongiforme Enzephalopathien bei zahlreichen Zootieren (Jeffrey und Wells 1988) als TSE-Erkrankungen bei Tieren bekannt.

Beim Menschen wurden bisher drei Gruppen von übertragbaren spongiformen Enzephalopathien identifiziert, die familiäre, erworbene und sporadische Typen einschließen. Zu den spongiformen Enzephalopathien des Menschen gehören die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) (Creutzfeldt 1920; Jakob 1921a; Jakob 1921b), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) (Gerstmann 1928; Gerstmann et al. 1936), die letale familiäre Schlaflosigkeit (FFI, „fatal familial insomnia“) (Lugaresi et al. 1986) und Kuru (Zigas und Gajdusek 1957), eine beim Volksstamm der Fore im östlichen Hochland von Papua Neuguinea auftretende neurologische Erkrankung, welche durch rituellen Kannibalismus übertragen wurde (Klitzman 1999).

Als humane TSEs wie CJD und GSS erstmals beschrieben wurden, dachte man nicht, dass sie übertragbar seien. Die Beschreibung von Kuru 1957 und die Beobachtung der Ähnlichkeiten der Kuru-Pathologie mit Scrapie beim Schaf durch HADLOW (Hadlow 1959) legte den Schluss nahe, dass es sich auch bei Kuru um eine infektiöse und übertragbare Krankheit ähnlich wie Scrapie handeln könnte. Diese Hypothese wurde durch die erfolgreiche Übertragung von Kuru und später auch CJD von Menschen auf den Schimpansen und andere Primaten durch GAJDUSEK und Mitarbeiter bestätigt (Gajdusek et al. 1967). Von diesem

Zeitpunkt an wurden TSEs bei Tieren und Menschen als eine Krankheitsentität wahrgenommen.

Charakteristisch für TSE-Erkrankungen, welche sowohl sporadisch auftreten als auch durch Vererbung weitergegeben werden können, ist die in unterschiedlich starker Ausprägung auftretende schwammartige Vakuolisierung des ZNS, assoziiert mit einem massiven Nervenzellverlust, einer Aktivierung von Gliazellen (Astrogliose) sowie der pathologischen Ablagerung des Prion-Proteins. Weiterhin sind TSEs dadurch gekennzeichnet, dass sie übertragbare Erkrankungen darstellen, was bereits 1936 von CUILLÉ UND CHELLE durch Infektion von Schafen und Ziegen mit Scrapie (Cuillé und Chelle 1936) experimentell gezeigt werden konnte.

Eine Folge der Übertragbarkeit der TSE-Erkrankungen ist die Mitte der 80er-Jahre begonnene BSE-Epidemie, welche 1993 ihren Höhepunkt erreichte und mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit Ursache der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD) ist.

GERALD WELLS stellte im November 1986 am zentralen britischen Veterinär-Labor in Weybridge an histologischen Hirngewebeschnitten eines Rindes eine außergewöhnliche, im Lichtmikroskop sichtbare, schwammartige „Durchlöcherung“ fest und beschrieb damit erstmalig die Bovine spongiforme Enzephalopathie beim Rind (BSE), welche aufgrund der klinischen Manifestation auch als Rinderwahnsinn bekannt wurde (Wells et al. 1987; Wells et al. 1998). Im Verlauf der 80er-Jahre kam es zu einem starken Anstieg der BSE-Fälle in Großbritannien und später in geringerem Ausmaß auch auf dem europäischen Kontinent. Im Mai 1987 wurde daher eine erste epidemiologische Untersuchung durchgeführt, welche den Verzehr von tiermehlhaltigem Kälberkraftfutter (Mischfutter) als das gemeinsame Merkmal der betroffenen Herden identifizierte (Wilesmith et al. 1988). Diese Beobachtungen zusammen mit der neuropathologischen Ähnlichkeit der BSE mit der Scrapie-Krankheit führten zu der Hypothese, dass BSE durch die Verfütterung von Scrapie-kontaminiertem Tiermehl an Rinder verursacht wurde (Mischfurtherhypothese) und sich die Erkrankung wiederum durch das Verfüttern von BSE-kontaminiertem Tiermehl schnell zu einer Epidemie ausweiten konnte (Wilesmith et al. 1988; Wilesmith et al. 1991). Die zwischen 1971 und 1984 bei fast allen Tiermehlproduzenten eingeführte Umstellung vom „Chargenbetrieb“ auf das „kontinuierliche Verfahren“, welche unter anderem die Verringerung der Verarbeitungstemperatur unter 100°C sowie die Verkürzung der Verweilzeit im Produktionsprozess beinhaltete und damit zu einer fehlenden oder mangelhaften Inaktivierung des infektiösen

Agens führte, ist dabei als Hauptursache für die Infektion der Tiere und damit für die Entstehung der BSE-Krise zu sehen (Wilesmith et al. 1991).

Zwischen Ende des Jahres 1995 und Anfang 1996 wurden in Großbritannien erstmals ungewöhnliche Fälle der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit gemeldet. Die betroffenen Patienten wiesen ein bemerkenswert niedriges Erkrankungsalter, relativ früh einsetzende psychiatrische Symptome und einen verlängerten klinischen Verlauf auf. Auch die Neuropathologie unterschied sich im Hinblick auf das Läsionsprofil und das Auftreten von Proteinablagerungen in Form von floriden Plaques von der klassischen CJD (Ironsides et al. 1996). Bis März 1996 waren zehn Fälle dieser Krankheit, die man als neue Variante der CJD (nvCJD) bezeichnete, bestätigt worden, wobei die Fälle zunächst nur in Großbritannien auftraten (Will et al. 1996). Aufgrund des zeitlichen und geographischen Zusammenhangs schien es daher möglich, dass die nvCJD kausal mit der BSE verbunden sein könnte und durch den Verzehr von erregerehaltigem Gewebe vom Rind, welches in Großbritannien während der 80er-Jahre in Lebensmittel gelangte, verursacht wurde (Collinge et al. 1995; Ridley und Baker 1996; Will et al. 1996). Durch Infektionsstudien mit Mäusen konnte mittlerweile gezeigt werden, dass das BSE-Agens bemerkenswert konstante Übertragungscharakteristika hinsichtlich der Inkubationszeit und des pathologischen Läsionsprofils aufweist, welche denen der nvCJD gleichen (Bruce et al. 1997). Es wird daher allgemein angenommen, dass BSE durch Übertragung auf den Menschen die nvCJD verursacht (Collinge et al. 1996; Priola 1996; Bruce et al. 1997; Hill et al. 1997; Scott et al. 1999). Diese Annahme wurde durch erfolgreiche Übertragung von BSE auf Makaken weiter gestützt (Lasmezias et al. 1996). Generell wird für BSE eine breite Wirtsspezifität angenommen, da neben der experimentellen Übertragbarkeit von BSE auf Schafe (Baker et al. 1993; Foster et al. 1993; Houston et al. 2000) auch die FSE der Hauskatzen (Leggett et al. 1990) und zahlreiche TSE-Fälle bei exotischen Vertretern der Familien *Bovidae* (Hornträger) und *Felidae* (Katzen) in britischen Tiergärten in den 80er- und 90er-Jahren auf den Verzehr von Gewebe BSE-erkrankter Rinder zurückgeführt wurden (Jeffrey et al. 1992; Bruce et al. 1994; Sigurdson und Miller 2003).

Weltweit sind bisher an die 200000 Fälle von BSE aufgetreten, wobei davon allein rund 180000 in Großbritannien registriert wurden. Obwohl schon 1988 ein Verbot für die Verfütterung von Tiermehl verhängt wurde, erreichte die BSE-Krise erst einige Jahre später ihren Höhepunkt. Dass diese Verzögerung mit der Inkubationszeit von 4,5 Jahren zusammenhing, zeigte sich in den Jahren nach 1992 (Bradley und Wilesmith 1993; Anderson et al. 1996). Während am Höhepunkt der Epidemie 1992 weltweit noch 37000 Fälle von BSE

gemeldet wurden, waren es im Jahr 2005 nur noch rund 550 Fälle (Stand März 2006; Quelle „Department for Environment Food and Rural Affairs“, UK; www.defra.gov.uk).

Bisher sind in Großbritannien rund 150 Menschen an nvCJD verstorben (rund 160 Menschen weltweit). Mit 28 Fällen wurde im Jahr 2000 ein Höhepunkt erreicht. Im Jahr 2005 waren es nur noch fünf (Stand April 2006; Quelle: „Department of Health“, UK; www.dh.gov.uk). Trotz dieser deutlich abnehmenden Tendenz ist aufgrund der Ungewissheit über den Einfluss genetischer Faktoren auf die Inkubationszeit sowie aufgrund weiterer noch ungeklärter Sachverhalte eine genaue Prognose bezüglich der weiteren Entwicklung der nvCJD zurzeit nicht möglich (Llewelyn et al. 2004; Peden et al. 2004).

1.2. Die Prion Hypothese

Trotz intensiver Forschungsarbeiten ist die Natur des infektiösen Agens der spongiformen Enzephalopathien bis heute in vielen Aspekten noch unverstanden. Lange Zeit betrachtete man aufgrund der langen Inkubationszeiten sich sehr langsam vermehrende Viren als möglichen Erreger (Thormar 1971; Nathanson 1980; Diringier et al. 1988; Diringier et al. 1994), doch konnte keine virale Nukleinsäure nachgewiesen werden (Kellings et al. 1993). TIKVAH ALPER beschrieb im Jahr 1966 erstmals, dass der TSE-Erreger selbst mit massiver DNS- und RNS-schädigender Bestrahlung nicht inaktiviert werden kann und zog daraus den Schluss, dass es sich nicht um eine der bekannten Erregerklassen wie Viren, Bakterien, Pilzen oder Protozoen handeln könne, sondern um ein infektiöses Agens, das über kein Genom verfügt (Alper et al. 1966; Alper et al. 1967; Alper 1985).

Dieser Gedanke wurde von GIBBONS UND HUNTER 1967 weiterentwickelt, welche erstmals ein sich vermehrendes Zellmembranprotein als Erreger vorschlugen (Gibbons und Hunter 1967). Im selben Jahr stellte GRIFFITH die Hypothese auf, dass ein bloßes Protein im Sinne einer Autokatalyse repliziert wird und so für die Übertragung von TSE verantwortlich sein könnte (Griffith 1967).

Dass sich mit diversen Nukleinsäure-schädigenden Verfahren die Infektiösität des TSE-Erregers nicht verringern lässt, wohl aber mit Substanzen, die Proteine abbauen oder deren natürliche Faltung auflösen, wurde im Jahr 1982 von STANLEY PRUSINER dargestellt. Er führte erstmalig die Bezeichnung „Prion“ (für „proteinacious infectious particle“) ein, um die Eigenart des TSE-Erregers zu unterstreichen, im Wesentlichen aus einem Protein zu bestehen

(Prusiner 1982). Die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien werden daher auch als Prionkrankheiten bezeichnet.

Nach der Prion-Hypothese (Abb. 1) besteht der TSE-Erreger hauptsächlich aus einer pathogenen, fehlgefalteten Form eines spezifischen Wirtsproteins, dem zellulären Prion-Protein (PrP^{C}). Diese fehlgefaltete Form ist in der Lage, die strukturelle Umwandlung weiterer Moleküle in einem autokatalytischen Prozess zu bewirken, wodurch sich die pathogene Form repliziert (Alper et al. 1967; Griffith 1967; Prusiner 1982; Prusiner 1991). Das dafür verantwortliche Protein konnte in seiner pathogenen Form aufgereinigt werden (Bolton et al. 1982; Prusiner et al. 1982) und wurde als Scrapie-assoziiertes Prion-Protein (PrP^{Sc}) bezeichnet. In Präparationen von PrP^{Sc} lassen sich elektronenmikroskopisch erkennbare, makromolekulare Proteinstrukturen darstellen, welche als Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) oder „prion rods“ bezeichnet werden (Merz et al. 1981; Bolton et al. 1982; Merz et al. 1983). Anreicherungen von SAFs bzw. „prion rods“ erwiesen sich als hochinfektiös (Diringer et al. 1983; Prusiner et al. 1983), wobei die Anreicherung mit einer Zunahme der Infektiösität korreliert, was als weiterer Hinweis für die Richtigkeit der Prion-Hypothese gedeutet wurde (Gabizon et al. 1988). Eine Herausforderung für die Prion-Hypothese ist dabei der Umstand, dass Prionkrankheiten nicht nur durch Infektion erworben, sondern auch rein erblich bedingt sein oder spontan entstehen können.

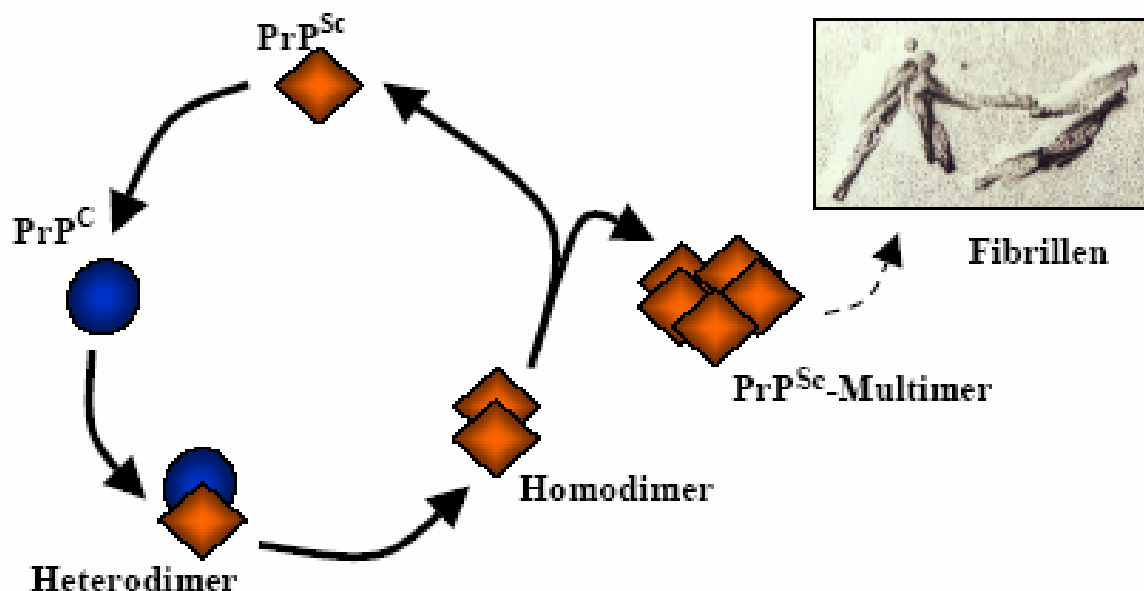


Abb. 1: Schema der Prion-Hypothese

PrP^{Sc} bildet mit membranständigem PrP^{C} ein Heterodimer, das zu einem PrP^{Sc} -Homodimer transformiert. Dieses dissoziiert in zwei PrP^{Sc} -Moleküle, die ihrerseits wieder in den Transformationsprozess einfließen können. Die Anlagerung von weiteren PrP^{Sc} -Molekülen führt zu fibrillären Ablagerungen (EM Bild, Diringer 1983) (Schema nach Prusiner 1991).

Die Prion-Hypothese geht davon aus, dass einerseits Mutationen im Gen des Prion-Proteins die Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} begünstigen und andererseits, basierend auf grundsätzlichen, thermodynamischen Eigenschaften, die Umfaltung des Proteins mit geringer Wahrscheinlichkeit auch spontan möglich ist. Die Prion-Hypothese konnte durch die *in vitro* Herstellung von infektiösem PrP^{Sc} aus rekombinantem PrP weiter bestätigt werden (Legname et al. 2004; Castilla et al. 2005). Bisher konnte neu generiertes infektiöses PrP^{Sc} nur mit Hilfe von PrP^{Sc}-haltigem Hirnhomogenat als Ausgangsmaterial gewonnen werden.

1.3. Das zelluläre Prion-Protein

1.3.1. Das *Prnp*-Gen

Im Jahr 1984 konnte STANLEY PRUSINER zusammen mit dem Team von LEROY HOOD am California Institute of Technology in Pasadena durch Analysen von aufgereinigtem PrP^{Sc} einen Teil der Aminosäuresequenz vom N-Terminus des Prion-Proteins bestimmen (Prusiner et al. 1984). Anhand des genetischen Codes wurden Sonden konstruiert, mit denen das Gen des Prion-Proteins in Hamsterzellen (Oesch et al. 1985) und später auch in Mäusezellen (Chesebro et al. 1985; Lochter et al. 1986) nachgewiesen und kloniert wurde. Weiterhin zeigte sich, dass das Gen bei Hamstern, Mäusen, Menschen und allen anderen untersuchten Arten nicht im aufgereinigten infektiösen Material, sondern im Genom der Wirtszellen zu finden ist. Mehr noch: es zeigte sich, dass das Prion-Protein-Gen die meiste Zeit aktiv ist – was bedeutet, dass auch im gesunden Organismus PrP-mRNS und Prion-Protein hergestellt werden (Oesch et al. 1985; Basler et al. 1986).

Beim Menschen befindet sich das Prion-Protein-Gen (*PRNP*) auf dem p-Arm von Chromosom 20, bei der Maus (*Prnp*) in der syntenischen Region von Chromosom 2. Allen bekannten *Prnp*-Genen ist gemeinsam, dass sie am 5'-Ende ein oder zwei sehr kurze Exons besitzen, die durch ein langes Intron (ca. 10 kb) vom 3'-seitigen Exon getrennt werden. Der offene Leserahmen (ORF) ist dabei bei allen bisher bekannten Prion-Protein-Genen innerhalb des 3'-Exons codiert, so dass die Möglichkeit eines alternativen RNS-Spleißens zur Entstehung von PrP^{Sc} ausgeschlossen werden kann (Basler et al. 1986; Westaway et al. 1987; Puckett et al. 1991; Gabriel et al. 1992; Bartz et al. 1994; Westaway et al. 1994a; Westaway et al. 1994b; Horiuchi et al. 1998; Lee et al. 1998).

Bei Säugetieren sind bislang die ORFs der *Prnp*-Gene von über 90 Arten aus allen bekannten 18 Ordnungen analysiert worden (Schätzl et al. 1995; Wopfner et al. 1999; van Rheede et al. 2003), wobei phylogenetische Stammbaumanalysen basierend auf der Sequenz des *Prnp*-ORF keine Abweichungen von der taxonomischen Gliederung ergaben, weshalb außergewöhnliche Ereignisse in der Evolution des *Prnp*-Gens in den einzelnen Säugerlinien nicht anzunehmen sind (Wopfner et al. 1999; van Rheede et al. 2003). Auch bei Vögeln (Gabriel et al. 1992), Reptilien (Simonic et al. 2000), Amphibien (Strumbo et al. 2001) und Fischen (Suzuki et al. 2002) konnte ein *Prnp*-Gen nachgewiesen werden und ist daher möglicherweise bei allen Vertebraten vorhanden.

1.3.2. *Prnp* Genexpression

Bei adulten Organismen wird das *Prnp*-Gen in fast allen Geweben exprimiert, wobei das Expressionsniveau abhängig vom untersuchten Gewebe variiert (Bendheim et al. 1992; Manson et al. 1992). Im ZNS, insbesondere in Neuronen und Gliazellen, ist das Expressionsniveau mit ungefähr 50 mRNA-Kopien pro Zelle am höchsten (Kretzschmar et al. 1986a; Moser et al. 1995). Dabei ist PrP vornehmlich synaptisch, das heißt an den Enden von Nervenzellen lokalisiert (Herms et al. 1999). Die mRNA des *Prnp*-Gens ist bereits während der frühen Phase der Embryogenese im Gehirn nachweisbar (Harris et al. 1993), wobei der mRNA-Gehalt mit fortschreitender Entwicklung zunimmt und auch im peripheren Nervensystem sowie in nicht-neuronalen Zellpopulationen nachweisbar ist (Manson et al. 1992). Weiterhin wird das Prion-Protein auch in Zellen des Immunsystems exprimiert (Cashman et al. 1990; Dodelet und Cashman 1998).

1.3.3. Das Protein PrP^C

Der ORF des *PRNP*-Gens des Menschen codiert für ein Protein mit 253 Aminosäuren. Bei Maus und Hamster sind es 254 Aminosäuren, wobei die cDNS des *PRNP*-Gens von infizierten und nicht-infizierten Individuen identisch sind (Chesebro et al. 1985; Oesch et al. 1985; Basler et al. 1986; Lochter et al. 1986; Kretzschmar et al. 1986b).

Das humane zelluläre Prion-Protein, wie auch das Prion-Protein aller bisher untersuchten Säugetiere, ist ein extrazelluläres Glykoprotein, welches mit einer Glykosylphosphatidyl-Einheit (GPI-Anker) auf der Zelloberfläche verankert ist und experimentell mittels Phospholipasen (z.B. PIPLC) oder Proteasen (z.B. Trypsin) von der Membran entfernt werden kann (Caughey et al. 1988; Caughey et al. 1989; Borchelt et al. 1990; Caughey und Raymond 1991; Shyng et al. 1993). Eine schematische Ansicht des Prion-Proteins ist in Abb.

2 dargestellt. Wie viele andere Oberflächenproteine wird PrP zuerst in das Lumen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert, wobei die dazu nötige N-terminale Signalsequenz von 22 Aminosäuren vom primären Translationsprodukt abgespalten wird. Weitere 23 Aminosäuren werden im Zuge der Reifung vom C-Terminus abgetrennt, um die Bindung der Glykosylphosphatidyl-Einheit an das Serin 231 für die Membranverankerung zu ermöglichen (Stahl et al. 1987). Im ER werden an die Asparagin-Reste 181 und 197 des Proteins noch zwei Mannose-haltige Polysaccharide angehängt, welche auf dem Weg zur Zelloberfläche beim Durchlaufen des Golgi-Apparates in komplexe, hybride Zuckerstrukturen umgewandelt werden. Aufgrund einer unvollständigen Glykosylierung während der PrP-Prozessierung kommt es neben der zweifach-glykosylierten auch zur Bildung einer einfach- und einer unglykosylierten Form (Bolton et al. 1985; Endo et al. 1989; Haraguchi et al. 1989). Die drei verschiedenen Glykoformen des Prion-Proteins umspannen ein Molekulargewicht von ca. 25-35 kDa, wobei die glykosylierten Formen über 50 verschiedene Zucker enthalten (Rudd et al. 1999; Rudd et al. 2001). Die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 179 und 214 (Turk et al. 1988; Haraguchi et al. 1989) trägt wesentlich zur Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur bei (Mehlhorn et al. 1996).

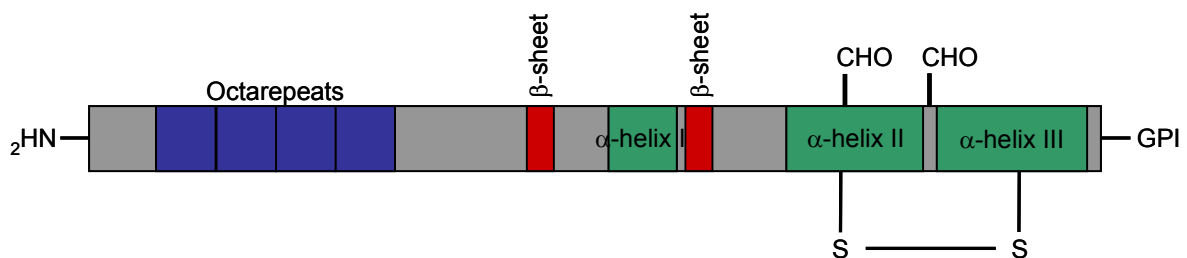


Abb. 2: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur des Prion-Proteins

Darstellung des gereiften Prion-Proteins. Am N-Terminus ist das Signal-Peptid bereits abgespalten, und der GPI-Anker ist am C-Terminus angefügt. Außerdem ist die Domäne der „Octarepeats“ (blau), die zur Kupferbindung dienen, dargestellt. Weiterhin zeigt die Abbildung die Position der α -Helices und β -Faltblätter. Daneben werden die Positionen der Glykosilierungen (CHO) und der intramolekularen Disulfidbrücke (S-S) dargestellt.

1.3.4. Struktur von PrP^C

Die Prion-Proteine der Säugetiere sind außerordentlich stark konserviert. Bei einem paarweisen Vergleich der Aminosäuresequenz ist in der Regel mehr als 90% Sequenzidentität zu verzeichnen (Schätzl et al. 1995), weshalb für die Prion-Proteine der Säuger eine identische globuläre Proteinstruktur und damit einhergehend auch eine gemeinsame Funktion angenommen werden kann. Im Hinblick auf die Prion-Hypothese, nach welcher die strukturelle Umwandlung des Prion-Proteins eine zentrale Rolle in der Pathogenese einnimmt,

ist die Bestimmung der drei-dimensionalen Struktur der beiden PrP-Formen von besonderem Interesse. Aus spektroskopischen Messungen ist seit 1993 bekannt, dass sich PrP^C und PrP^{Sc} hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur wesentlich unterscheiden. Während bei PrP^{Sc} ein großer Teil des Proteins aus β -Faltblättern besteht, bildet bei PrP^C die α -Helix das Hauptelement der Sekundärstruktur (Caughey und Raymond 1991; Pan et al. 1993).

Da sich die Gewinnung der für eine röntgenkristallographische Strukturermittlung essentiellen hochreinen Einkristalle des zellulären Prion-Proteins als schwierig erwiesen hat, wurden die meisten Strukturdaten durch die magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR, „nuclear magnetic resonance“) an löslichen Proteinen gewonnen. Als entscheidend für die dafür nötige Gewinnung großer Mengen an löslichem Prion-Protein erwies sich die Produktion von rekombinantem Prion-Protein (rPrP) durch das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*), wobei die Prion-Proteine in *E. coli* unglykosyliert und ohne GPI-Anker synthetisiert werden (Mehlhorn et al. 1996). In unabhängigen Aufreinigungsansätzen, bei denen einerseits die gesamte Sequenz des reifen Prion-Proteins (PrP₂₃₋₂₃₁) aus den Einschlusskörperchen rekonstituiert (Hornemann et al. 1997), andererseits die C-terminale Hälfte (PrP₁₂₁₋₂₃₁) durch das Anhängen einer Signalsequenz in löslicher Form aus dem periplasmatischen Raum isoliert wurde (Hornemann und Glockshuber 1996), konnten NMR-taugliche Präparate hergestellt werden. Seitdem sind die NMR-Strukturen von rekombinantem Prion-Protein verschiedener Spezies bestimmt worden, wobei sich im Einklang mit dem hohen Grad an Sequenzidentität eine gemeinsame Faltungsstruktur zeigte (Riek et al. 1996; Donne et al. 1997; James et al. 1997; Riek et al. 1997; Riek et al. 1998; Liu et al. 1999; Calzolari et al. 2000; Lopez Garcia et al. 2000; Zahn et al. 2000; Calzolari und Zahn 2003; Hornemann et al. 2004; Calzolari et al. 2005; Gossert et al. 2005; Lysek et al. 2005), welche der aus der NMR-Analyse gewonnenen Struktur von gereinigtem PrP^C aus gesundem Kälberhirn entspricht (Hornemann et al. 2004). Obwohl speziesbedingte Konformationsunterschiede zu finden sind, ist die Struktur von PrP^C allgemein durch einen flexiblen N-Terminus und einen globulären, strukturierten C-terminalen Teil gekennzeichnet. Der strukturierte Teil besteht aus drei α -Helices und zwei kurzen anti-parallel verlaufenden β -Faltblättern. Beim humanen PrP^C umspannen die drei α -Helices die Aminosäuren 144-154, 173-194 und 200-228 und die β -Faltblattanteile die Aminosäuren 128-131 und 161-164 (Zahn et al. 2000). Der N-Terminus, welcher in der NMR-Analyse flexibel und ungeordnet erscheint, ist durch einen Bereich mit einem hohen Glycin- und Prolin-Anteil gekennzeichnet, welcher die Grundlage für die strukturelle Flexibilität bildet. Glycin und Prolin sind zusammen mit Glutamin-, Tryptophan- und Histidin-Resten in einem wiederkehrenden Oktapeptid-Motiv („Octarepeat“:

PHGGGWGQ) angeordnet. Die Anzahl der Motiv-Wiederholungen kann abhängig von der betrachteten Spezies zwischen zwei und sieben betragen (van Rheede et al. 2003), wobei auch familiäre Fälle der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit beschrieben sind, bei denen die Insertion von Oktapeptid-Motiven die Krankheitsursache darstellt (Owen et al. 1990; Goldfarb et al. 1991; Capellari et al. 1997). Die Oktapeptid-Region von PrP^C bindet Kupfer mit hoher Affinität (Hornshaw et al. 1995; Brown et al. 1997a; Viles et al. 1999). Die Kupfer-Bindung ist kooperativ und bewirkt eine Konformationsänderung des flexiblen Bereichs (Morante et al. 2004). Im Wesentlichen wird die Kupfer-Assoziation durch die Histidin-Reste der Oktapeptid-Region vermittelt, wobei eventuell auch die Histidine der Codons 96 und 111 an der Kupfer-Bindung beteiligt sind (Aronoff-Spencer et al. 2000; Burns et al. 2002; Burns et al. 2003).

1.3.5. Funktion von PrP^C

Trotz zahlreicher Versuchsansätze ist die physiologische Funktion des Prion-Proteins bislang nicht geklärt. Obwohl PrP^C während der Embryogenese differentiell exprimiert wird und in adulten Individuen in vielen Geweben, insbesondere im ZNS, zu finden ist (Kretzschmar et al. 1986a; Cashman et al. 1990; Bendheim et al. 1992; Manson et al. 1992; Harris et al. 1993; Moser et al. 1995; Dodelet und Cashman 1998), zeigen verschiedene transgene Mauslinien mit einem inaktivierten *Prnp*-Gen (so genannte PrP-„Knockout“- oder *Prnp*^{-/-}-Mäuse) eine normale Entwicklung ohne auffällige Verhaltensstörungen (Bueler et al. 1992; Manson et al. 1994). Alternde Mäuse weisen eine Demyelinisierung im peripheren Nervensystem auf, mit welcher allerdings keine klinischen Symptome einhergehen (Nishida et al. 1999).

Bei einer weiteren *Prnp*^{-/-}-Mauslinie konnten eine sehr stark ausgeprägte Ataxie und der Verlust von Purkinjezellen im Kleinhirn festgestellt werden (Sakaguchi et al. 1996). Dieser charakteristische Phänotyp wurde jedoch in späteren Analysen auf die „Knockout-Strategie zurückgeführt, durch welche das normalerweise nicht im Gehirn exprimierte PrP-Homolog Doppel (Dpl) unter die Kontrolle des *Prnp*-Promotors gelangte (Moore et al. 1999). Dpl ist ein N-glykosyliertes, GPI-verankertes Protein (Silverman et al. 2000), welches aufgrund der 25%-igen Sequenzidentität eine ähnliche globuläre Domäne wie PrP^C aufweist (Lu et al. 2000; Mo et al. 2001) und in adulten Mäusen in vielen Geweben, nicht jedoch im Gehirn (Moore et al. 1999) exprimiert wird. Der auffällige Phänotyp dieser Mauslinie wurde daher nicht auf die Abwesenheit von PrP^C, sondern auf das veränderte Dpl-Expressionsmuster zurückgeführt.

Die Fähigkeit des Prion-Proteins zur Kupferbindung (Brown et al. 1997a), die Lokalisation von PrP^C in der präsynaptischen Membran (Herms et al. 1999) sowie die Stimulation der PrP^C-Endozytose durch Zugabe von Kupfer in das Kulturmedium neuronaler Zellen (Pauly und Harris 1998) deuten auf eine Rolle in der Kupfer-Homöostase an der Synapse hin (Kretzschmar et al. 2000). Weiterhin zeigen kultivierte neuronale Zellen von *Prnp*^{-/-}-Mäusen eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress, was mit einer verringerten Superoxid-Dismutase-Aktivität assoziiert zu sein scheint (Brown et al. 1997b; Brown und Besinger 1998). Im Skelett- und Herzmuskel sowie in der Leber von *Prnp*^{-/-}-Mäusen lässt sich eine gesteigerte Oxidation von Proteinen und Lipiden nachweisen (Klamt et al. 2001), weshalb PrP^C eine mögliche anti-oxidative Wirkung zugeschrieben wird.

Aufgrund der GPI-Anker vermittelten Lokalisation an der Zellmembran (Stahl et al. 1987) waren viele Studien auf die Suche nach potentiellen Interaktionspartnern von PrP^C ausgerichtet. GFAP (engl.: glial fibrillary acidic protein) war als einer der ersten möglichen zellulären Bindungspartner beschrieben worden (Oesch et al. 1990). Des Weiteren wurden Bcl-2 (Kurschner und Morgan 1995; Kurschner und Morgan 1996), molekulare Chaperone, das Amyloid-Vorläufer-ähnliche Protein 1 (APLP1, (Yehiely et al. 1997), der 37 kDa Lamininrezeptor (Rieger et al. 1997) und ein 66 kDa Membranprotein, das mittlerweile als STI1 (engl.: stress-inducible protein) identifiziert wurde (Martins et al. 1998; Lopes et al. 2005), als potentielle Bindungspartner postuliert. Als ein möglicher Interaktionspartner für das zelluläre Prion-Protein wurde auch die Tyrosinkinase Fyn diskutiert. Fyn ist als intrazellulär an der Membran lokalisierte Kinase an der Aktivierung von Phospholipasen beteiligt, die ihrerseits Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP3) generieren (Jayaraman et al. 1996). IP3 aktiviert seinerseits den IP3- Rezeptor, einen intrazellulären Ca²⁺-Kanal, der am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Die IP3-Bindung resultiert in einer Erhöhung des Ca²⁺-Gehaltes innerhalb des Somas durch Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt zu einer Inhibierung membranständiger Ca²⁺-Kanäle (Kostyuk 1989). PrP^C scheint diese zu den Src-Kinasen gehörende Tyrosinkinase durch Erhöhung des Phosphorylierungsniveaus zu aktivieren und somit indirekt Einfluss auf die Ca²⁺-Homöostase zu nehmen, wobei Caveolin 1 als Mediator zwischen PrP und Fyn fungieren könnte (Mouillet-Richard et al. 2000). In neueren Arbeiten konnte außerdem gezeigt werden, dass phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) PrP^C-abhängig aktiviert wird und Hirnlysate von *Prnp*^{-/-}-Mäusen eine verminderte PI3K-Aktivität aufweisen (Vassallo et al. 2005). Verminderte PI3K-Aktivität wiederum könnte eine mögliche Ursache

für das Auftreten von vergrößerten Hirninfarkten und erhöhte Verwundbarkeit gegenüber oxidativem Stress bei *Prnp*^{-/-}-Mäusen sein (Vassallo et al. 2005; Weise et al. 2006).

Die vornehmlich synaptische Lokalisation von PrP^C führte zu vertiefenden Studien, die die Reizweiterleitung bei *Prnp*^{-/-}-Mäusen und damit verbundene Aspekte genauer untersuchten. *Prnp*^{-/-}-Mäuse zeigten vermehrtes Sprießen von Moosfasern, der Präsynapse im Hippocampus (Colling et al. 1997). Außerdem konnte eine Verminderung der Long Term Potentiation (LTP) gezeigt werden, welche eine wichtige Rolle beim Lernen spielt (Collinge et al. 1994). Weiterhin wurden beeinträchtigte „Feld Exzitatorische Postsynaptische Potenziale“ (fEPSPs) bei der PrP-Knockout-Maus gefunden, was auf eine verminderte synaptische Reizweiterleitung hindeutet (Carleton et al. 2001). Ebenso wurden reduzierte Kupferkonzentrationen in Synaptosomen von *Prnp*^{-/-}-Mäusen gefunden, die ebenfalls eine beeinträchtigte Synapsenfunktion implizieren (Brown et al. 1997a; Herms et al. 1999). So verwundert es nicht, das bei *Prnp*^{-/-}-Mäusen auch kognitive Defekte (Criado et al. 2005), vermindertes Neuriten-Wachstum (Santuccione et al. 2005) und veränderte zirkadiane Aktivitäts- und Schlaf-Rhythmen festgestellt wurden (Tobler et al. 1996; Tobler et al. 1997). Der konsistenteste beobachtete elektrophysiologische Phänotyp, der in verschiedenen unabhängig generierten *Prnp*^{-/-}-Mauslinien reproduziert werden konnte, ist die Verminderung der späten Nachhyperpolarisation (*sI*_{AHP}: slow afterhyperpolarization current) in CA1-Neuronen des Hippocampus der Maus (Colling et al. 1996; Mallucci et al. 2002; Asante et al. 2004). WHATLEY et al. (1995) zeigten an Synaptosomenpräparationen von Mäusehirnen eine Zunahme der intrazellulären freien Ca²⁺-Konzentration durch appliziertes rekombinantes Prion-Protein, die anscheinend durch spannungsaktivierte Ca²⁺-Kanäle vermittelt wird. Neuere Untersuchungen an Primärzellkulturen von Körnerzellen ergaben jedoch das genaue Gegenteil, nämlich die Verminderung des Ca²⁺-Einstroms durch VGCCs (Korte et al. 2003). Diese Unterschiede könnten Ursache der verschiedenen *in vitro* Modellsysteme sein.

1.4. Die pathogene Isoform des Prion-Proteins

1.4.1. Struktur

Im Gegensatz zur physiologischen Form des Prion-Proteins (PrP^C), welches in gesunden Individuen in fast allen Geweben exprimiert wird (Bendheim et al. 1992; Manson et al. 1992), ist PrP^{Sc} hauptsächlich im Gehirn und in bestimmten lymphoretikulären Geweben, wie z.B. der Milz, nachweisbar. In geringerem Maß konnte PrP^{Sc} jedoch auch im Skelettmuskel von

transgenen Mäusen (Bosque et al. 2002) und Hamstern (Thomzig et al. 2003) nachgewiesen werden. Bei Hamstern war dies nach oraler Infektion und schon vor dem Einsetzen klinischer Symptome möglich (Thomzig et al. 2004). Bei Schafen und Ziegen konnte PrP^{Sc} in geringen Mengen auch im Amnion (Pattison et al. 1972; Pattison et al. 1974), in der Amnionflüssigkeit und der Plazenta detektiert werden. Das Auftreten der pathogenen Isoform in diesen Geweben wird als Hauptursache für die vertikale und horizontale Übertragung von Scrapie innerhalb dieser Spezies gesehen (Brotherston et al. 1968; Dickinson et al. 1974). Außer für die chronisch zehrende Krankheit der Hirschartigen (CWD) (Miller und Williams 2003) konnten vertikale und horizontale Übertragungen nicht bei anderen Säugetieren beobachtet werden.

Beide PrP-Formen, PrP^C und PrP^{Sc}, weisen die gleiche, vom *Prnp*-Gen des Wirtes codierte Aminosäureabfolge auf (Oesch et al. 1985; Basler et al. 1986), worin vermutlich der Grund liegt, weshalb der Erreger nicht immunogen wirkt und daher während des Krankheitsverlaufs weder eine entzündliche noch eine immunologische Reaktion zu beobachten ist.

Auch Unterschiede aufgrund von posttranslationellen chemischen Modifikationen konnten zwischen den beiden Isoformen nicht festgestellt werden (Stahl et al. 1993). Die Aminosäuresequenz, der GPI-Anker und die Glykosylierungen werden daher bei beiden Formen als identisch angenommen, wobei die Zusammensetzung der Zuckerketten an Asn181 und Asn197 eine gewisse Heterogenität ausweist, weshalb eine vergleichende Analyse nur innerhalb dieser Variabilität möglich ist (Endo et al. 1989; Haraguchi et al. 1989; Stahl et al. 1993; Rudd et al. 1999; Stimson et al. 1999).

KEH-MING PAN konnte im Jahr 1993 durch Strukturanalysen mittels Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie zeigen, dass der relevante Unterschied zwischen PrP^C und PrP^{Sc} in der Proteinkonformation begründet ist (Pan et al. 1993). PrP^{Sc} ist im Gegensatz zu PrP^C, welches zu 40% aus α -Helices besteht und einen sehr geringen Anteil an β -Faltblättern aufweist, durch einen 50%-igen Anteil an β -Faltblättern und einem 20%-igen Anteil an α -Helices charakterisiert (Caughey et al. 1991; Pan et al. 1993; Safar et al. 1993a).

PrP^{Sc} bildet unlösliche Aggregate, welche in unterschiedlichen Ablagerungsmustern im Gehirn zu beobachten sind (Bendheim et al. 1984; Kitamoto et al. 1986). Aufreinigungen von PrP^{Sc} sind hochinfektiös (Diringer et al. 1983; Prusiner et al. 1983; Gabizon et al. 1988) und lassen sich im Elektronenmikroskop als geordnete Proteinaggregate, so genannte Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) oder „prion rods“ darstellen (Merz et al. 1981; Bolton et al. 1982; Prusiner 1982; Prusiner et al. 1983). Die Existenz von Nukleinsäuren in angereicherten PrP^{Sc}-Präparationen konnte für Moleküle mit einer Größe von über 80 Nukleotiden pro

Infektionseinheit ausgeschlossen werden (Meyer et al. 1991; Kellings et al. 1992; Kellings et al. 1993; Riesner et al. 1993).

Die strukturellen Unterschiede von PrP^{Sc} im Vergleich zu PrP^C bedingen eine Reihe von biochemischen Besonderheiten. Dazu zählt die ungewöhnliche Resistenz gegenüber der Inaktivierung durch Chemikalien (Prusiner et al. 1993), gegenüber einer Hitzedenaturierung (Safar et al. 1993b) und gegenüber dem Abbau durch Proteasen (McKinley et al. 1983). Selbst eine Behandlung mit der proteolytisch besonders aktiven Proteinase K (PK) bewirkt nur einen partiellen Abbau. Ein Umstand, der für die differentielle Detektion von PrP^C und PrP^{Sc} verwendet werden kann. Durch die Einwirkung der PK wird ein etwa 68 Aminosäuren umfassendes N-terminales Segment von PrP^{Sc} abgespalten, wodurch ein verändertes Migrationsverhalten bei der gelelektrophoretischen Auftrennung hervorgerufen wird. PrP^C hingegen wird unter denselben Bedingungen durch die PK innerhalb kurzer Zeit abgebaut (McKinley et al. 1983; Barry et al. 1986). Da PK-verdautes PrP^{Sc} Infektiösität aufweist (McKinley et al. 1983) und transgene Mäuse, die ein äquivalent verkürztes Prion-Protein exprimieren, mit PK-behandeltem PrP^{Sc} infiziert werden können und die Krankheit von diesen Tieren weiter übertragbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass die volle Länge des Prion-Proteins für den Replikationszyklus von PrP^{Sc} nicht zwingend benötigt wird (Fischer et al. 1996).

Aufgrund der Eigenschaft von PrP^{Sc}, unlösliche Aggregate zu bilden, konnten klassische Techniken zur Strukturanalyse, wie NMR oder Röntgenbeugung, bei der pathogenen Isoform des Prion-Proteins nicht angewendet werden. Systematische Studien mit dem Ziel PrP^{Sc} in Lösung zu bringen, wurden überwiegend mit Guanidinium-Hydrochlorid (GndHCl) (Prusiner et al. 1993; Kocisko et al. 1994) sowie Sarkosyl und Natriumdodecylsulfat (SDS) (Riesner et al. 1996) durchgeführt, wobei die Auflösung der PrP^{Sc}-Aggregate in der Regel mit einer Reduktion des β -Faltblattgehaltes einherging. Die Reduktion des β -Faltblattgehaltes von PrP^{Sc} führte jedoch zu einer Verringerung der Infektiösität, woraus die Schlussfolgerung gezogen wurde, dass die Konversion von α -Helix zu β -Faltblatt das fundamentale Ereignis in der PrP^{Sc}-Bildung als auch in der Replikation der Prion-Infektiösität darstellt (Gasset et al. 1993; Riesner et al. 1996).

Ein älteres Tertiärstrukturmodell von PrP^{Sc}, welches basierend auf einer PrP^C-Struktur mit vier α -Helices computergestützt entworfen wurde (Huang et al. 1994; Huang et al. 1995), konnte mittlerweile durch ein neueres Modell ersetzt werden, welches auf elektronenmikroskopischen Analysen von Hintergrundfärbungen („negative staining“) gereinigter und PK-verdauter PrP^{Sc}-Präparationen basiert (Wille et al. 2002). Dieses neue

Strukturmodell legt eine parallele links-gewundene β -Helix als strukturelles Kernmotiv der missgefalteten Form des Prion-Proteins zugrunde (Wille et al. 2002). In weiterführenden Analysen mit einer verbesserten Auflösung zeigte sich, dass Modelle aus übereinander gestapelten Schichten von in Trimeren angeordneten PrP^{Sc}-Molekülen mit links-gewundenen β -Helices die beste Anpassung an die gewonnenen Bilddaten darstellten (Govaerts et al. 2004). Auch in computergestützten „molecular dynamics“-Simulationen hat sich die parallele links-gewundene β -Helix als ein stabiles Strukturmodell für die pathogene Isoform des Prion-Proteins erwiesen (Stork et al. 2005). Da bei einer Reihe weiterer neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. beim Morbus Alzheimer und Chorea Huntington, die β -Helix als zentrales Strukturelement der pathogenen Proteinablagerungen diskutiert wird, könnte die Ausbildung von β -helicalen Strukturen bei der Amyloidbildung ein grundlegendes Prinzip darstellen (Sunde et al. 1997; Perutz et al. 2002; Stork et al. 2005).

1.4.2. Neurotoxizität

Mit Scrapie infizierte Hamster zeigen wie *Prnp*^{-/-}-Mäuse eine verminderte mittlere und späte Nachhyperpolarisation (Barrow et al. 1999). Elektrophysiologische Befunde am Hippocampus Scrapie-infizierter Mäuse deuten darauf hin, dass konvertiertes PrP^{Sc} modulatorisch in die synaptische Übertragung involviert ist. So wiesen Hippocampus-Neurone von mit Scrapie-Erregern infizierten Tieren im fortgeschrittenen Krankheitsstadium außer der verminderten Nachhyperpolarisation (Johnston et al. 1998a; Barrow et al. 1999) eine veränderte Kinetik der Aktionspotenziale, eine verminderte exzitatorische und inhibitorische Signalübertragung sowie einer Veränderung des Ruhemembranpotenzials und des Membranwiderstandes auf (Jefferys et al. 1994; Johnston et al. 1997; Johnston et al. 1998a; Johnston et al. 1998b).

Mikrofluorimetrische Ca²⁺-Messungen an Mikroglia zeigen, dass sich die freie intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration von Mikroglia durch Applikation des toxischen PrP106-126-Fragments erhöht (Herms et al. 1997). Spätere Untersuchungen ließen vermuten, dass diese Erhöhung L-Typ-Kanal vermittelt ist (Silei et al. 1999). THELLUNG (Thellung et al. 2000a) konnte an cerebellären Körnerzellkulturen der Ratte ebenfalls eine Modulation der L-Typ-Ca²⁺-Ströme durch PrP106-126 zeigen. Dieses Fragment des Prion-Proteins zeigt pathogenetische Charakteristika von PrP^{Sc}, wie die Tendenz zur Bildung von β -Faltblatt-Strukturen und amyloiden Fibrillen (Tagliavini et al. 1993; Degioia et al. 1994) und die partielle Resistenz gegen Proteolyse (Selvaggini et al. 1993). Seine Neurotoxizität wird von mehreren Autoren beschrieben (Forloni et al. 1993; Florio et al. 1996; Brown et al. 1996). Es gibt Indizien dafür,

dass PrP106-126 über die Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms die Proliferation von Astrozyten induziert (Florio et al. 1996). Im Gegensatz zu den früheren Studien an Gliazellen wurde bei der Untersuchung von Körnerzellen allerdings eine Reduktion des L-Typ-vermittelten Ioneneinstroms postuliert, was in einer Studie an Primärzellkulturen von kortikalen Neuronen und an einer neuroektodermalen Zelllinie (GH3-Zelllinie) verifiziert werden konnte (Florio et al. 1998; Thellung et al. 2000b).

Schon 1992 konnte gezeigt werden, dass für die Propagation von PrP^{Sc} normales PrP^{C} vorhanden sein muss, da mit PrP^{Sc} -haltigem Hirnhomogenat infizierte *Prnp*^{-/-}-Mäuse keine Pathologie zeigten (Bueler et al. 1992). Dies wurde weiter belegt durch den Befund, dass *Prnp*^{-/-}-Mäuse, denen PrP^{C} -haltiges Hirngewebe transplantiert wurde, und die anschließend mit PrP^{Sc} infiziert wurden, zwar messbare Mengen an PrP^{Sc} bilden, aber nicht krank werden (Brandner et al. 1996). Eine neuere Studie zur Neurotoxizität von PrP^{Sc} offenbarte, dass transgene Mäuse, bei denen der GPI-Anker von PrP^{C} deletiert wurde, zwar PrP^{Sc} -haltige Plaques bilden, jedoch ebenfalls keine klinischen Symptome entwickeln (Chesebro et al. 2005). Dies bedeutete, dass zwar PrP^{C} vorhanden war und offenbar auch in PrP^{Sc} umgewandelt wurde, jedoch keine Neurotoxizität ausübte. Daraufhin wurden drei Hypothesen aufgestellt, wie PrP^{Sc} allein und im Zusammenspiel mit der normalen Funktion von PrP^{C} neurotoxisch wirken kann (Harris und True 2006). Erstens könnte es durch die massenhafte Umfaltung von PrP^{C} in PrP^{Sc} zu einem „loss of function“ von PrP^{C} kommen. In Kombination mit einer möglichen anti-apoptischen protektiven Funktion von PrP^{C} (Roucou und Leblanc 2005; Zhang et al. 2006) könnte der Verlust eben dieser Funktion zur Neurotoxizität führen. Diese Hypothese ist allerdings schwach, da die *Prnp*^{-/-}-Maus keine auffälligen Symptome zeigt. Trotzdem kann eine unter normalen Bedingungen entbehrliche Funktion von PrP^{C} unter pathologischen Bedingungen essentiell sein. Zweitens besteht die Möglichkeit, dass es nicht zu einem kompletten Verlust der PrP^{C} -Funktion kommt, sondern zu einer Umwandlung der normalen Funktion von PrP^{C} durch PrP^{Sc} . Zum Beispiel könnte ein unter normalen Umständen bestehender Signaltransduktionsweg ausgehend von PrP^{C} , der neuroprotektiv wirkt, durch Bindung von PrP^{Sc} oder anderer Intermediate an PrP^{C} , in eine eher neurotoxische Richtung verändert werden. Dies könnte z.B. durch PrP^{Sc} -induziertes Quervernetzen von PrP^{C} an der Zelloberfläche geschehen. So konnte bereits gezeigt werden, dass PrP^{Sc} Apoptose in Neuronen *in vivo* induziert (Solforosi et al. 2004). Beide Hypothesen stehen im Gegensatz zur dritten, die einen „gain of function“ Prozess der PrP^{Sc} -Neurotoxizität postuliert. Diese Hypothese wird auch gerne für die Begründung der Neurodegeneration bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Corea Huntington und Parkinson

herangezogen. Bei all diesen Erkrankungen geht man davon aus, dass im Hirn akkumulierende Protein-Aggregate de novo Neurotoxizität entwickeln, die unabhängig von der normalen Funktion des Proteins ist. So könnten z.B. PrP^{Sc}-Aggregate axonalen Transport blockieren, synaptische Übertragung beeinträchtigen oder sogar Neurone physikalisch schädigen. Allerdings erklärt dieses Modell in keiner Weise die toxischen Effekte, die bei familiären Prionerkrankungen auftreten, bei denen aber keine Aggregate zu finden sind (Chiesa und Harris 2001). So findet man zum Beispiel bei Mäusen, die eine „Gerstmann Sträussler Scheinker Syndrom“ (GSS)-assoziierte Mutation im *Prnp*-Gen (P101L) als Transgen exprimieren, nur sehr wenig PrP^{Sc}, jedoch eine stark ausgeprägte Pathologie (Manson et al. 1999). Ebenso zeigen TGA20-Mäuse, die PrP^C überexprimieren, zwar eine stark verkürzte Inkubationszeit, jedoch findet man nur halb soviel PrP^{Sc} wie bei Wildtyp-Mäusen in der terminalen Phase (Fischer et al. 1996). Ob also „gain“, „loss“ oder Umwandlung der normalen PrP^C-Funktion oder eine Kombination der drei vorgeschlagenen Mechanismen Ursache der Neurotoxizität sind, bleibt bis jetzt ungeklärt.

1.5. Neurodegeneration

Die vier charakteristischen Veränderungen spongiöser Erkrankungen sind Gliose, Vakuolisierung, Protein-Ablagerungen und neuronale Apoptose (Hörnlimann et al. 2001). Spongiforme Veränderungen sind kleine blasenartige Gebilde im Neuropil mit einem Durchmesser von 2-10 µm. Bei einigen CJD Fällen findet man so genannte konfluierende Vakuolen mit einem Durchmesser von 10-50 µm, die aus traubenartigen Zusammenschlüssen einzelner Hohlräume entstehen (Abb. 3A, B). Bei verschiedenen spongiösen Erkrankungen findet man außerdem verschiedene PrP^{Sc}-Ablagerungen (Abb. 3C). Diese bestehen aus Fibrillen mit einem Fibrillendurchmesser von 10 nm und unterschiedlicher Länge (Abb. 3D). Die Ablagerungen sind reich an β-Faltblatt Strukturen und besitzen eine starke Affinität zu Kongorot. Sie werden als „prion rods“ oder Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) bezeichnet (Hörnlimann et al. 2001). Bei verschiedenen CJD Formen findet man weiterhin große Ansammlungen von PrP^{Sc}-Ablagerungen, die als Plaques bezeichnet werden. Dabei unterscheidet man Kuru-Plaques, Multizentrische Plaques und Floride Plaques (Kretzschmar 2003). Ein weiteres Charakteristikum von Prionerkrankungen ist eine häufig vorzufindende Gliose. Im Mausmodell konnte von GIESE et al. gezeigt werden, dass die Aktivierung von Mikroglia und die PrP^{Sc}-Deposition zeitlich parallel ablaufen, aber die Aktivierung der

Mikroglia der neuronalen Apoptose vorangeht (Giese et al. 1998). Es wird diskutiert, ob durch PrP^{Sc} aktivierte Mikroglia Apoptose von Nervenzellen induziert. Aktivierte Mikroglia könnte z.B. durch Ausschüttung von zytotoxischen Zytokinen oder durch vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen (O₂⁻) zur neuronalen Apoptose im Verlauf der Scrapie Erkrankung bei der Maus beitragen (Giese und Kretzschmar 2001).

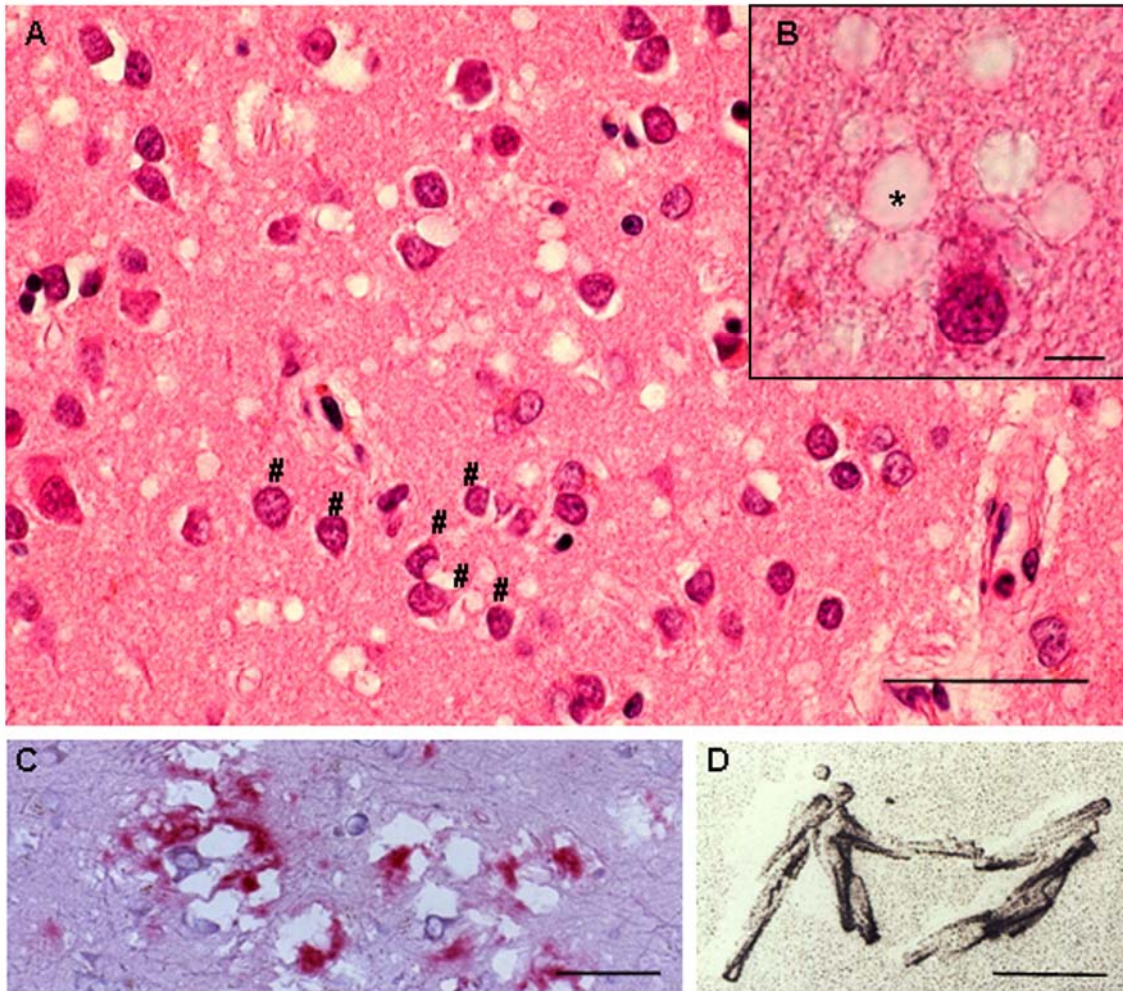


Abb. 3: Histologie von CJD, PrP^{Sc}-Ablagerung und Fibrillen

(A) Histologische Übersichtsaufnahme aus dem Kortex eines CJD Patienten (Balken: 80 µm). #-Zeichen weisen auf Astrogliose hin. Außerdem findet man vermehrten Nervenzellverlust und Spongiformität. (B) Hochauflösende histologische Aufnahme aus dem Kortex eines CJD Patienten. *-Zeichen zeigt Vakuolen an, die das typische Charakteristikum bei spongiformen Enzephalopathien darstellen (Maßstab: 10 µm). (C) Immunhistochemische Färbung von PrP^{Sc}-Ablagerungen im CJD Gehirn (rot; Maßstab: 20 µm). (D) Elektronenmikroskopische Aufnahme von PrP^{Sc}-Fibrillen (EM Bild, Diringer 1983; Maßstab: 100 nm).

Die im Verlauf der Prionerkrankungen auftretenden neurologischen Defekte resultieren wahrscheinlich aus einer Kombination von synaptischer Pathologie und neuronalem Zelltod. Mit Hilfe von Elektronenmikroskopie und konfokaler Mikroskopie wurden die neuronalen Veränderungen bei der Scrapie-infizierten Maus untersucht (Johnston et al. 1997; Jeffrey et al. 1997; Belichenko et al. 2000; Jeffrey et al. 2000; Brown et al. 2001). Bei der

elektronenmikroskopischen Analyse hippocampaler Neurone von Mäusen, die mit dem Scrapie-Erreger-Stamm ME7 infiziert wurden, fand man eine frühe Ablagerung von PrP^{Sc} im Hippocampus. Diese wurde gefolgt von einem Verlust der Axon-Endigungen und dendritischen Spines und endete schließlich mit dem Verlust von pyramidalen CA1-Neuronen des Hippocampus (Jeffrey et al. 1997; Jeffrey et al. 2000). Bereits 1987 beschrieb HOGAN den Verlust von Spines und die Zunahme von dendritischen Schwellungen bei Scrapie-infizierten Hamstern (Hogan et al. 1987). Diese Schwellungen wurden ebenfalls in Hirnen von CJD und Alzheimerpatienten gefunden (Ferrer et al. 1981; Landis et al. 1981). Dabei wurde erstmals die Annahme geäußert, dass die dort gefundenen dendritischen Schwellungen die Vorform der Vakuolen darstellen, die charakteristisch für spongiöse Erkrankungen sind. Der Verlust von Spines und Dendriten gepaart mit dem Auftreten von dendritischen Schwellungen konnte mit verschiedenen Techniken wie Biocytin-Färbung oder Lucifer-Yellow Injektion in CA1-Neuronen des Hippocampus von Scrapie-infizierten Mäusen bestätigt werden (Johnston et al. 1997; Belichenko et al. 2000; Brown et al. 2001). Welche Mechanismen an der Entstehung der beschriebenen neuropathologischen Veränderungen beteiligt sind und wie die pathogene und zelluläre Isoform des Prion-Proteins daran beteiligt sind, konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden.

1.6. Spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle

Ionenkanäle spielen bei zellulären Prozessen wie der axonalen Reizleitung, der synaptischen Übertragung oder dem Aufbau des Membranpotenzials eine tragende Rolle. Spannungsaktivierte Ca²⁺-Kanäle (VGCC, engl.: voltage gated calcium channel) bilden eine Klasse von Ionenkanälen, die als Transmembranproteine unter physiologischen Bedingungen selektiv Ca²⁺-Ionen über spannungsgesteuerte Mechanismen aus dem Extrazellulärraum in das Lumen der Zelle transportieren.

In Ruhesituation ist die extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration um das 10000-fache höher als die intrazelluläre. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration erfolgt über die Aktivierung spannungsgesteuerter Ca²⁺-Kanäle, durch Liganden gesteuerte Ionenkanäle, wie NMDA (N-Methyl-D-aspartat)- oder AMPA (α-amino-3-hydroxy-methyl-4-isoxazole propionic acid)-Rezeptoren, und durch die Ausschüttung von Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Ca²⁺-Speichern, wie dem Endoplasmatischen Retikulum. Ca²⁺-Ionen spielen eine wichtige Rolle in der Physiologie der Zelle. Sie agieren als intrazelluläre Botenstoffe und regulieren

oder initiieren biochemische oder elektrische Ereignisse. Ca^{2+} -Ionen und dadurch indirekt Ca^{2+} -Kanäle sind an Mechanismen wie der Enzymregulation, Genexpression, Muskelkontraktion sowie einer Reihe von neuronenspezifischen Prozessen wie der Neurotransmitterausschüttung und der Synaptogenese beteiligt.

Bis heute sind sechs verschiedene Klassen spannungssensitiver Ca^{2+} -Kanäle identifiziert worden, die sich aufgrund ihrer Lage, Struktur und elektrophysiologischen und pharmakologischen Merkmale unterscheiden lassen. Sie werden als L-, T-, N-, P-, Q- und R-Typ bezeichnet (Birnbaumer et al. 1994). Diese verschiedenen Kanaltypen werden wiederum in zwei Kategorien eingeteilt. Eine Gruppe bilden die LVA-Kanäle, die durch niedrige Spannung aktiviert werden (engl.: low-voltage-activated) und durch schnelle Inaktivierungszeiten gekennzeichnet sind. Als einziger Vertreter dieser Kategorie sind bislang die T-Typ-Kanäle (T für transient) identifiziert worden. Sie sind unter anderem in Herzmuskelzellen zu finden, wo sie bei der Aufrechterhaltung der Schrittmacherfunktion eine Rolle spielen (Hagiwara et al. 1988). T-Typ-Kanäle weisen eine niedrige Konduktivität von 8 pS (Piko-Siemens) auf. Die andere Gruppe, die aus „high voltage activated“ Ca^{2+} -Kanälen (HVA, engl. für: durch hohe Spannung aktivierbar) gebildet wird, beinhaltet L-, N-, P-, Q-, und R-Typ. L-Typ-Kanäle (L für engl.: long-lasting) werden hauptsächlich in Muskelzellen und im zentralen Nervensystem gefunden und benötigen im Vergleich zu LVA-Kanälen zur Aktivierung eine starke Depolarisation. Sie zeigen zudem keine oder nur eine sehr geringe Inaktivierung (Jones 1998). Die mittlere Kanalkonduktivität wird mit 15 - 25 pS angegeben. Der dritte, als N-Typ bezeichnete Kanal (Plummer et al. 1989; Abbott und Litzinger 1994), der vorwiegend in Neuronen zu finden ist (N für neuronal), benötigt ebenfalls eine starke Depolarisation, um in den aktivierten Zustand überzugehen. Die Inaktivierbarkeit dieses Kanaltyps liegt zwischen der von L-Typ und T-Typ-Kanal und seine Einzelkanalkonduktivität beläuft sich auf 18 pS. Die übrigen drei als P-, Q-, und R-Typ bezeichneten spannungssensitiven Ca^{2+} -Kanäle bilden nach der selektiven Blockade von L-, T- und N-Typ den Reststrom. P-Typ-Ströme bilden den hauptsächlichsten Ca^{2+} -Strom in Purkinjezellen (Mintz et al. 1992; Teramoto et al. 1993; Zhang et al. 1993), und Q-Typ-Kanäle wurden in cerebellären Körnerzellen detektiert. Der nach Inhibierung aller bislang genannten Kanäle verbleibende Strom basiert auf dem Ca^{2+} -Influx durch R-Typ-Kanäle (Bourinet et al. 1996; Newcomb et al. 1998), die eine mit dem T-Typ-Kanal vergleichbare Konduktivität aufweisen. Obwohl es elektrophysiologisch messbare Unterschiede zwischen den einzelnen Kanaltypen gibt, ist eine genaue Identifizierung eines Ca^{2+} -Stromes nur auf pharmakologischem Wege möglich (Mori et al. 1996; Ertel et al. 1997).

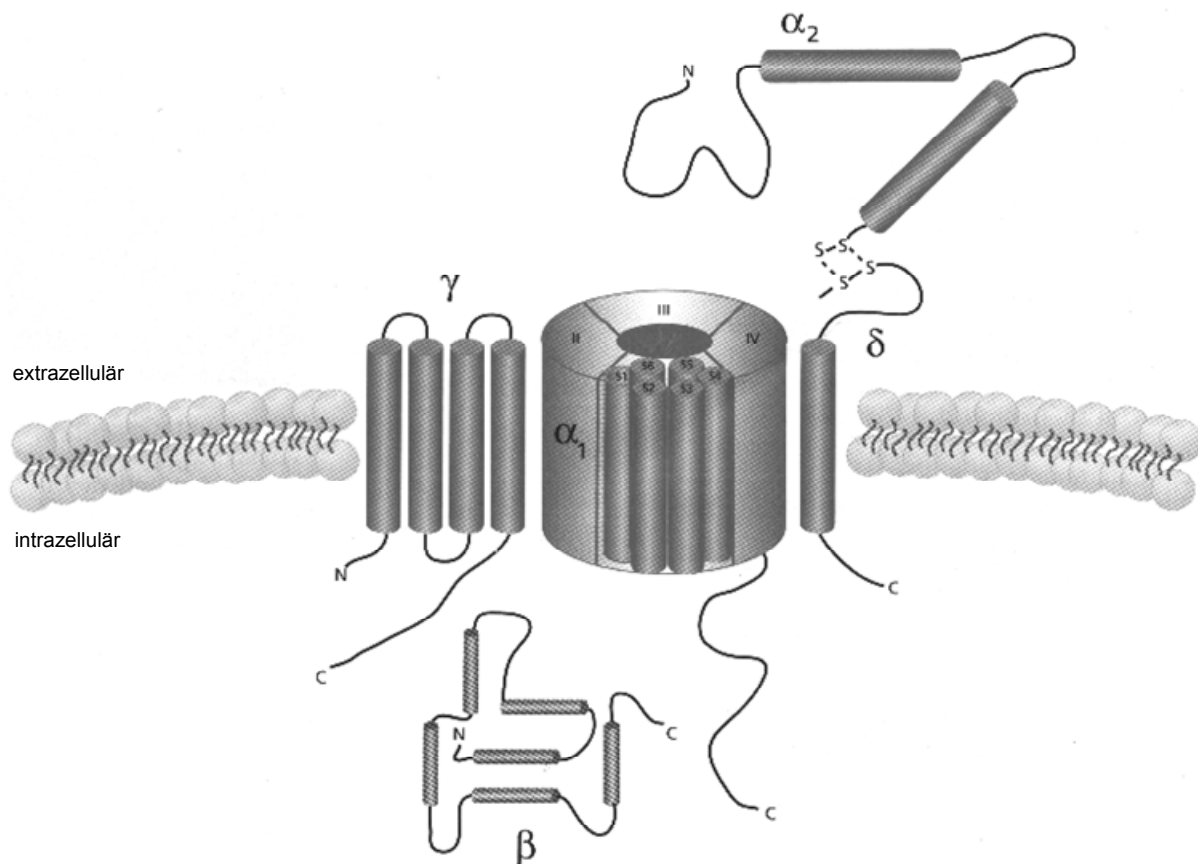


Abb. 4: Schematische Darstellung eines spannungsaktivierten Ca^{2+} -Kanals

Der α_1 - α_2 - δ β - Ca^{2+} -Kanal wird aus fünf verschiedenen Untereinheiten gebildet, die in einem heteromeren Komplex konstituiert sind, wobei mehrere α_1 -Untereinheiten eine spannungsabhängige Pore bilden (modifiziert nach Jones 1998).

So werden L-Typ-Kanäle spezifisch durch Dihydropyridine, wie Nifedipin, Nicardipin und Verapamil, blockiert. N-, P- und Q-Typ-Kanäle zeigen sich sensitiv gegenüber Peptiden, die aus Mollusken und Spinnen gewonnen werden und als Neurotoxine wirken, wie Conotoxine und Agatoxine. So interagiert Omega-Conotoxin GVIA selektiv mit dem N-Typ-Kanal in bereits nanomolaren Konzentrationen. Alle spannungsaktivierten Ca^{2+} -Kanäle zeichnen sich durch ihre Sensitivität gegenüber Kadmium aus (Slesinger und Lansman 1991). Dieses Merkmal kann zur Abgrenzung dieser Kanaltypen gegenüber anderen spannungsabhängigen Ionenkanälen (z. B. spannungssensitiven K^+ -Kanälen) dienen. Spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle sind als heteromultimere transmembrane Proteine aus fünf verschiedenen Untereinheiten aufgebaut (Jones 1998, Abb. 4). Die α_1 -Untereinheiten sind für die Funktionalität des Kanals entscheidend. Sie bilden die spannungsabhängige Ca^{2+} -selektive Pore durch die Membran und in einigen Fällen die Ligand-Bindungsstelle. Die β -Untereinheit

sorgt für die posttranslationelle Lokalisierung der anderen Untereinheiten im Kanal-Protein-Komplex. Unterschiedliche Positionierungen in der Membran werden durch unterschiedliche Isoformen dieser Untereinheit bestimmt (Catterall 2000). Die $\alpha 2$ -, δ - und γ -Domänen sind funktionell an der Regulation der spannungsabhängigen Aktivierung und Inaktivierung sowie an der Stabilisierung der Konformation beteiligt (Dalton et al. 2005).

1.7. Nachhyperpolarisation – I_{AHP} und sI_{AHP}

Späte Nachhyperpolarisation in Neuronen (sI_{AHP}) wird aufgebaut durch K^+ -Ionen, die durch Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle aus der Zelle ausströmen (Alger und Nicoll 1980; Hotson und Prince 1980; Schwartzkroin und Stafstrom 1980). Sie lösen eine Hyperpolarisation der Zellmembran aus, was zu einer Desensibilisierung des Neurons führt. Das Neuron wird für eine gewisse Zeit unempfindlich für eingehende Reize oder anders ausgedrückt, mit Hilfe von sI_{AHP} s wird die Erregbarkeit von Neuronen moduliert. In CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus der Maus findet man vornehmlich zwei Nachhyperpolarisations- Ströme, die „ I_{AHP} “ und „ sI_{AHP} “ genannt werden (Krause et al. 2002). Am nicht innervierten Skelettmuskel wurde gezeigt, dass Ca^{2+} -abhängige K^+ -Ströme von so genannten „small conductance“ (deutsch: kleine Leitfähigkeit) Kanälen vermittelt werden, woraufhin diese Kanäle SK-Kanäle (small conductance channels) genannt wurden (Hotson und Prince 1980; Stocker 2004). Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle, die dem I_{AHP} zugrunde liegen, gehören zur Familie der SK-Kanäle und werden charakterisiert durch ihre Sensitivität gegenüber dem Bienengift Apamin (Stocker et al. 2004). Im Gegensatz dazu zeichnen sich die dem sI_{AHP} zugrunde liegenden Kanäle dadurch aus, dass sie nicht sensitiv gegenüber Apamin sind, jedoch sensitiv für verschiedene Neurotransmitter, wie z.B. Monoamin Transmitter (Noradrenalin, Dopamin, Histamin and Serotonin), Acetylcholin und Glutamat (Nicoll 1988; Sah 1996). Die Kanäle, die dem sI_{AHP} zugrunde liegen, sind bis jetzt nicht identifiziert (Stocker et al. 2004). Weiterhin unterscheiden sich I_{AHP} und sI_{AHP} durch ihre unterschiedlichen Decay-Zeiten. Während der K^+ -Strom der I_{AHP} s innerhalb von hundert Millisekunden deaktiviert wird, dauert die Deaktivierung des sI_{AHP} s mehrere Sekunden. Beide Ströme sind spannungsunabhängig und Ca^{2+} -abhängig. Nach Membran-Depolarisation oder dem Feuern eines Aktionspotenzials werden I_{AHP} Ströme durch Ca^{2+} aktiviert, das über spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (VGCCs: voltage gated Calcium channels) in die Zelle einströmt. L-Typ-VGCCs sind dabei in enger Nachbarschaft zu SK-Kanälen lokalisiert, sodass einströmendes Ca^{2+} direkt an SK-

Kanäle binden kann und diese öffnet. Der sI_{AHP} Strom tritt im Vergleich zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verzögert auf. Mögliche Ursache hierfür ist eine langsame Diffusion des Ca^{2+} vom Entstehungsort bis zum Kanal (Lancaster und Nicoll 1987; Lancaster und Zucker 1994; Zhang und McBain 1995). Ebenso wird diskutiert, ob Ca^{2+} -induzierte Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER Ursache der Verzögerung sein könnte (Sah und McLachlan 1991; Zhang und McBain 1995; Lasser-Ross et al. 1997; Moore et al. 1998; Tanabe et al. 1998) oder ob es sich um einen enzymatischer Zwischenschritt handelt (Lasser-Ross et al. 1997; Moore et al. 1998). Weiterhin könnte eine verzögerte Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen, die ausschließlich Ca^{2+} für sI_{AHP} zur Verfügung stellen (Cloues et al. 1997; Bowden et al. 2001), eine Rolle spielen. Desweiteren könnten eine intrinsische langsame Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik der sI_{AHP} Kanäle (Hocherman et al. 1992; Schwindt et al. 1992; Sah und Clements 1999) oder ein langsamer fortgesetzter Ca^{2+} -Einstrom durch L-Typ-VGCCs (Marrion und Lima 2005) Ursache der verspäteten und langsamen sI_{AHP} sein.

1.8. IP₃-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER

Das Kleinhirn oder Cerebellum ist ein für die Kontrolle des motorischen Verhaltens wichtiges Hirngebiet. Die Kleinhirnrinde gliedert sich in drei Schichten: die Molekularschicht, die Purkinjezellschicht und die Körnerzellschicht (Kandel et al. 1995; Abb. 5).

Die äußere Schicht wird durch die Molekularschicht gebildet. Sie besteht vorwiegend aus den Axonen der Körnerzellen, die parallel zur Längsachse verlaufen, woraus sich der Name Parallelfaserschicht ableitet. Zudem enthält sie unregelmäßig angeordnete Stern- und Korbzellen, die als Interneurone fungieren. Weit in die Molekularschicht hinein ziehen sich die baumförmig gefächerten Dendriten der darunter liegenden Purkinjezellen, die jeweils in einer Ebene senkrecht zur Längsachse und zu den Parallelfasern verlaufen. Die großen Zellkörper der Purkinjezellen sind einreihig zwischen Molekular- und Körnerzellschicht angeordnet. Die Körnerzellschicht bildet die innerste Schicht der Kleinhirnrinde. Sie besteht vorwiegend aus kleinen, kugeligen, dichtgepackten Neuronen, den Körnerzellen. Die gesamte Information, die im Kleinhirn verarbeitet wird, läuft letztendlich über die Purkinjezellen als einzige Ausgangsneurone des Kleinhirns (LLinas 1981).

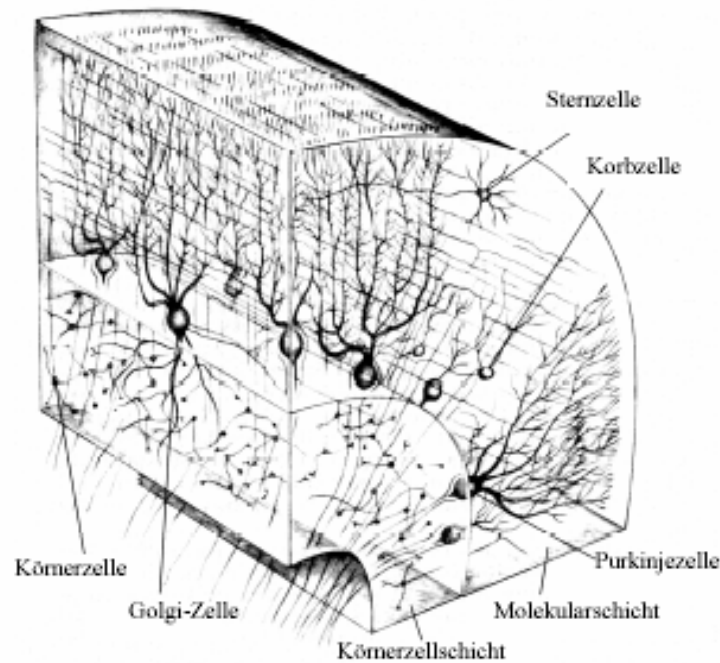


Abb. 5: Zytoarchitektur des Kleinhirns

Das Cerebellum weist eine deutliche Schichtung in Körnerzell-, Purkinjell- und Molekularschicht auf. Letztere wird von den Axonen der Körnerzellschicht gebildet und enthält zudem inhibitorische Interneurone (Stern-, Korbzellen). Modifiziert nach (Thompson 1985).

Die einzigen exzitatorischen afferenten Eingänge der Purkinjellen werden direkt von den Kletterfasern und indirekt von den Moosfasern über die Körnerzellen vermittelt. Die Kletterfasern entspringen den Neuronen des Nucleus olivaris inferior in der Medulla oblongata und projizieren direkt auf die Purkinjellen. Jede Purkinjelle bekommt exzitatorische Eingänge von einer einzigen Kletterfaser, vornehmlich am Zellkörper und dem proximalen Dendriten. Diese Verbindung zwischen Kletterfaser und Purkinjelle gehört zu den stärksten synaptischen Kontakten im gesamten ZNS. Im Gegensatz dazu wird der andere exzitatorische Eingang durch mehrere tausend Parallelfaserkontakte von Körnerzellen mit den distalen Dendriten einer Purkinjelle bestimmt, wobei jede Körnerzelle ihrerseits Synapsen mit mehreren Moosfasern bildet. Die postsynaptische Antwort der Parallelfaserstimulation ist modulatorisch, das heißt, eine Änderung der präsynaptischen Transmitterausschüttung reguliert die Amplitude der postsynaptischen Antwort. Im Gegensatz dazu erfolgt die postsynaptische Antwort an der Kletterfaser-Purkinjellsynapse mit konstanter Amplitude erst nach Überschreitung eines Schwellenwertes. Der exzitatorische Eingang über die Parallelfasern wird durch den Kletterfaser-Purkinjell-Kontakt über heterosynaptische Beeinflussung moduliert, wobei die Kletterfasern die Wirkung der Moosfasern modulieren (Ito 1984). Stern- und Korbzellen, die in der Molekularschicht lokalisiert sind und als

Interneurone fungieren, bilden die einzigen inhibitorischen Afferenzen der Purkinjezellen (Konnerth et al. 1990; Vincent et al. 1992).

Das Cerebellum stellt aufgrund seiner Topologie ein ideales Modell zum Studium der synaptischen Übertragung dar. Insbesondere die Purkinjezelle mit ihren klar definierten Afferenzen und ihrer mikroskopisch leichten Identifizierbarkeit bildet ein geeignetes Objekt für physiologische Messungen. Zudem bietet die klare Schichteneinteilung des Kleinhirns die Möglichkeit, die evozierte synaptische Übertragung an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse durch die Stimulation der glutamatergen Axone (Parallelfasern) zu studieren, ohne dass die Purkinjezelle oder der Körnerzellkörper direkt von diesem Stimulus betroffen werden. Die synaptische Transmission an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse wird durch Glutamat vermittelt.

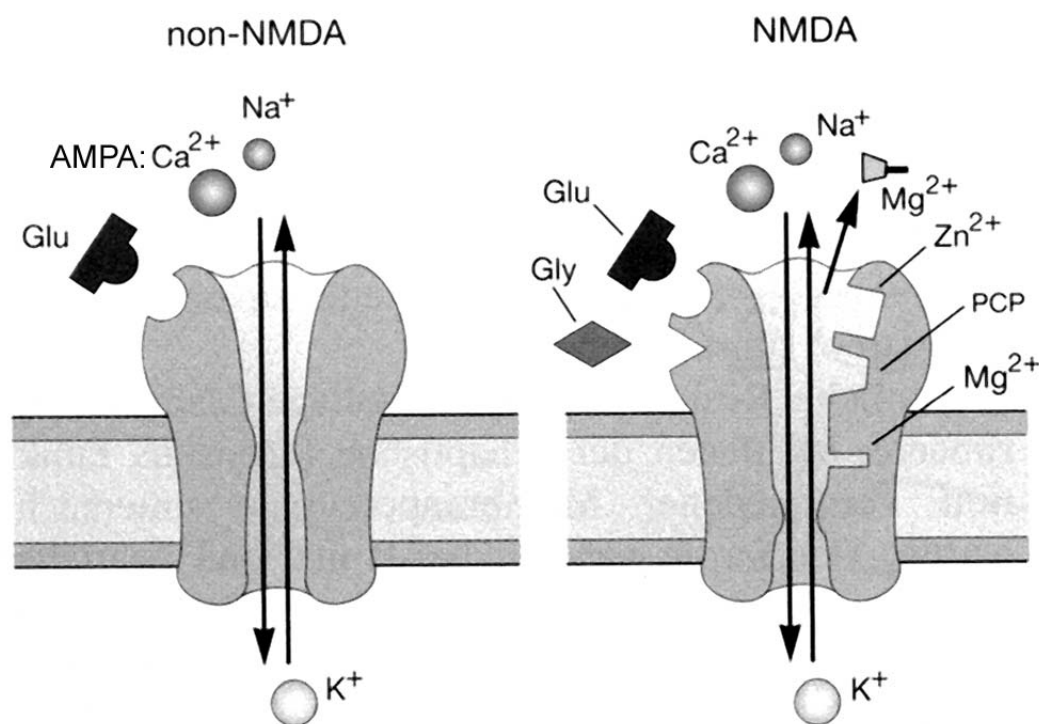


Abb. 6: Schematische Darstellung ionotroper Glutamatrezeptoren

Glu: Glutamat; Gly: Glycin; PCP: Phencyclidine hydrochloride; NMDA: N-Methyl-D-aspartat; AMPA: α -amino-3-hydroxy-methyl-4-isoxazole propionic acid (nach Kandel et al. 1995).

Glutamat, als wichtigster exzitatorischer Transmitter im ZNS, wird bei der Vesikelausschüttung an der Präsynapse in den synaptischen Spalt freigesetzt und bindet an postsynaptische ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren (Nicoll et al. 1990). Diese

werden aufgrund ihrer Agonisten als NMDA (N-Methyl-D-aspartat) und non-NMDA-Rezeptoren bezeichnet (Abb. 6). Letztere gliedern sich in Kainat-, AMPA- (engl.: α -amino-3-hydroxy-methyl-4-isoxazole propionic acid) und Quisqualatrezeptoren. Sie stellen Kationenkanäle dar, die nach Transmitterbindung permeabel für Na^{2+} - und K^{+} -Ionen und im Falle der AMPA- und NMDA-Rezeptoren auch für Ca^{2+} -Ionen permeabel sind (siehe Abb. 6). Die Gesamtheit der messbaren Ioneneinströme erzeugt den exzitatorischen postsynaptischen Strom (EPSC, engl.: excitatory postsynaptic current), der mittels der Patch-Clamp-Technik detektiert werden kann. NMDA-Rezeptoren weisen eine Bindungsstelle für Mg^{2+} auf und sind nach Parallelfaserstimulation nur ionenpermeabel, wenn sich die postsynaptische Purkinjzelle in depolarisiertem Zustand befindet, wodurch der Magnesiumblock entfernt wird (MacDonald und Wojtowicz 1980; Nowak et al. 1984). Benutzt man bei Patch-Clamp-Experimenten Intra- und Extrazellulärlösungen (IZL und EZL), die Mg^{2+} enthalten, so sind NMDA-Rezeptoren bei Vorliegen des Ruhemembranpotenzials geblockt und der exzitatorische postsynaptische Ionenstrom wird rein durch non-NMDA-Kanäle, insbesondere AMPA-Rezeptoren, bestimmt.

Durch die Stimulation der Parallelfasern der Molekularschicht kommt es zur Ausschüttung von Glutamat aus präsynaptischen Vesikeln der glutamatergen Synapse zwischen Körnerzellen und Purkinjzellen. Die Bindung von Glutamat an ionotrope non-NMDA und metabotrope-NMDA-Rezeptoren der Purkinjzelle führt zu einem initialen lokal begrenzten Ca^{2+} -Einstrom durch non-NMDA-Rezeptoren (vorwiegend AMPA), der sowohl elektrophysiologisch als auch mit Ca^{2+} -Imaging messbar ist (Takechi et al. 1998; Finch und Augustine 1998). Die Gesamtheit der aus einem Stimulus resultierenden postsynaptischen Ströme durch die Membran wird als EPSC (engl.: excitatory postsynaptic current) bezeichnet. Bleibt dabei die Stimulation der Parallelfasern unterhalb des Schwellenwerts für die Auslösung eines Aktionspotenzials am Soma der Purkinjzelle, so spricht man von unterschwelligem (engl.: sub-threshold) EPSC.

Ruft man durch vorsichtige Stimulation der Parallelfasern gezielt sub-threshold EPSCs hervor, so kommt es zusätzlich zum elektrophysiologisch und im Ca^{2+} -Imaging messbaren sub-threshold EPSC zu einem zweiten verspäteten Ausstrom von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Dieser Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ geschieht nur lokal in einem begrenzten Bereich des Dendritenbaums der Purkinjzelle und ist nur mit Hilfe des Ca^{2+} -Imagings messbar. Freigesetztes Glutamat bindet nicht nur an ionotrope AMPA-Rezeptoren, sondern auch an metabotrope Glutamat Rezeptoren (mGluR). Über an mGluR gebundene G-Proteine wird Phospholipase-C- β 1 (PLC- β 1) aktiviert, die in der Membran enthaltenes

Phospho-inositol-bis-Phosphat (PIP₂) zu di-Acyl-Glycerol (DAG) und Inositol-tris-Phosphat (IP₃) spaltet. IP₃ wiederum bindet an IP₃-Rezeptoren des ER. Deren Aktivierung führt zur Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER. Diese enzymatische Reaktion erfordert Zeit, weshalb der Ausstrom von Ca²⁺ aus dem ER relativ zum schnellen Einstrom von Ca²⁺ durch AMPA-Rezeptoren verspätet stattfindet und auch eine langsamere Kinetik aufweist (Takechi et al. 1998; Finch und Augustine 1998).

1.9. In vivo 2-Photonen Mikroskopie

Bereits 1931 wurde der Prozess der Multiphotonen Anregung erstmals erwähnt (Goeppert-Mayer 1931). Es dauerte allerdings bis 1990, bis das erste Mikroskop mit 2-Photonen Laser zum Einsatz kam (Denk et al. 1990). Voraussetzung dafür war die Entwicklung der Laser Scan Mikroskopie (LSM), die mit dem Bau des ersten Laser Scan Mikroskops in den 50er-Jahren durch MARVIN MINSKY seinen Anfang nahm. Die Entwicklung von kommerziell vertriebenen 2-Photonen Lasern führte in den 90er-Jahren zu einer weiteren Verbreitung von 2-Photonen Mikroskopen in Industrie und Forschung. Weiterhin wird die 2-Photonen Mikroskopie in der Mikrochirurgie eingesetzt. FRITJOF HELMCHEN entwickelte 2002 eine miniaturisierte Form eines 2-Photonen Mikroskops, das es erlaubt, bei sich frei bewegenden Ratten verschiedene mikroskopisch messbare Hirnaktivitäten zu analysieren (Helmchen et al. 2001). Der Hauptunterschied zwischen konventioneller konfokaler Mikroskopie und 2-Photonen Mikroskopie findet sich schon im Wort „2-Photonen Mikroskopie“. Während man bei konfokaler Mikroskopie mit linearer Anregung arbeitet, benutzt man bei der 2-Photonen Mikroskopie nicht-lineare Anregungsprozesse. Im Jablonski Diagramm lassen sich die grundlegenden Unterschiede von 1-Photon und 2-Photon Absorption leicht erklären (Abb. 7A). Bei der Anregung von Elektronen eines Fluoreszenzfarbstoffs, die sich im Grundniveau befinden, benutzt man Laserlicht mit einer Wellenlänge, die kürzer ist als die Emissionswellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffs. Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs absorbieren die Energie der Photonen und werden in den angeregten Zustand angehoben. Beim Zurückfallen in den Grundzustand können sie Energie abgeben oder Fluoreszenz emittieren. Beim Anregen von Elektronen von Fluoreszenzfarbstoffen mit 2-Photonen Anregung werden zwei räumlich und zeitlich gleich eintreffende Photonen benutzt, um Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs vom Grundzustand in den angeregten Zustand anzuheben. Diese zwei räumlich und zeitlich gleich eintreffenden Photonen können dabei von

langwelligem energetisch ärmerem Licht stammen, als die Emissionswellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffs eigentlich erfordern würde.

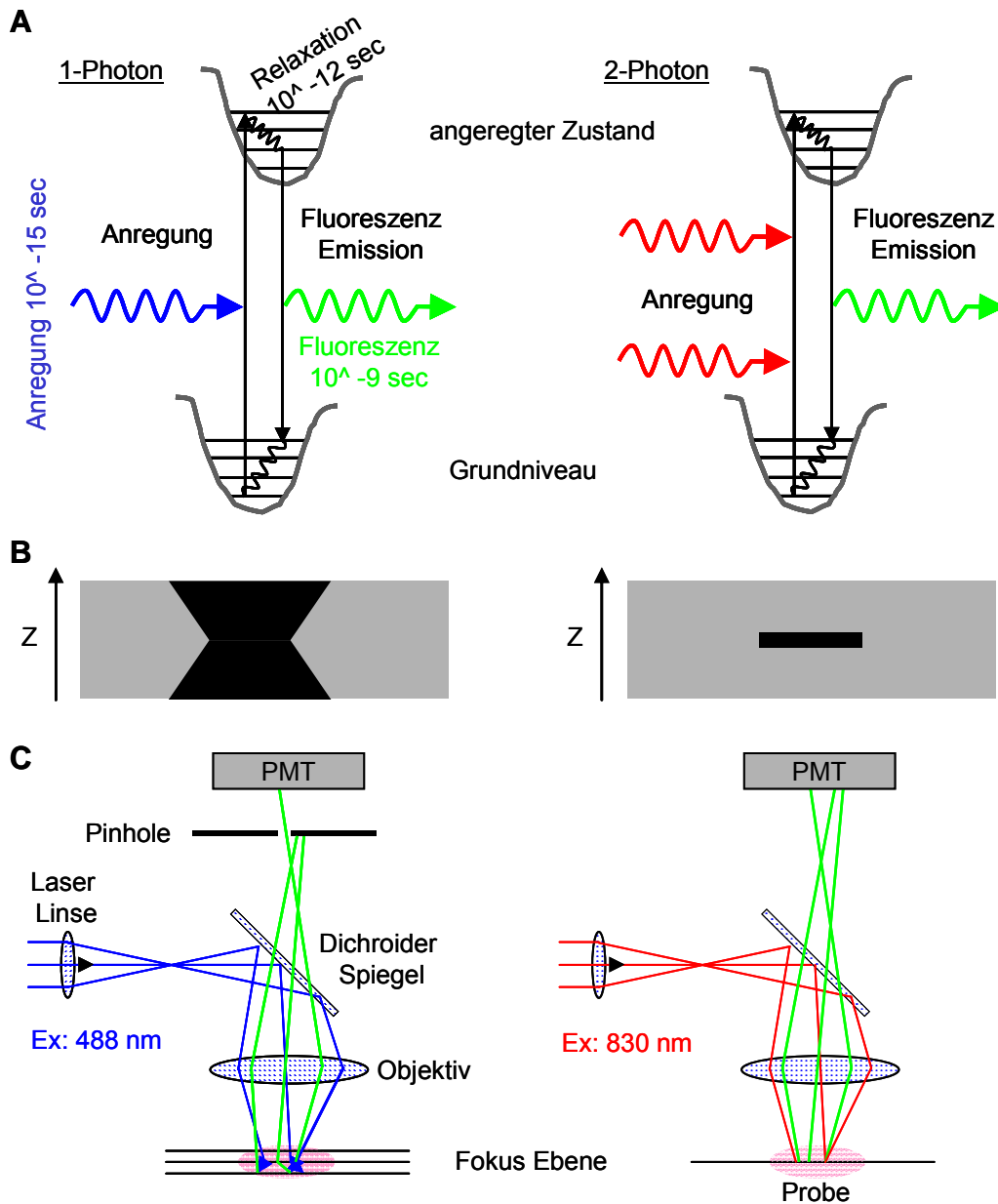


Abb. 7: Vergleich von 1- und 2-Photonen Mikroskopie

(A) Jablonski Diagramme für 1- und 2-Photonen Anregung. Wellen mit Pfeil stellen Anregungslicht und Emissionslicht dar, von blauem kurzwelligem bis rotem langwelligem Licht. (B) Verteilung der Anregung entlang der Z-Achse in der Probe. (C) Schematische Darstellung des Strahlengangs von 1- und 2-Photonen Mikroskopen. Im Emissionsstrahlengang befindet sich bei der 1-Photonenanregung eine Lochblende (engl.: pinhole) vor dem Detektor (PMT: Photomultiplier).

Dies ist nur möglich, da die zwei Photonen des energetisch ärmeren langwelligeren Lichts ihre Energie kombinieren können, weil sie räumlich und zeitlich parallel eintreffen. Das Zeitfenster für das gleichzeitige Eintreffen zweier Photonen am Fluoreszenzmolekül beträgt

in etwa 0,5 Femto-Sekunden (Helmchen und Denk 2005). Um dies zu erreichen, benutzt man gepulste 2-Photonen Laser, die in etwa alle 100 Femto-Sekunden Photonenpulse mit einer Repetitionsrate von 80-100 MHz aussenden. Jeder einzelne dieser Photonenpulse enthält zeitlich hoch geordnete Photonen. Durch fokussieren des Laserlichts mit Hilfe eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur (NA) wird die räumliche Dichte der Photonen dann soweit erhöht, dass sie räumlich und zeitlich so geordnet sind, dass Fluoreszenzmoleküle angeregt werden können. Die Anregung von Fluoreszenzmolekülen ist dabei auf die Fokusebene des Objektivs limitiert (Abb. 7B), da die Laserintensität quadratisch mit dem Abstand von der fokalen Ebene abnimmt und man zwei Photonen für die Anregung benötigt. Dies resultiert in einer Abnahme der Fluorophor-Anregungs-Wahrscheinlichkeit mit der vierten Potenz im Abstand von der Fokusebene. Dies bedeutet, dass fokussiertes 2-Photonen Laserlicht eine punktförmige Anregungscharakteristik aufweist (Abb. 7C, eingesetztes Bild). Dies führt zu zwei entscheidenden Vorteilen gegenüber der konfokalen Mikroskopie. Erstens, die Anregung von Fluorophoren ist bei 2-Photonen Anregung auf den Fokus begrenzt, so dass Ausbleichen des Präparats (engl.: bleaching) in den Ebenen oberhalb und unterhalb des Fokus praktisch nicht auftritt. So wird der Photodamage der umgebenden Probe minimal gehalten (Abb. 7B). Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass 2-Photonen Anregung die Benutzung einer Lochblende (engl.: pinhole) überflüssig macht, so dass sämtliche Photonen, die vom Fluorophor ausgesendet werden, auch für die Detektion benutzt werden können (Abb. 7C). Dadurch wird die Sensitivität erhöht. Bei der konfokalen Mikroskopie werden hingegen emittierte Photonen, die nicht aus der Fokusebene stammen, durch das Pinhole, das vor dem Detektor positioniert ist, ausgeblendet. Der letzte wichtige Vorteil der 2-Photonen Anregung besteht darin, dass das benutzte langwellige infrarote Laserlicht eine große Eindringtiefe in streuende intakte Gewebe besitzt. So ist es möglich, im intakten Hirngewebe fluoreszierende Nervenzellen bis zu 1 mm Tiefe anzuregen und zu detektieren (Theer et al. 2003; Abb. 8). Die Kombination von 2-Photonen Laser Scan Mikroskopie (2PLSM) mit *in vivo* Fluoreszenz-Markierungstechniken hat zu einer wachsenden Anzahl von bildgebenden Studien geführt, die diese Technik an Geweben von lebenden Tieren benutzen. Zu den untersuchten Objekten zählen bereits Lymphatische Organe (Cahalan et al. 2003; Bouso und Robey 2004), die Niere (Molitoris und Sandoval 2005), das Herz (Rubart 2004), die Haut (Laiho et al. 2005) und das Gehirn (Denk und Svoboda 1997; Helmchen und Denk 2002), die nun in zellulärer und subzellulärer Auflösung im intakten lebenden Gewebe untersucht werden können. In Abb. 8 sind Beispielaufnahmen von YFP-exprimierenden Neuronen aus verschiedenen Tiefen des somatosensorischen Kortex einer lebenden Maus dargestellt (Abb. 8A: 100 μ m, B: 300

μm , C: $750 \mu\text{m}$ tief). Abb. 8D zeigt eine 3D-Rekonstruktion von Neuronen einer lebenden Maus, erstellt aus ca. 300 Bildern eines z-Stapels, die konsekutiv mit einem z-Abstand von $3 \mu\text{m}$ aufgenommen wurden. Im Einsatz von Abb. 8A sind so genannte Spines dargestellt. Neurone weisen an Dendriten kleine Fortsätze mit einer Größe von $1\text{-}3 \mu\text{m}$ auf. Diese pilzartigen, an einen Türknauf erinnernden Fortsätze stellen den postsynaptischen Teil einer Synapse dar und werden Spine genannt. Spines spielen vermutlich eine besondere Rolle bei der Kommunikation zwischen Neuronen und bei der Aufrechterhaltung neuronaler Verbindungen (Calabrese et al. 2006)

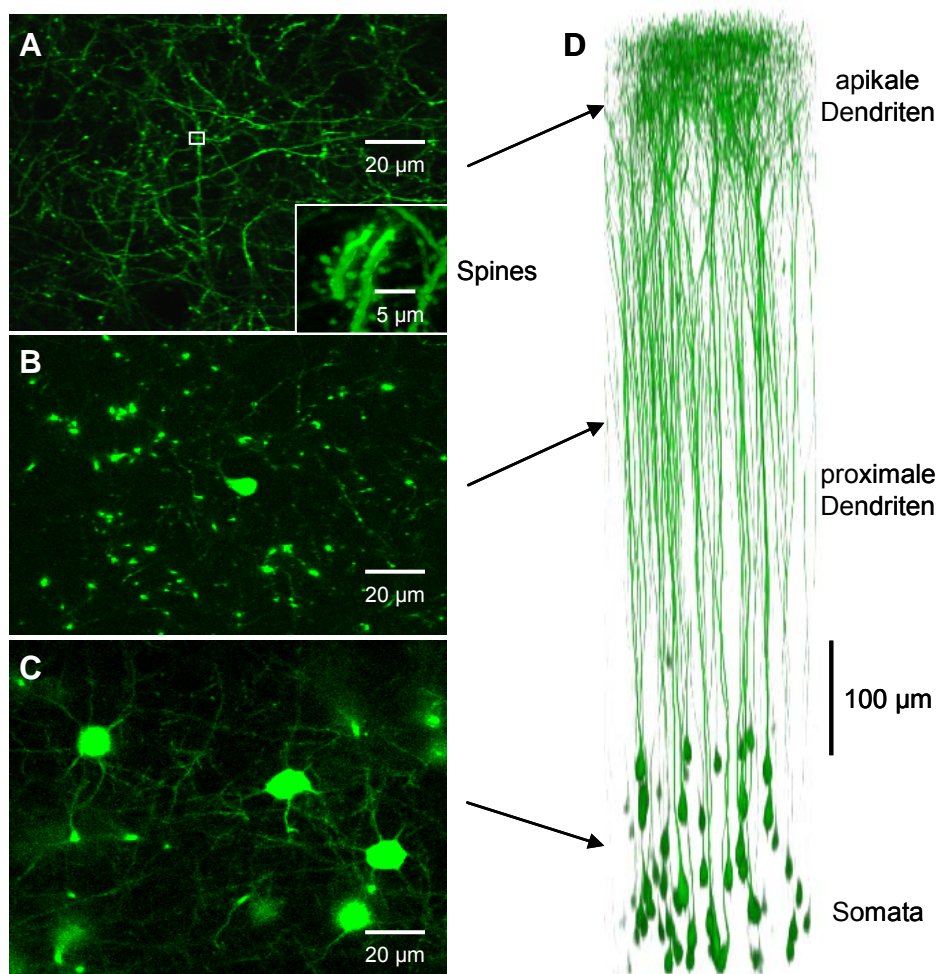


Abb. 8: 2-Photonen *in vivo* Mikroskopie $700 \mu\text{m}$ tief im Gehirn der Maus

(A) Beispielbild der apikalen Dendriten von YFP-exprimierenden Layer-5-Neuronen im Kortex der lebenden Maus (Tiefe $100 \mu\text{m}$). (B) Beispielbild der proximalen Dendriten (Tiefe $350 \mu\text{m}$). (C) Aufnahme von den Zellkörpern der Layer-5-Neurone in $700 \mu\text{m}$ Tiefe. (D) 3D-Rekonstruktion aus ca. 300 Bildern eines z-Stapels, die mit einem z-Abstand von $3 \mu\text{m}$ aufgenommen wurden.

1.10. Zielsetzung

1.10.1. Physiologische Funktion von PrP^C

Um die physiologische Funktion des Prion-Proteins besser zu verstehen, sollten Hippocampus-CA1-Neurone von *Prnp*^{-/-}-Mäusen untersucht werden. Diese Neurone weisen den konsistenten Phänotyp der verminderten späten Nachhyperpolarisation (sI_{AHP}) auf. Zuerst sollte dieser elektrophysiologische Phänotyp mit Hilfe der Voltage-Clamp-Methode reproduziert werden. Aus der Zelle ausströmendes K^+ , das durch K^+ -Kanäle fließt ist die Ursache für sI_{AHP} . Voraussetzung dafür ist durch VGCCs einströmendes Ca^{2+} , das die Öffnung der K^+ -Kanäle induziert. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob der Verlust von PrP^C einen direkten Einfluss auf die dem sI_{AHP} zugrunde liegenden K^+ -Kanäle hat oder ob bereits der zeitlich vorangehende Ca^{2+} -Influx gestört ist. Ausgehend von den bei den Experimenten gewonnenen Erkenntnissen sollte das weitere Vorgehen bestimmt werden.

1.10.2. Kinetik der Neurodegeneration bei Scrapie

Die Infektion von Mäusen mit dem Scrapie Erreger PrP^{Sc} stellt ein sehr gutes Modellsystem für andere TSEs wie BSE, Creutzfeld-Jakob-Krankheit und Scrapie beim Schaf dar. Im Verlauf dieser Prionerkrankungen kommt es zu massiver Neurodegeneration, die bis jetzt unheilbar ist. Mit Hilfe von 2-Photonen *in vivo* Mikroskopie, die es erstmals erlaubt wiederholt dieselben fluoreszierenden Neurone, Dendriten und Spines einer lebenden Maus über lange Zeiträume zu beobachten, sollte die genaue räumliche und zeitliche Kinetik der Neurodegeneration untersucht werden. Dazu sollte zuerst mit akut Experimenten über Zeiträume von drei Stunden untersucht werden, ob die Spine-Degeneration während der präsymptomatischen oder der symptomatischen Phase im Bereich von Stunden abläuft. Weiterhin sollte die strukturelle Spine-Plastizität über den gesamten Zeitraum der präsymptomatischen bis hin zur symptomatischen Krankheitsphase untersucht werden. Neben der strukturellen Spine-Plastizität sollten außerdem die Dendriten-Struktur und Varikositäten-Plastizität untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Intravitalmikroskopie

2.1.1. Operation zur akuten Intravitalmikroskopie

Akute Intravitalmikroskopie bezeichnet Experimente, die über einen Zeitraum von bis zu 8 Stunden ununterbrochen an der narkotisierten Maus durchgeführt werden. Um eine bis zu 8 Stunden dauernde Narkose zu gewährleisten, werden als Anästhetika Urethan (2 mg/kg Körpergewicht; intraperitoneal) oder Isofluran verwendet. Für kürzere Narkosen (bis zu 2 Stunden) kann auch Ketamin/Xylazin (0,13 Ketamin und 0,01 Xylazin mg/kg Körpergewicht; intraperitoneal) verwendet werden. Nach Einleitung der jeweiligen Narkose wird die Maus in einen Stereotakt eingespannt (Abb. 9K) und während der gesamten Dauer der Narkose mit Hilfe eines Wärmekissens gewärmt. Nun wird mit 70% Alkohol die Haut desinfiziert und anschließend mit Adson-Pinzette und Schere über dem Schädel entfernt. Mit einem Skalpell wird die Knochenhaut gründlich abgeschabt, und anschließend wird der Schädelknochen mit einer Schicht „Cyano-Veneer fast“, die mit einem kleinen Pinsel aufgetragen wird, abgedeckt (Abb. 9L). Dabei lässt man über dem rechten Schädelknochen den Bereich frei, in dem das Fenster implantiert werden soll, damit durch eventuelle Diffusion von Kleberbestandteilen die oberen Nervenzellschichten nicht beschädigt werden. Jetzt wird die Maus aus dem Stereotakt genommen und die für akute Experimente vorgesehene Metallplatte (Akut-Platte; Abb. 9A) mit der Öffnung an der rechten Schädeldecke mit „Cyano-Veneer fast“ festgeklebt (Abb. 9D,E). Eventuelle Undichtigkeiten zwischen Schädeldecke und Metallplatte werden mit „Cyano-Veneer fast“ oder mit „Cyano-Veneer fast“ plus Pulver abgedichtet. Anschließend wird die Maus mit der festgeklebten Metallplatte für akute Experimente auf die Adapter-Platte überführt (Abb. 9F). Mit dem Zahnarzt Bohrer (XL-30W, Osada Inc., USA) und dem Bohrer (Bohrer H71 104004; Gebr. Brasseler GmbH; Lemgo) wird nun ein rundes Loch mit einem Durchmesser von 4 mm in die Schädeldecke gefräst (Abb. 9G). Dabei wird intermittierend mit PBS (engl.: phosphate buffered saline) gespült, um zu kühlen und Bohrspäne zu beseitigen. Eventuell auftretende Blutungen aus Gefäßen der Schädeldecke werden sofort mit Gelfoam (Blutstillender Schwamm) gestoppt. Beim Bohren arbeitet man sich vorsichtig tiefer vorwärts, ohne den Knochen komplett zu durchbohren. Drückt man mit einer Pinzette oder dem stillstehenden Bohrer auf das zu entnehmende runde Schädelstück, so ist dieses zu Beginn der Bohrungen unbeweglich. Der

Knochen wird mit äußerster Vorsicht weiter ausgedünnt, bis das runde Schädelstück rundherum beweglich ist und leicht gegen das darunter liegende Hirn zu drücken ist.

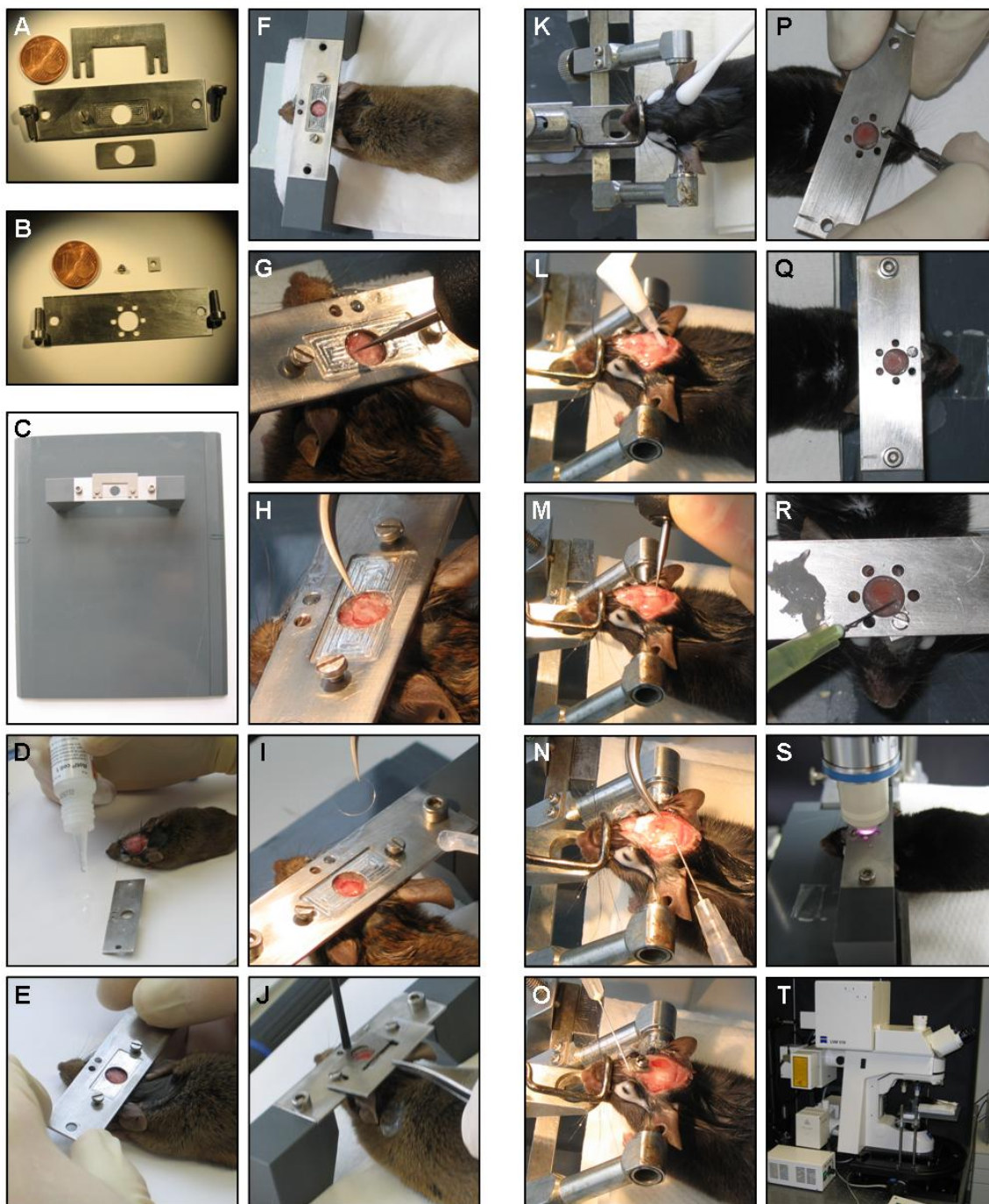


Abb. 9: Operation zum Einbau von akuten und chronischen kranialen Fenstern

(A) Akut-Platte. (B) Chronisch-Platte mit Ankerplättchen. (C) Adapter-Platte. (D-J) Akutes kraniales Fenster. (D,E) Aufkleben der Akut-Platte mit Sekundenkleber. (F) Maus mit angeklebter Akut-Platte auf der Adapter-Platte. (G) Bohren des kranialen Fensters. (H) Entfernen des Schädelknochens. (I) Auffüllen mit Agarose und einsetzen des Deckglases. (J) Fixierung des Deckglases. (K-R) Chronisches kraniales Fenster. (K) Maus im Stereotaxen: Desinfektion des Kopfes mit 70% Ethanol. (L) Verschließen mit Cyano Veneer Fast. (M) Bohren des kranialen Fensters. (N) Aufkleben des Deckglases. (O) Aufkleben des Ankerplättchens. (P) Fixierung der Chronisch-Platte am Ankerplättchen. (Q) Maus mit angeschraubter Chronisch-Platte auf der Adapter-Platte. (R) Abdichten mit Vaseline. (S) Maus unter dem Mikroskop-Objektiv. (T) Mikroskop mit Intravitalmikroskopie-Tisch.

Der Schädelknochen sollte dabei nicht komplett durchbohrt sein. Dies ist nicht immer zu gewährleisten, sollte aber der Idealfall sein. Mit einer gebogenen Pinzette greift man nun in den Grat des zu entfernenden runden Schädelknochens und bricht das runde Stück vorsichtig heraus (Abb. 9H). Dabei sollten Blutungen in der Dura so weit wie möglich vermieden werden. Direkt nachdem der runde Schädelknochenteil entfernt wurde, wird mit PBS gespült. Die Öffnung der Metallplatte wird mit Low-melt-Agarose gefüllt und ein Deckglas mit 8 mm Durchmesser aufgelegt (Abb. 9I). Anschließend wird das Deckglas mit der Deckglasfixierung arretiert (Abb. 9J). Die Adapter-Platte, auf der die Maus liegt (Abb. 9C), wird nun auf dem Mikroskopisch befestigt (Abb. 9T). Ein Tropfen steriles PBS dient als Immersionsflüssigkeit für die verwendeten Objektive. Anschließend kann mit der Mikroskopie begonnen werden.

2.1.2. Operation zur chronischen Intravitalmikroskopie

Chronische Intravitalmikroskopie bezeichnet Experimente, die über einen Zeitraum von Tagen bis zu Wochen und Monaten durchgeführt werden. Dazu wird die narkotisierte Maus zu verschiedenen Zeitpunkten für ein bis zwei Stunden untersucht. Ziel ist es dabei denselben Nervenzellfortsatz oder andere interessierende Strukturen wieder aufzufinden und über lange Zeiträume bis zu Monaten zu untersuchen. Dafür ist eine abgewandelte Vorgehensweise zur akuten Intravitalmikroskopie nötig. Der Maus wird dazu in einer ersten Operation ein Fenster eingebaut, neben das ein kleines Metallplättchen (Ankerplättchen, Abb. 9B) mit einem Gewinde für eine Schraube geklebt wird (Abb. 9O). An dieses Ankerplättchen kann mit Hilfe einer Schraube eine der „Akut-Platte“ ähnelnde „Chronisch-Platte“ wiederholt angeschraubt werden (Abb. 9B).

Das Bohren der Öffnung in die Schädeldecke erfolgt wie in Kapitel 2.1.1 (S.39) beschrieben. Als Anästhetikum verwendet man Ketamin/Xylazin (0,13 Ketamin und 0,01 Xylazin mg/kg Körpergewicht; intraperitoneal). Außerdem wird Dexamethason gespritzt (4 mg/kg Körpergewicht; vor der Operation), um Folgen des Traumas zu minimieren. Zur Schmerzlinderung wurde 3-5 Tage post Operation Carprophen (5 mg/kg s.c.) appliziert (Rimadyl, Pfizer, New York, USA). Nachdem das runde Schädeldeckenstück mit 4 mm Durchmesser, wie vorher beschrieben, vorsichtig abgenommen wurde, wird mit PBS gespült. Zügig wird ein Tropfen Low-melt-Agarose aufgetragen und ein rundes Deckglas mit 5 mm Durchmesser aufgelegt (Abb. 9N). Unter dem Deckglas Richtung Hirn sollte sich nur ein dünner Film Agarose befinden. Überschüssige Agarose wird mit Hilfe eines Skalpell und Tupfers entfernt. Anschließend rührt man „Cyano-Veneer-fast“ mit Pulver an und verklebt die trocken getupften Ränder der Schädeldecke mit dem Deckglas, das eng an der Schädeldecke

anliegen sollte. Dabei sollte so wenig Druck wie möglich auf das Hirn ausgeübt werden. Nachdem der Kleber ausgehärtet ist, wird ein Ankerplättchen mit Schraube neben das Deckglas geklebt, so dass das Ankerplättchen in derselben Ebene und Höhe wie das Deckglas liegt (Abb. 9O). Die Operation für das chronische Fenster ist hiermit abgeschlossen.

Zur wiederholten Intravitalmikroskopie schraubt man die „Chronisch-Platte“ an das Ankerplättchen und die Schlitz zwischen der Öffnung in der „Chronisch-Platte“ und dem Deckglas werden mit Vaseline abgedichtet (Abb. 9P-R). Ein Tropfen steriles PBS dient als Immersionsflüssigkeit für die verwendeten Objektive (Abb. 9S). Die Maus mit am Ankerplättchen fixierter Chronisch-Platte wird auf die Adapter-Platte gesetzt und unter das Mikroskop auf den Mikroskoptisch gebracht (Abb. 9T). Anschließend kann mit der Mikroskopie begonnen werden (Siehe auch Zeiss Broschüre: Neurons at Work Multiphoton Microscopy; <http://www.zeiss.de/lsm>).

2.1.3. 2-Photonen Intravitalmikroskopie

Das Setup besteht aus dem 2-Photonen Laser „MaiTai XF-W1S“ der Firma Spectra Physics (heute Newport, Darmstadt), der über eine Spiegelstrecke in das Mikroskop „Axioskop 2FS mot“ der Firma Zeiss eingekoppelt wird (Abb. 10A). Das Mikroskop ist mit dem Scan-Kopf „LSM510 Meta“ ausgerüstet. Außerdem befinden sich zwei Auflicht und zwei Durchlicht „Non-Descanned-Detectors“ (NDDs) am Mikroskop-Stativ (Abb. 10A). Bei der 2-Photonen Intravitalmikroskopie wird ausschließlich mit den Auflicht NDDs gearbeitet, weil deren Sensitivität wesentlich höher ist als die der konventionellen Detektoren (Zeiss Produktbroschüre: LSM 510 NLO und LSM 510 META NLO Multiphotonen Laser Scanning Mikroskope; <http://www.zeiss.de/mikro>). Das Mikroskopstativ wurde auf einen x,y-Verschiebetisch (380 FM Verschiebetisch; Luigs und Neumann) gesetzt, der das Ansteuern von Positionen im Mikrometerbereich ermöglicht (Abb. 10A).

Die gesamte Hardware wird über die LSM510 Release 3.2 Software der Firma Zeiss gesteuert. Im Exzitations-Strahlengang wird der Hauptstrahlteiler HFT/KP650 benutzt, der den 2-Photonen Laser mit infraroter Wellenlänge von 710-920 nm auf die Probe spiegelt und kurzwelligeres Licht als 650 nm, das von der Probe emittiert wird, zu den NDDs durchlässt. Im Emissions-Strahlengang können verschiedene Filtersets ausgewählt werden, die für die jeweiligen zu detektierenden Farbstoffe geeignet sind.

Für die Detektion von YFP-exprimierenden Neuronen im Gehirn der Maus wurden entweder der Bandpass-Filter BP500-550 (lässt Licht der Wellenlänge 500-550 nm passieren) oder der Longpass-Filter LP510 (lässt Licht der Wellenlänge größer als 510 nm passieren) benutzt. Die

Wellenlänge des 2-Photonen Lasers wurde auf 880 nm eingestellt, um YFP anzuregen. Als Objektiv wurde das Achroplan IR 40x/0,80 Wasserimmersionsobjektiv von Zeiss mit einer numerischen Apertur von 0,8 benutzt (Abb. 10B).

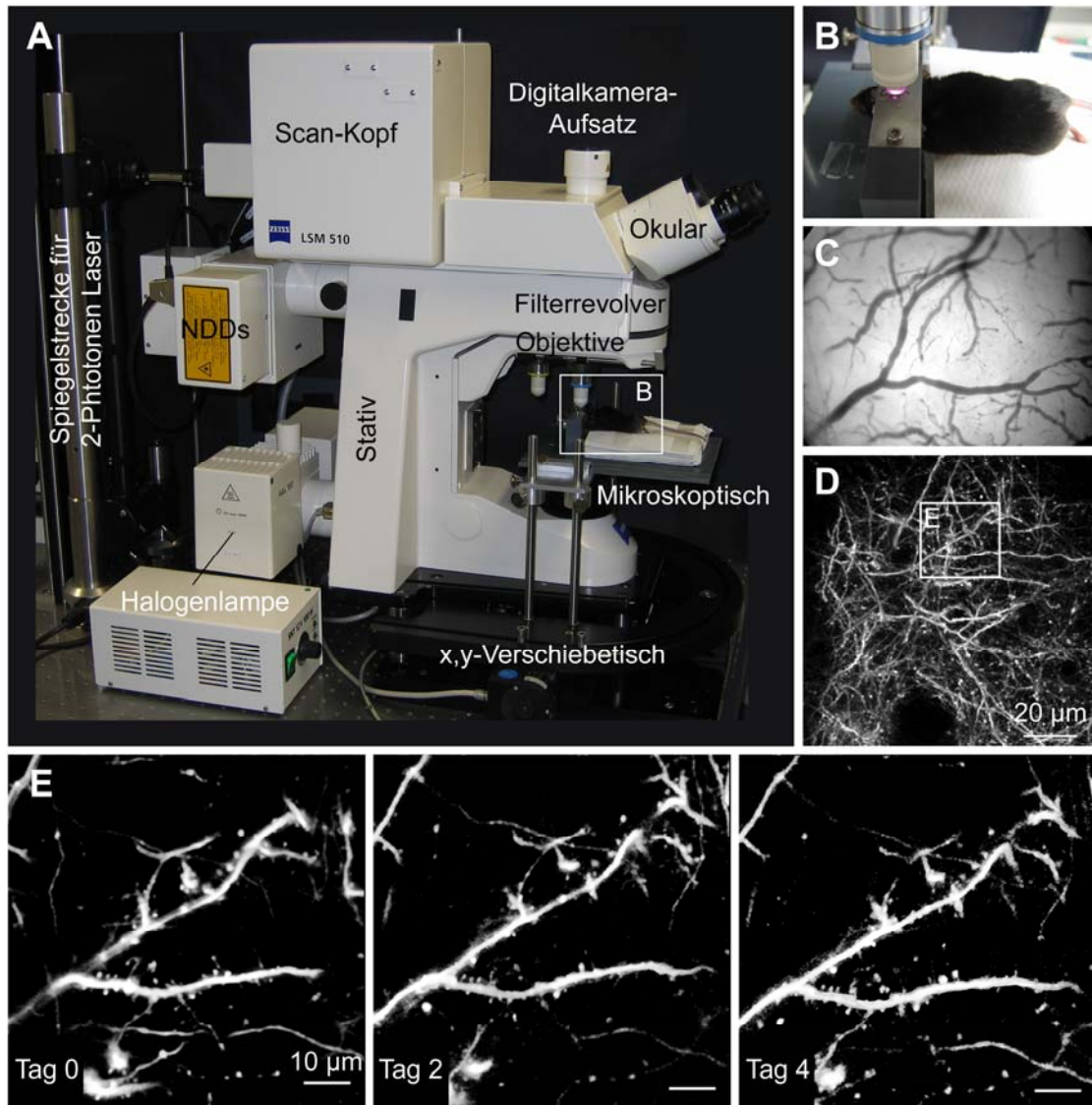


Abb. 10: Langzeit 2-Photonen Intravitalmikroskopie

(A) Setup für 2-Photonen Intravitalmikroskopie (Zeiss LSM510 Mikroskop). Die Maus wird auf den Mikroskoptisch gesetzt (B). Mit einer Digitalkamera, die am Digitalkamera-Aufsatz angebracht wird, werden Aufnahmen der kortikalen Gefäße gemacht (C). Mit 2-Photonen Anregung und den NDDs (Non-Descanned-Detectors, siehe (A)) wird ein Übersichtsbild (D) einer Dendritenstruktur aufgenommen. (E) Hochauflösende Zeitserie eines Dendriten (Vergrößerung aus (D)) von Tag 0 bis Tag 4.

Für die 2-Photonen Intravitalmikroskopie wird die Maus wie oben beschrieben vorbereitet (Abb. 10B). Als erstes wird mit einer am Kamera-Adapter des Mikroskopstativs angebrachten Digitalkamera (Canon Power Shot A95) ein Bild von den oberflächlichen Gefäßen der Dura aufgenommen (Abb. 10C). Eine markante, große Gefäßkreuzung wird als Nullpunkt definiert und je eine Aufnahme mit dem 10x und dem 40x Objektiv gemacht. Diese Position wird

ebenso in der Steuerung des x,y-Verschiebetisches als Nullposition definiert. Alle weiteren angefahrenen Positionen werden in Relation zur Nullposition gesetzt und können so über lange Zeiträume wiederholt exakt angesteuert werden. Zur Sicherheit wird außerdem von jeder angefahrenen weiteren Position eine Digitalkameraaufnahme der Gefäße mit dem 10x und dem 40x Objektiv gemacht.

An den ausgewählten Positionen wurden zuerst Übersichtsaufnahmen mit dem 40x Objektiv im 1x Zoom aufgenommen (230 x 230 μm ; 512 x 512 Pixel; 0,45 μm /Pixel; Abb. 10D). Mit Hilfe dieser Übersichtsaufnahmen wurde die Feinpositionierung zum wieder Auffinden Mikrometer großer Strukturen vorgenommen. Anschließend wurden z-Stapel mit geringer oder hoher Auflösung mit einer z-Ausdehnung von 100 bis zu 700 μm aufgenommen. z-Stapel mit geringer Auflösung wurden mit den obigen Einstellungen und einem z-Abstand von 3 μm gescannt. Hochauflösende z-Stapel von dendritischen Spine-Strukturen wurden mit dem 40x Objektiv (3x Zoom; 76 x 76 μm ; 512 x 512 Pixel; 0,15 μm /Pixel) und einem z-Abstand von 1 μm aufgenommen (Abb. 10E). Dabei wurde mit Hilfe der „Auto-z-Korrektur Funktion“ der LSM510 Software dafür gesorgt, dass die Fluoreszenz-Intensität über den gesamten z-Stapel gleich bleibt. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Fluoreszenz-Intensität verschiedener aufgenommener Positionen und Zeitpunkte gleich bleibt.

2.1.4. Analyse und Auswertung

Um Spine-Umsatz und Stabilität an apikalen Dendriten von YFP positiven L5B Neuronen im Kortex der lebenden Maus bestimmen zu können, wurden die z-Stapel von verschiedenen Zeitpunkten als roter und als grüner Kanal in einen neuen z-Stapel kopiert. Mit rot wurde der erste Zeitpunkt markiert, mit grün der zweite Zeitpunkt. Bei mehreren aufeinander folgenden Zeitpunkten wurde analog für die Differenz von je zwei aufeinander folgenden Zeitpunkten verfahren. Anhand von dendritischen Verzweigungen wurden die z-Stapel der zwei Zeitpunkte zueinander ausgerichtet, damit sie deckungsgleich waren. Diese Ausrichtung wurde sowohl in x,y-Richtung als auch in z-Richtung durchgeführt. Hinzukommende Spines waren nach erfolgreicher Ausrichtung leicht im grünen Kanal zu erkennen, ebenso wurden verlorene Spines leicht im roten Kanal detektiert. Gelbe Spines wurden als vom einen zum nächsten Zeitpunkt stabil gebliebene Spines gewertet. Gewonnene und verlorene Spines wurden dann auf die Länge des Dendriten bezogen, an dem sie sich befanden. Pro Maus wurden Gewinn und Verlust von Spines an 5 bis 20 verschiedenen Dendriten in 3-7 verschiedenen Regionen über bis zu 20 Zeitpunkte verfolgt. Dabei wurden insgesamt mehrere Zehntausend Spines gezählt und ausgewertet.

Weiterhin wurde die tägliche Spine-Umsatzrate (dTOR) berechnet: $dTOR = (N_{\text{gewonnen}} + N_{\text{verloren}})/(2 \times N_{\text{total}})/I_t$. Dabei entspricht N_{gewonnen} der Anzahl an Spines, die von einem zum nächsten Zeitpunkt neu entstanden sind, N_{verloren} der Anzahl verlorener Spines und N_{total} der Gesamtanzahl Spines zum untersuchten Zeitpunkt. I_t ist die Anzahl Tage, die zwischen zwei Untersuchungszeitpunkten liegt. Außerdem wurden Gewinn- (F_{gewonnen}) und Verlustanteile (F_{verloren}) bestimmt: $F_{\text{gewonnen}} = N_{\text{gewonnen}}/N_{\text{total}}/I_t$; $F_{\text{verloren}} = N_{\text{verloren}}/N_{\text{total}}/I_t$. Die dargestellten Berechnungen wurden analog auch für Varikositäten durchgeführt.

2.1.5. Material

Urethan	Sigma; U2500
Ketamin 10%	WDT; 98047
Xylazin	WDT; Sedaxylan 20081
Dexamethason	Sigma; D1159-599MG
Sulforhodamin 101	Sigma; S7653
FITC-Dextran	Sigma; FD-70S
Pinzetten: Gebogene und Adson	FST; 11274-20, 11018-12
Schere	FST; 14028-10
Sterile Wattestäbchen	Schubert und Weiß; 8147501
Sterile Schwämme	FST; 18105-01
Gel-Foam	Pfizer (Auslandsapotheker)
Bead Sterilizer FST 250	FST; 18000-45
Wärme-Pad	Eigenbau; WPI
Cyano-Veneer Starter Kit	Heinrich Schein Dental; 152251
Isofluran-Narkose-Gerät	Eigenbau
Akut-, Chronisch-Platte (Maße, Material)	Eigenbau
Ankerplättchen	Eigenbau
Adapter-Platte (Maße, Material)	Eigenbau
Schrauben (Maße, Material)	Eigenbau
Mikroskoptisch	Eigenbau
Bohrer	Gebr. Brasseler GmbH; H71 104004
Handstück	Pluradent; Schick- Technikmaster C1
Deckglas	VWR; CB00050RA1
Agarose	Sigma; A9793

Spritzen	VWR; 6120106
Kanülen	VWR; 612-0138
Vaseline	ABO Pharma
x,y-Verschiebetisch	Luigs und Neumann; 380 FM
Mikroskop	
Axioskop 2 FS mot; LSM510	Zeiss
Objektive	
Achroplan IR 40x/0,80 W	Zeiss; 440095
Achroplan 10x/0,3 W Ph1	Zeiss
NDD Filtersets	
1. FT560/BP500-550/BP575/640	Zeiss; 446437/1031-349/447748
2. FT510/BP435-485/LP515	Zeiss; 446434/1031-337/447743
3. BP642-685	Zeiss; 1031-355
Filtersets Reflektor Modul	
NDD KP685	Zeiss; 1327-835
Nr 01	Zeiss; 488001
Nr 09	Zeiss; 488009
Nr 15	Zeiss; 488015
Software LSM510 Rel3.2	Zeiss
Laser	MaiTai; Spectra Physics; 10W Pump- Leistung; Wellenlänge 710-920 nm
Digitalkamera	Canon Powershot A95
Digitalkamera-Adapter für Zeiss Stativ	Zeiss 426126; 426106-9120; 456006
Lösungen	
PBS 10x (g/l)	80 NaCl, 2 KCl, 14,4 Na ₂ HPO ₄ , 2,4 KH ₂ PO ₄
Steriles Wasser	Aqua bidest autoklaviert
70% EtOH	300 ml Millipore; 700 ml EtOH Sigma
Puffer für Agarose (mM)	135 NaCl, 5,4 KCl, 1 MgCl ₂ , 1,8 CaCl ₂ , 5 HEPES
Ketamin/Xylazin	6 ml NaCl zur Injektion, 1 ml Ketamin 10%, 0,25 ml Sedaxyl

2.2. Elektrophysiologie

Die von NEHER UND SACKMANN (Neher und Sakmann 1976) entwickelte Patch-Clamp-Technik (Deutsch: Membranfleck-Klemm-Technik) ermöglicht es, auf der einen Seite sowohl transmembrane Ströme der gesamten Zellmembran von Neuronen als auch den Strom durch einzelne Ionenkanäle zu messen und ebenfalls das Membranpotenzial der Zelle zu modulieren. Vereinfacht gesagt, wird über einem Membranfleck (engl.: patch) des Somas der Zelle die Öffnung einer sehr feinen Glaskapillare positioniert und mit Hilfe eines leichten Unterdrucks eine enge leitende Verbindung mit der Zelle hergestellt. Dabei kann die Zellmembran entweder intakt (engl.: cell-attached) oder durchrissen (engl.: whole-cell) werden. Im Cell-Attached-Modus können Ströme, die durch einzelne Kanäle fließen, gemessen werden, während im Whole-Cell-Modus der gesamte über die Membran der Zelle fließende Strom gemessen wird. Im Whole-Cell-Modus gibt es zwei häufig verwendete Konfigurationen. Die Current-Clamp- und Voltage-Clamp-Konfiguration (deutsch: Strom-geklemmt, Spannung-geklemmt). Bei der Current-Clamp-Konfiguration wird der über die Membran fließende Strom auf einem konstanten Ampere-Wert gehalten (geklemmt). Dies geschieht, indem über die an einen Verstärker angeschlossene Glaskapillare mit Elektrode die jeweils nötige Spannung angelegt wird, um den voreingestellten Strom konstant zu halten. Der zeitliche Verlauf der angelegten Spannung wird dann mit Hilfe eines Computers aufgezeichnet. Analog wird bei der Voltage-Clamp-Konfiguration die Spannung, die zwischen Innerem und Äußerem der Zellmembran aufgrund der unterschiedlichen Ionenverteilung herrscht, auf einen bestimmten Spannungswert eingestellt (geklemmt) und konstant gehalten. Oft entspricht diese Spannung dem Ruhepotenzial der Zelle von -70 bis -90 mV. Der zeitliche Verlauf des Stroms, der nun zwischen der Elektrode in der feinen Glaskapillare und dem Zellinnern fließen muss, um die vorgegebene Klemmspannung aufrechtzuerhalten, und der vom angeschlossenen Verstärker aufgebracht wird, wird mit Hilfe eines Computers aufgezeichnet.

Um die häufig benutzte Voltage-Clamp-Konfiguration im Whole-Cell-Modus zu erreichen, wird eine spitzgezogene Glaskapillare (Spitzendurchmesser: $1 - 2 \mu\text{m}$) unter visueller Kontrolle in sehr engen Kontakt mit der Zellmembran gebracht (Cell-Attached-Modus). Die Glaspipette ist gefüllt mit einer artifiziellen Intrazellularflüssigkeit (IZL) und bildet zusammen mit einer chlorierten Silberelektrode die Patchelektrode. Die stabile Membran-Glas-Verbindung mit Widerständen im Gigaohm-Bereich (engl.: gigaohm-seal) bewirkt durch die elektrische Abschirmung des Membranflecks (engl.: patch) von seiner Umgebung ein sehr

gutes Signal-Rausch-Verhältnis. Die Stabilität der Verbindung zwischen Elektrode und der Membran erlaubt es, mechanische Manipulationen der Membran durchzuführen, ohne den hochohmigen Abdichtwiderstand zu zerstören. So wird im Whole-Cell-Modus das Membranstück unterhalb der Pipettenöffnung durch ruckartiges Ansaugen herausgerissen, und man erhält einen niederohmigen Zugang zum Zellsoma (Abb. 11). Während dieser Konfiguration tauscht sich das Zytoplasma durch Diffusion schnell mit der Pipettenlösung aus, und es ergibt sich ein definiertes Ionenverhältnis im Innern der Zelle, das durch die Wahl der Intrazellularlösung bestimmt wird. Man kann Ergebnisse von Messungen im Whole-Cell-Modus als Mittelung vieler simultan aktiver Ionenkanäle auffassen. Messbar ist demnach das makroskopische Strommuster einer Zelle, ohne dass man den Beitrag einzelner Ionenkanäle aufschlüsseln kann. Bleibt der seitliche Leckwiderstand erhalten und gering, so ist der Ionenstrom durch die gesamte verbleibende Zellmembran messbar. Vom Operationsverstärker (im Vorverstärker integriert) werden Spannungsänderungen über der Membran registriert und durch einen Kompensationsstrom über die Patch-Pipette ausgeglichen. Dieser Kompensationsstrom stellt das Äquivalent des transmembranen Ionenstromes dar.

Die Patch-Clamp-Technik wurde sowohl für Experimente benutzt, bei denen die Messung von Ionenströmen im Vordergrund standen, als auch bei Messungen, bei denen mit Hilfe dieser Technik fluoreszierende Ca^{2+} -Indikatoren in die Zelle gebracht wurden, mit denen dann die Änderung der Ca^{2+} -Ionen Konzentration in der Zelle direkt gemessen werden konnte. Dieses Verfahren wird als Ca^{2+} -Imaging bezeichnet und separat beschrieben (Kapitel 2.3, Seite 53). Gleichzeitig wurden bei einigen Experimenten mit Ca^{2+} -Indikatoren die elektrophysiologischen Änderungen mit aufgezeichnet.

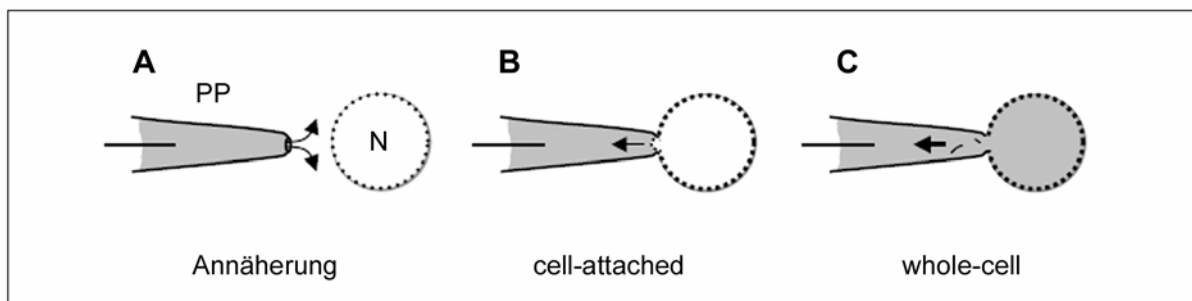


Abb. 11: Generierung der Whole-Cell-Konfiguration

Das Annähern der Pipette an die Zelle (**A**) muss unter angelegtem Überdruck geschehen, um ein Verschmutzen der Öffnung zu vermeiden. Nachdem der Gigaseal unter leichtem Unterdruck etabliert wurde (**B**), wird die Zellmembran unter Beibehaltung des Gigaseals durch kurzes kräftiges Saugen durchbrochen und das Zytoplasma tauscht sich mit der IZL aus (**C**). PP: Patch-Pipette, N: Neuron.

2.2.1. Patch-Clamp-Elektroden

Die Elektroden wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren (Innendurchmesser 0,9 mm, Außendurchmesser 1,5 – 1,8 mm, KIMAX-51, Kimble Products) mittels eines Vertikalpullers (PA-10, E.S.F.) in zwei Zugschritten gefertigt. Für die Messungen an Purkinjezellen und hippocampalen CA1-Neuronen wurden Elektroden mit einem Öffnungswiderstand von 2 - 3 M Ω bzw. 4 - 5 M Ω verwendet.

2.2.2. Elektrische Eigenschaften der Whole-Cell-Konfiguration

Die Zellmembran kann man elektrisch durch ihren Widerstand (R_m) und eine dazu parallel angeordnete Kapazität (C_m) darstellen (Abb. 12). Im Whole-Cell-Modus, bei dem die Pipette mit dem Zellsoma leitend verbunden ist, liegt zwischen Silberdraht und Soma ein Widerstand (R_s) an.

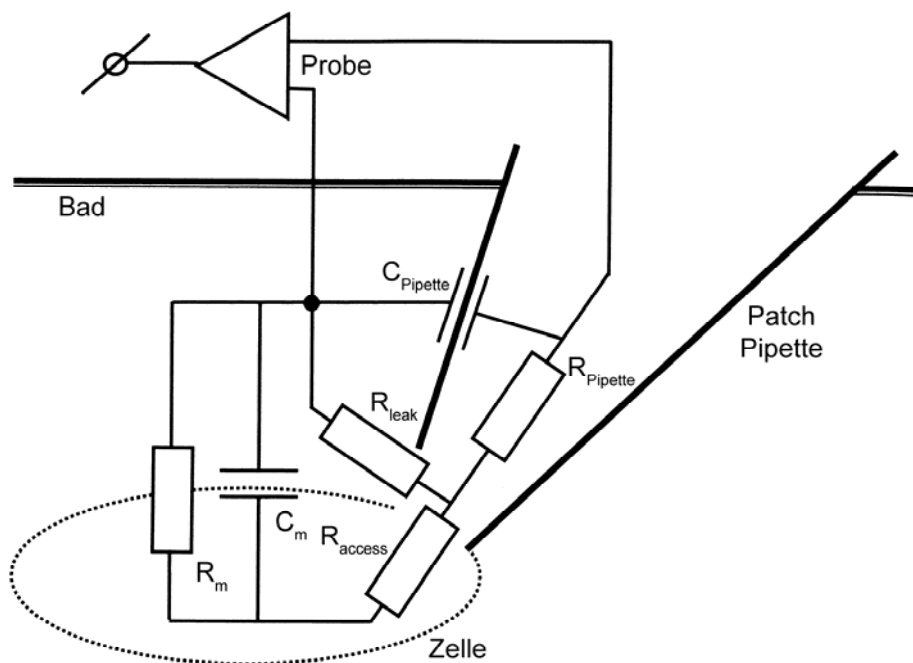


Abb. 12: Ersatzschaltbild der Whole-Cell-Konfiguration.

Nach dem Durchbrechen der Zellmembran wird der Widerstand des Patches sehr klein und deshalb von R_{patch} in R_{access} umbenannt. Der Schaltkreis besteht aus dem Pipetten-Widerstand $R_{Pipette}$, dem Eingangswiderstand R_{access} und dem Membranwiderstand R_m . Im Vergleich zum Membranwiderstand R_m sind R_{access} und $R_{Pipette}$ vernachlässigbar, was den Vorteil des Whole-Cell-Modus bedingt: Messen von Strömen durch R_m . Weil dieser Strom die Summe aller Ströme von aktivierten Einzelkanälen der Zelle darstellt, spricht man auch von „Whole-Cell-current“ (deutsch: ganz-Zell-Strom). Der Undichtigkeitswiderstand R_{leak} sollte so hoch wie möglich sein, um Kurzschlüsse mit dem Membranstrom zu vermeiden. Der Serienwiderstand R_s setzt sich zusammen aus dem Pipetten-Widerstand $R_{Pipette}$ und dem Eingangswiderstand R_{access} . R_m : Membranwiderstand; R_{leak} : Undichtigkeitswiderstand; $R_{Pipette}$: Pipetten-Widerstand; R_{access} : Eingangswiderstand; C_m : Membrankapazität; $C_{Pipette}$: Pipetten-Kapazität (nach Mollemann 2003).

Im Idealfall entspricht dieser dem Pipetten-Widerstand. Da sich jedoch nach dem Durchbrechen der Membran, Fragmente derselben in Pipettnähe befinden, erhöht sich der Serienwiderstand erheblich. Eine Erhöhung des Serienwiderstandes führt dazu, dass sich die Umladung des Kondensators (C_m) und der Kompensationsmechanismus zur Regulation der Spannung verlangsamen und somit Leitfähigkeitsänderungen zeitverzögert und verzerrt wiedergegeben werden. Dadurch kann es passieren, dass das Potenzial der Zelle für eine gewisse Zeit vom Sollwert abweicht, was zu unerwünschten Depolarisationen der Zellmembran führt. Der verwendete Patch-Clamp-Verstärker verfügt über Schaltkreise, die diese Erhöhung des Serienwiderstandes kompensieren (C_{fast} -, C_{slow} - Kompensation). Während der Messungen kann ein erneutes Verschließen der Membran unter der Patch-Pipette (engl.: resealing) ebenfalls zu einer Erhöhung des Serienwiderstandes führen. Aufgrund dieser Tatsache muss während der laufenden Messung ständig der Serienwiderstand überprüft werden, um im Falle eines resealings die Whole-Cell-Konfiguration wieder herzustellen oder gegebenenfalls die Messung abubrechen.

2.2.3. Aufbau des Messplatzes Elektrophysiologie/ Ca^{2+} -Imaging

Die optische Einheit bestand aus einem aufrechten Laser Scan Mikroskop (Zeiss Axioskop 2FS mot; LSM510 Meta), ausgestattet mit verschiedenen Wasserimmersionsobjektiven (Zeiss Achroplan 10x Ph1/0,3W; IR 40x/0,8W, IR 63x/0,9W). Zur Überwachung der Messung wurde das mikroskopische Bild mittels einer Digitalkamera (KAPPA CSI) auf einem Monitor abgebildet. Das zu untersuchende Präparat wurde in die mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) begastem Medium durchspülte Badkammer platziert (Durchflussrate 1,5 - 2 ml/min), die unter dem Objektiv durch zwei Mikromanipulatoreinheiten in horizontaler Ebene justiert werden konnte. Die Patch-Clamp-Einheit bestand aus einem motorgesteuerten Mikromanipulator (LN mini / combi, Luigs & Neumann), der eine Halterung für den Vorverstärker besaß, und der eigentlichen Patch-Clamp-Apparatur. Der Vorverstärker hatte eine Halterung für den Pipettenhalter, in den die Patch-Pipetten eingesetzt wurden und verfügte über einen Erdungseingang für die Badelektrode. Der Operationsverstärker, der den Kompensations-strom regulierte, war Teil des Vorverstärkers. Ausgehend vom Vorverstärker wurde das analoge Stromsignal zum Patch-Clamp-Verstärker (EPC 9, HEKA) geleitet. Der EPC 9 wurde über ein leistungsfähiges Computersystem (Macintosh, G4) angesteuert. Mittels der speziell für Patch-Clamp-Messungen entwickelten Software (Pulse 8.50, HEKA) konnte das analog aufgenommene Signal durch den AD-Wandler des EPC 9 digitalisiert dargestellt werden. Der Messplatz war mit einem zweiten Mikromanipulator ausgestattet, der ebenfalls

mit einer Pipettenaufnahme versehen war. Die zweite Pipette war mit einem Stimulus Isolator (WPI; A360) zur Generierung von Strompulsen verbunden. Der Patch-Clamp-Verstärker steuerte dabei zeitlich simultan zur Aufnahme der Spannungsänderung der ersten Pipette den Pulsgenerator. Dazu wurde ein so genanntes „Trigger-Signal“ vom Patch-Clamp-Verstärker ausgesendet. Außerdem konnte mit Hilfe von Trigger-Signalen simultan zur Elektrophysiologie das Laser Scan Mikroskop gestartet werden, um Ca^{2+} -Ionenströme mit Hilfe fluoreszierender Ca^{2+} -Indikatoren zu messen. Mit diesem Aufbau war es möglich, am Hirnschnittpräparat zur Messung der Kurzzeit-Plastizität die präsynaptischen Axone mit Stromimpulsen aus der Stimulationspipette zu stimulieren, gleichzeitig die resultierenden postsynaptischen Antworten mit der Patch-Clamp-Einheit in digitalisierter Form aufzuzeichnen und Fluoreszenzintensitätsänderungen des jeweiligen Ca^{2+} -Indikators mit dem LSM zu messen. Der gesamte Messbereich (Mikroskop, Vorverstärker, Mikromanipulator) stand auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Vibraplane, Kinetic Systems Inc., Boston USA), um Vibrationen, die ein Verrutschen der Messpipette oder des zu untersuchenden Präparats zur Folge hätten, zu vermeiden. Zudem sorgte ein Faraday'scher Käfig für die nötige elektromagnetische Abschirmung, um übermäßiges elektrisches Rauschen während der Messungen zu verhindern. Alle elektrisch leitenden Komponenten des Setups wurden geerdet, um das Rauschen der elektrophysiologischen Messungen auf wenige Piko-Ampere (pA) zu minimieren. Eine Schematische Darstellung des Messplatzes ist in Abb. 13 zu finden.

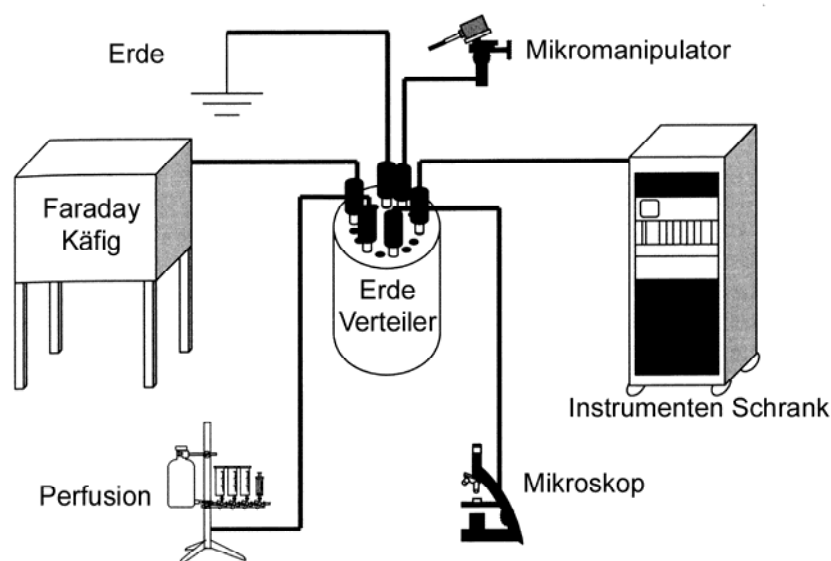


Abb. 13: Schema eines Elektrophysiologie Messplatzes

Angezeigt wird die Erdung der zugehörigen Komponenten.

2.2.4. Herstellung von Kleinhirn- und Hippocampus-Hirnschnitten

Die Präparation von transversalen Kleinhirnschnitten erfolgte nach dem Protokoll von LLANO (Llano et al. 1991). Analog wurden frontale Hippocampus-Schnitte hergestellt. In beiden Fällen wurden Mäuse im Alter von 18-21 Tagen verwendet. Die mit Isofluran betäubten Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, dekapitiert und das Gehirn in eisgekühlter Carbogen-begaster (5% CO₂, 95% O₂) artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit herauspräpariert (ACSF in mM: 125 NaCl, 2,5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 Glucose, pH 7,4 mit 1 M NaOH-Lösung eingestellt). Um die Aktivität der Neurone auf niedrigem Niveau zu halten, war in der Präparationslösung die Ca²⁺-Konzentration auf 0,5 mM reduziert. Anschließend erfolgte die Abtrennung des Kleinhirns, wobei darauf zu achten war, dass die Meningen weitgehend entfernt wurden. Transversale Kleinhirnschnitte (Dicke: 150 µm) oder frontale Hippocampus-Schnitte (Dicke: 300 µm) wurden mittels eines Vibratoms (Leica VT 1000 E) geschnitten. Die Hirnschnitte wurden ebenfalls in Carbogen-begaste EZL (2 mM CaCl₂, 37° C) überführt. Nach einer Erholungszeit von einer Stunde konnten die Schnitte in die Messkammer überführt werden.

2.2.5. Elektrophysiologische Messung von I_{AHP}

Nach der Herstellung von 300 µm dicken Hippocampus-Schnitten, wie unter 2.2.4 beschrieben, wurden diese in die Badkammer überführt. Anschließend wurden CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus gepatcht. Die verwendeten Elektroden wiesen einen Pipetten-Widerstand von 3,5-5 MΩ auf und wurden mit folgender intrazellulär Lösung (IZL) gefüllt (in mM): 135 Kalium-Methylsulfat, 8 NaCl, 10 HEPES, 2 Mg₂-ATP and 0,3 Na₃-GTP. Der pH wurde mit 1 M KOH-Lösung auf einen Wert von 7,3 eingestellt. Die Osmolarität betrug 300 mOsm. Die Badkammer wurde konstant (1 ml/min) gespült mit ACSF (engl.: artificial cerebrospinal fluid; deutsch: artifizielle zerbrospinale Flüssigkeit). Diese enthielt (in mM): 125 NaCl, 2,5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 Glucose, begast mit 95% O₂ und 5% CO₂ (Carbogen). Der pH wurde mit 1 M NaOH-Lösung auf pH 7,4 eingestellt. Nachdem die Whole-Cell-Konfiguration hergestellt war, wurde die Zelle auf ein Potenzial von -60 mV geklemmt. Alle 30 Sekunden wurden 200 ms dauernde depolarisierende Pulse von +20 mV durchgeführt. Diese waren hinreichend, um AHP Ströme zu aktivieren. Zur Datenanalyse wurde die Software PulseFit (HEKA) benutzt. Der Decay der I_{AHP} und sI_{AHP} Ströme wurde bestimmt, indem er mit einer einfach-exponentiellen Gleichung angenähert wurde. Die Höhe der I_{AHP} Amplitude wurde am Maximum des Stroms abgelesen, während die sI_{AHP} Amplitude 700 ms nach Ende des Stimulus gemessen wurde.

2.2.6. Messung von Ca^{2+} -Strömen über VGCCs

Von CA1-Neuronen des Hippocampus wurden sowohl K^+ - als auch Ca^{2+} -Leitfähigkeiten elektrophysiologisch bestimmt. Die K^+ -Leitfähigkeiten oder I_{AHPs} wurden wie unter 2.2.5 beschrieben bestimmt. Zur elektrophysiologischen Messung der Ca^{2+} -Leitfähigkeiten wurden 300 μm Hippocampus-Schnitte in die Badkammer des Messplatzes überführt. Diese enthielt folgende Extrazellulärlösung (in mM): 148 TEA-Cl, 4 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 HEPES, 0,001 TTX, und 0,01 Nifedipin (wenn angezeigt). Der pH wurde auf 7,3 mit TEA-OH eingestellt. Die Lösung wies eine Osmolarität von 320 mOsm auf. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur (23°C) durchgeführt, während die Badkammer mit einer konstanten Durchflussrate von 1 ml/min gespült wurde. Die CA1-Hippocampusneurone wurden mit selbstgezogenen Glaselektroden gepatcht. Die Glaselektroden wiesen einen Widerstand von 3-5 $\text{M}\Omega$ auf und wurden mit folgender Intrazellulärlösung (IZL) befüllt: 120 CsCl_2 , 20 CsFl, 4 MgCl_2 , 1 EGTA, 4 $\text{Mg}_2\text{-ATP}$, 10 HEPES. Der pH wurde mit CsOH-Lösung auf 7,3 eingestellt, und die Osmolarität der Lösung betrug 320 mOsm. EZL und IZL enthielten kein Na^{2+} , um das unerwünschte Messen von Na^{2+} -Strömen zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde auch TTX appliziert, das Na^{2+} -Kanäle spezifisch und irreversibel blockt. So ist es möglich spezifisch Ströme durch VGCCs zu messen. Nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration wurde das Membranpotenzial auf -70 mV eingestellt. Strom-Spannungs-Verhältnisse (I/V -Verhältnisse) wurden erstellt, indem das Membranpotenzial der Zelle vom Haltepotenzial (-70 mV) für 200 ms in 10 mV Abständen von -100 auf +30 mV angehoben wurde. Zur Bestimmung der I/V -Verhältnisse wurde dann das Maximum des Stroms bei den verschiedenen Potenzialen gemessen und gegen das jeweilige Potenzial aufgetragen. Die inaktivierende Komponente des Ca^{2+} -Stroms wurde für die größte Stromamplitude bestimmt, indem die Differenz gebildet wurde aus dem Wert der maximalen Stromamplitude und dem Amplitudenwert am Ende der Potenzialanhebung (Abb. 23, ΔX).

2.3. Ca^{2+} -Imaging

Mit Hilfe der oben beschriebenen Patch-Clamp-Technik gelingt es, verschiedene Ionenströme durch Ionenkanäle in der Membran von intakten Neuronen zu messen. Ca^{2+} -Imaging ergänzt diese Technik, indem Ca^{2+} -Flux in den kleinsten Kompartimenten der Zelle wie Dendriten und Spines gemessen werden können. Durch Kombination von Elektrophysiologie mit Ca^{2+} -Imaging gelingt es, einen umfassenderen Eindruck über die Ca^{2+} -Bewegungen innerhalb der

Zelle zu bekommen. Beim Ca^{2+} -Imaging macht man sich fluoreszierende Ca^{2+} -bindende Chemikalien zunutze, die bei Bindung von Ca^{2+} -Ionen eine Änderung der Fluoreszenzintensität zeigen, die gemessen werden kann. Alle chemischen Ca^{2+} -Indikatoren basieren auf dem pH-insensitiven EGTA-Homolog BAPTA. Mittlerweile existieren Ca^{2+} -Indikatoren mit vielen verschiedenen Anregungs- und Emissionswellenlängen für eine große Anzahl von Anwendungen. Anregungswellenlängen reichen von UV bis zu sichtbaren Wellenlängen. Mit den Emissionswellenlängen verhält es sich ebenso. Drei Arten von Fluoreszenzänderungsmechanismen nach Ca^{2+} -Bindung werden beschrieben: Erstens, die Bindung von Ca^{2+} resultiert in einer Verschiebung der Anregungswellenlänge und manchmal auch der Emissionsmaxima, was die Bildung von Anregungs- oder Emissions-Verhältnissen erlaubt (z.B. Fura-2 und Indo-1). Zweitens, die Bindung von Ca^{2+} führt zu einer Änderung der Fluoreszenzintensität ohne eine Verschiebung von Anregungs- oder Emissionswellenlänge (z.B. Fluo-3, Rhod-2, Oregon Green Bapta-1, Calcium Green 5N). Diese Ca^{2+} -Indikatoren werden auch als „single-wavelength dyes“ (engl.: einzelne Wellenlänge Farbstoff) bezeichnet. Drittens, die Bindung von Ca^{2+} resultiert in Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET; bei gentechnisch modifizierten Protein Paaren zur Ca^{2+} -Bindung). In der vorliegenden Arbeit wurden die unter „Zweitens“ genannten „single-wavelength dyes“ benutzt, die auf Bindung von Ca^{2+} mit einer Änderung der Fluoreszenzintensität reagieren.

Appliziert wurden diese Ca^{2+} -Indikatoren mit Hilfe der oben beschriebenen Patch-Clamp-Technik. Dazu wurde der in der Patch-Pipette befindlichen IZL der jeweilige Ca^{2+} -Indikator hinzugefügt. Nach erfolgreichem Patchen einer Zelle wurde die Intrazellulärlösung mit dem Zytosol der Zelle ausgetauscht, wodurch der Ca^{2+} -Indikator in die Zelle gelangte. Nach Equilibrierung konnte dann der jeweilige Ca^{2+} -Indikator mit Laser Scan Mikroskopie sichtbar gemacht werden. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität des Ca^{2+} -Indikators während der Stimulation einer Zelle wurde dann mit dem Laser Scan Mikroskop simultan zum elektrophysiologischen Signal aufgezeichnet. Da sich der Ca^{2+} -Indikator bis in die Dendriten und Spines von Neuronen ausbreitet, konnten die Ca^{2+} -Bewegungen in diesen kleinen Kompartimenten von Neuronen im intakten Hirnschnitt aufgezeichnet werden.

2.3.1. Ca^{2+} -Imaging und I_{AHP}

Zur gleichzeitigen Messung von AHP Strömen und Fluoreszenzintensitätsänderungen in CA1-Hippocampusneuronen wurde wie unter 2.3 beschrieben verfahren. In Abb. 14 ist ein mit CG-5N (Calcium-Green 5N; Molecular Probes) über die Patch-Pipette beladenes CA1-Neuron dargestellt, zusammen mit der schematischen Darstellung der Verschaltung der

Neurone im Hippocampus. Die verwendete IZL enthielt zusätzlich zu den bereits unter 2.2.5 beschriebenen Komponenten den Ca^{2+} -Indikator CG-5N.

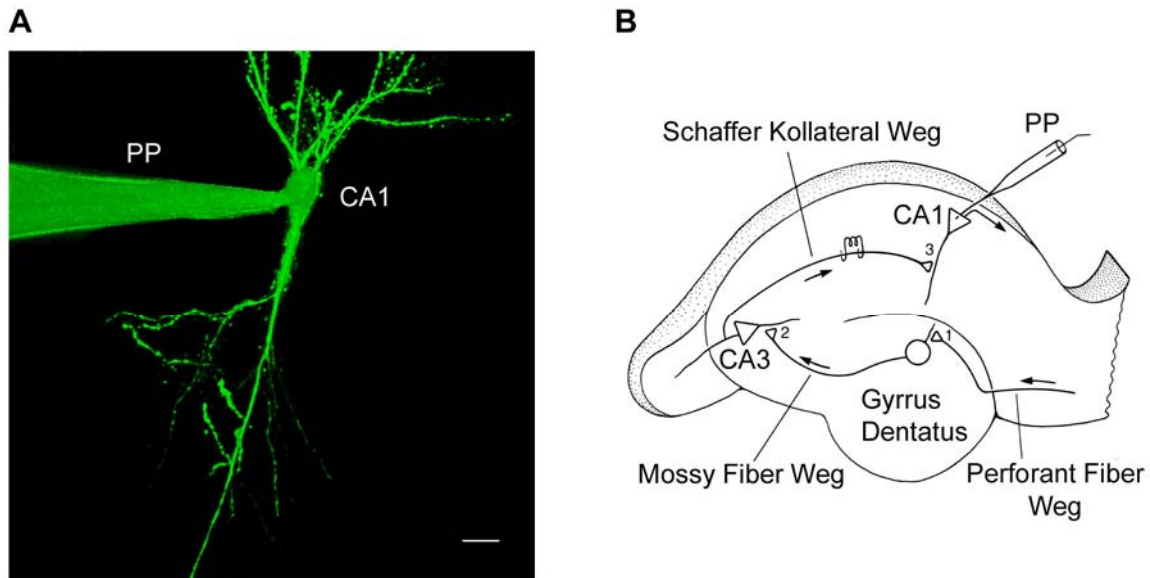


Abb. 14: Whole-cell-Modus am CA1-Neuron im vitalen Hippocampus-Schnitt

(A) Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines gepatchten CA1-Neurons beladen mit CG-5N. Balken entspricht 20 μm . (B) Schematische Ansicht des Hippocampus (nach Kandel et al. 1995) mit neuronaler Verschaltung. PP: Patch-Pipette, CA1, 3: CA1- und CA3-Neurone im Hippocampus.

Simultan zur Auslösung des depolarisierenden Pulses mit dem Patch-Clamp-Verstärker wurde über ein TTL-Signal das LSM gestartet, so dass Elektrophysiologie und Ca^{2+} -Imaging gleichzeitig abliefen. Das konfokale Laser Scan Mikroskop war mit einem 40x Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss; Achroplan 40x NA 0,75) ausgestattet. Zur Fluoreszenzanregung diente ein Argon Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Zur Detektion der emittierten Fluoreszenz wurde ein Bandpass-Filter (BP 500-550 nm) vor den Photomultiplier (PMT) geschaltet. Das Pinhole wurde so justiert, dass konfokale Schnitte der Dicke 2-3 μm entstanden. Zur Messung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzintensität des Ca^{2+} -Indikators wurden mit dem LSM Bilder von dem mit Ca^{2+} -Indikator gefüllten CA1-Neuron mit einer Frequenz von 10 Hz aufgenommen. Sämtliche Fluoreszenz-Messwerte wurden in $\Delta F/F_0$ umgerechnet. Dazu diente die folgende Formel: $\Delta F/F_0 = 100 \times (F - F_r) / (F_r - B)$. Dabei ist F die gemessene Fluoreszenzintensität, F_r der Mittelwert der Fluoreszenzintensität von 10 Scans vor Auslösen des Stimulus und B der Mittelwert der Hintergrundfluoreszenzintensität aus einer Region im Scan-Feld, das keinen Teil der mit

Farbstoff gefüllten Zelle enthält. ROIs (engl.: region of interest; deutsch: Region von Interesse) wurden nach der Bildaufnahme ausgewählt und analysiert. Zwei verschiedene ROIs mit Membran- und Zytosol-Schale wurden für jede Zelle ausgewertet. Dazu wurde die Zeiss LSM 3.2 Software benutzt. Außerdem wurden die Programme Microsoft EXCEL, Sigma Plot und Sigma Stat verwendet.

2.3.2. Messung IP₃-vermittelter Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER von Purkinjenzellen

Der Kleinhirnschnitt wurde nach der Inkubationszeit in der Badkammer mit einem „Grid“ (U-förmiger Platindraht, der mit Nylonfäden bespannt war) fixiert. Während der Messung wurde der Kleinhirnschnitt konstant (1 ml/min) mit ACSF umspült. Diese enthielt (in mM): 125 NaCl, 2,5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 Glucose, 10 µM Bicucullin, begast mit 95% O₂ und 5% CO₂ (Carbogen). Der pH wurde mit 1 M NaOH-Lösung auf pH 7,4 eingestellt. Für die Messung IP₃-vermittelter Ca²⁺-Freisetzung wurde zur Stimulation der Parallelfasern eine Stimulationselektrode mit einer Spitzenöffnung von ca. 3 µm und einem Pipetten-Widerstand von ca. 1 MΩ in etwa 200 - 300 µm Entfernung von der Zielzelle auf der Molekularschicht platziert (monopolare Stimulation, siehe Abb. 15).

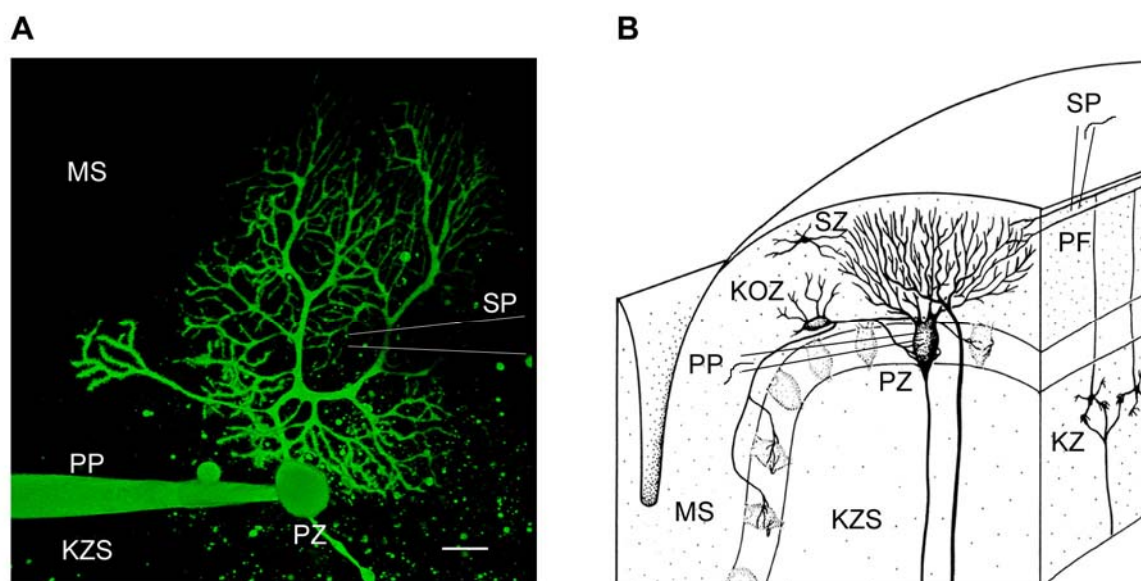


Abb. 15: Purkinjezelle im vitalen Kleinhirnschnitt mit Stimulation der Parallelfasern

(A) Fluoreszenzmikroskopisches Bild einer gepatchten Purkinjezelle beladen mit OGB-1, die über Parallelfaserstimulation mittels einer Stimulationspipette lokal angeregt wurde. Balken entspricht 20 µm. (B) Schematische Ansicht des Kleinhirns (nach Kandel et al. 1995) mit Anordnung der monopolareren Parallelfaserstimulation. MS: Molekularschicht, KZS: Körnerzellschicht, PZ: Purkinjezelle, KZ: Körnerzelle, SZ: Sternzelle, KOZ: Korbzelle, PP: Patch-Pipette, PF: Parallelfasern, SP: Stimulationspipette.

Der Aufbau der Stimulationselektrode entsprach dem der Patch-Pipette mit der Ausnahme, dass die Pipette nicht mit IZL, sondern mit ACSF gefüllt wurde. Nach Platzierung der Stimulationselektrode wurde mit der Patch-Pipette das Soma der Purkinjezelle gepatcht. Die verwendeten Elektroden wiesen einen Pipetten-Widerstand von 2-3,5 M Ω auf und wurden mit folgender intrazellulär Lösung (IZL) gefüllt (in mM): 148 Kaliumglukonat, 10 HEPES, 10 NaCl, 0,5 MgCl₂, 4 Mg-ATP, 0,4 Na₃-GTP, 0,1 Oregon Green BAPTA-1 (Molecular Probes), pH 7,3 mit 1 M KOH-Lösung. Die Osmolarität betrug 300 mOsm. Nachdem die Whole-Cell-Konfiguration hergestellt war, wurde die Zelle auf ein Potenzial von -70 mV geklemmt. Anschließend wurde für 10 Minuten die Füllung der Purkinjezelle mit der IZL abgewartet. Durch den in der IZL enthaltenden Ca²⁺-Indikator konnte die Zelle fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden. Mit dem LSM wurde nun die Lage der Purkinjezelle durch Aufnahme eines z-Stapels bestimmt. Durch gleichzeitige Stimulation und Aufnahme der Ca²⁺-Indikator-Intensität in schnellen Zeitserien wurde die Stelle bestimmt, an der Dendriten des Purkinjezell-Baums auf die Stimulation der Parallelfasern mit der Stimulationselektrode reagierten. In diese Stelle wurde eingezoomt und kleine Rahmen (30 x 60 μ m) mit einer Frequenz von 30 Hz gescannt. Zusätzlich wurde mit Line-Scans (120 Hz) an dendritischen Spines die zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität des Ca²⁺-Indikators nach „sub-threshold“ (deutsch: unter Schwellenwert) Stimulation aufgezeichnet. Der Begriff sub-threshold Stimulation bedeutet, dass die Stimulation der Parallelfasern nur zu einer lokal begrenzten Reaktion der Purkinjezelle führt. Ohne die Überschreitung des Schwellenwerts kommt es nicht zur Entstehung eines Aktionspotenzials am Soma der Purkinjezelle. Unterschwellige Stimulation über die Stimulationselektrode wurde mit 5 Strompulsen (1-10 mA; 50 Hz) erreicht. Diese führten zur gewünschten Generierung des zu messenden biphasischen Signals in der Änderung der Ca²⁺-Indikator Fluoreszenzintensität.

Sämtliche Fluoreszenz-Messwerte wurden in $\Delta F/F_0$ umgerechnet. Dazu diente die folgende Formel: $\Delta F/F_0 = 100 \times (F - F_r) / (F_r - B)$. Dabei ist F die gemessene Fluoreszenzintensität, F_r der Mittelwert der Fluoreszenzintensität von 10 Scans vor Auslösen des Stimulus und B der Mittelwert der Hintergrundfluoreszenzintensität aus einer Region im Scan-Feld, das keinen Teil der farbstoffgefüllten Zelle enthält. ROIs wurden nach der Bildaquisition ausgewählt und analysiert. Dazu wurde die Zeiss LSM 3.2 Software benutzt. Außerdem wurden die Programme Microsoft EXCEL, Sigma Plot und Sigma Stat zur weiteren Auswertung verwendet.

2.4. Mauslinien

2.4.1. C57BL6 x 129Sv und C57BL6 x 129Sv *Prnp*^{-/-}

Die Mauslinie C57BL6 x 129Sv ist aus einer Kreuzung der Inzucht-Linien C57BL6 und 129Sv entstanden und besitzt den annähernd gleichen genetischen Background wie *Prnp*^{-/-}-Mäuse. *Prnp*-Knockout-Mäuse, die kein Prion-Protein exprimieren, wurden von BÜLER (Bueler et al. 1992) generiert. Dazu wurde eine klassische Knockout-Strategie angewendet, bei der das *Prnp*-Gen durch Einbringen einer Neomycin-Resistenz zerstört wurde. Das verwendete Knockout-Konstrukt ist in Abb. 18 dargestellt. Für die Experimente wurden ausschließlich Geschwister verwendet, um Einflüsse des genetischen Backgrounds so weit wie möglich auszuschließen. Dazu wurden *Prnp*^{+/-}-Mäuse verpaart, so dass 50% der Nachkommen heterozygot *Prnp*^{+/-} und 25% homozygot *Prnp*^{-/-} beziehungsweise *Prnp*^{+/+} waren. Die Mäuse wurden mit Hilfe der Primer P2, P4 wie unter 2.4.3 beschrieben genotypisiert (Abb. 16). Mäuse für Experimente wurden von einer unabhängigen Person ohne die Kenntnis des Experimentators zufällig in die Gruppen *Prnp*^{+/+} und *Prnp*^{-/-} eingeordnet. Erst nach Abschluss der Messung und Auswertung wurden dem Experimentator die Genotypen mitgeteilt.

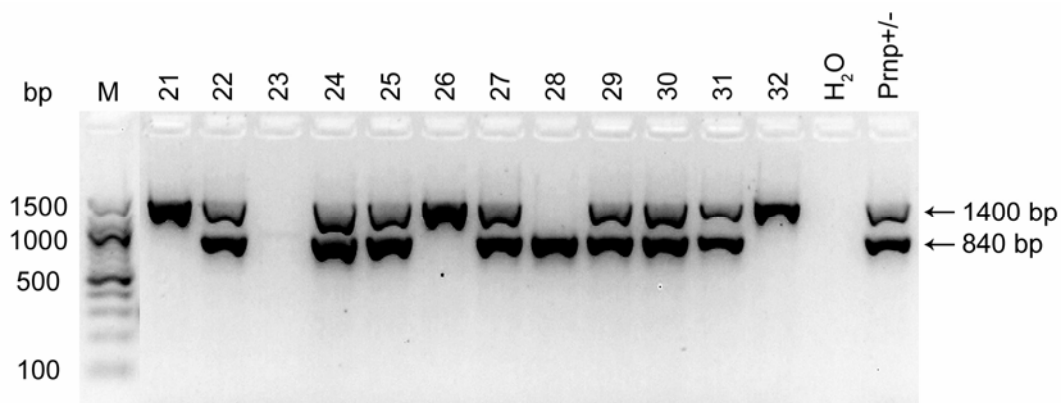


Abb. 16: Agarosegel zur Genotypisierung von *Prnp*^{-/-}, *Prnp*^{+/+}- und *Prnp*^{+/-}-Mäusen

Die Bande der Größe 1400 bp entspricht dem PCR-Produkt für *Prnp*^{-/-} und die Bande der Größe 840 bp dem PCR-Produkt für *Prnp*^{+/+}. Tiere, die beide PCR-Produkte zeigen sind heterozygot *Prnp*^{+/-}. Analog sind Tiere mit ausschließlich der 1400 bp oder der 840 bp Bande homozygot *Prnp*^{-/-} respektive homozygot *Prnp*^{+/+}. Als Kontroll-PCRs wurden ein heterozygoter *Prnp*^{+/-}-Tier und H₂O verwendet. M: Marker, 100 bp Leiter; bp: Basenpaare;

2.4.2. B6.Cg-Tg(Thy1-YFPH)2Jrs/J

Die Mauslinie B6.Cg-Tg(Thy1-YFPH)2Jrs/J (Kurz: YFP-H) wurde von FENG (Feng et al. 2000) hergestellt und über Jackson Laboratories (Jackson Laboratory; Maine; USA) gekauft. Die Linie wurde auf dem genetischen Background der Inzucht-Linie C57BL6 gehalten. Als

Transgen wurde ein Konstrukt eingebracht, bei dem das Gen für YFP (engl.: yellow fluorescent protein; deutsch: Gelb fluoreszierendes Protein) aus der Alge *Aequorea victoria*. (Ormo et al. 1996) unter die Kontrolle des Thy1.2-Promotors gebracht wurde (Abb. 18).

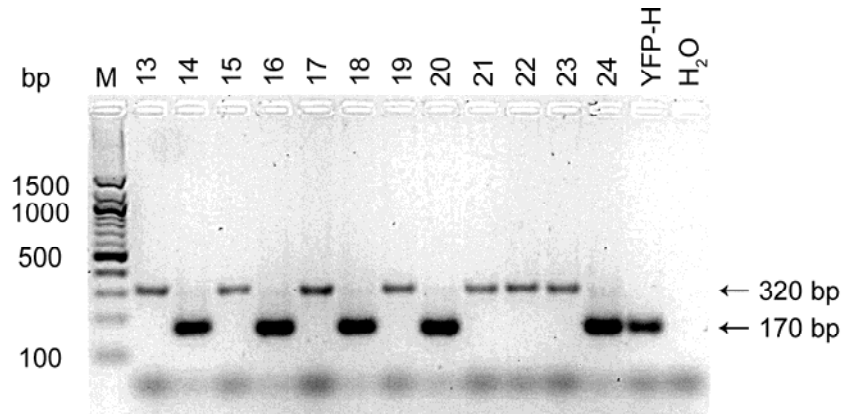


Abb. 17: Agarosegel zur Genotypisierung von Mäusen der Linie YFP-H

Die Bande der Größe 320 bp ist das PCR-Produkt des *Interleukin 2* (*IL-2*) und die Bande der Größe 170 bp entspricht dem PCR-Produkt des *YFP*-Transgens. *IL-2* wurde als Kontrolle eingesetzt um zu überprüfen, ob die PCR funktioniert hat. In der kompetitiven PCR wurden vier Primer eingesetzt (P42, P43 für *IL-2*, P872, P1416 für *YFP*), so dass bei vorhandenem *YFP*-Transgen nur dieses PCR-Produkt gebildet wird, bei nicht vorhandenem *YFP*-Transgen hingegen nur das *IL-2*-PCR-Produkt. Die Tiere 14, 16, 18, 20 sind positiv für das *YFP*-Transgen. Als Kontroll-PCRs wurden ein *YFP-H^{+/+}*-Tier und H₂O verwendet. M: Marker, 100 bp Leiter; bp: Basenpaare;

Der Thy1.2-Promotor ist ein modifizierter Thy1-Promotor, der von VIDAL (1990), KELLY (1994) und CARONI (1997) beschrieben wurde (Vidal et al. 1990; Kelley et al. 1994; Caroni 1997). Thy-1 ist ein GPI-verankertes Zelloberflächen-Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie, das in einer Vielzahl von Geweben und Zelltypen exprimiert wird. Darunter unter anderem der Thymus, das Nervensystem und Gewebe-Fibroblasten (Gordon et al. 1987; Morris 1992; Caroni 1997). Das Konstrukt besteht aus 6,5 kb des murinen *thy1.2*-Gens und erstreckt sich vom Promotor bis zum Intron hinter Exon4, wobei Exon3 und dessen flankierende Introns fehlen (Abb. 18). Die deletierten Sequenzen werden für die Expression in nicht neuronalen Zellen benötigt, während die upstream liegenden Intron-Sequenzen notwendig für die Expression in Neuronen sind (Vidal et al. 1990). Deshalb wird YFP in verschiedenen Neuronen dieser Mauslinie exprimiert oder einfach gesagt: verschiedene Nervenzellen der Maus leuchten gelb. Mäuse dieser Linie wurden wie unter 2.4.3 beschrieben genotypisiert (Abb. 17).

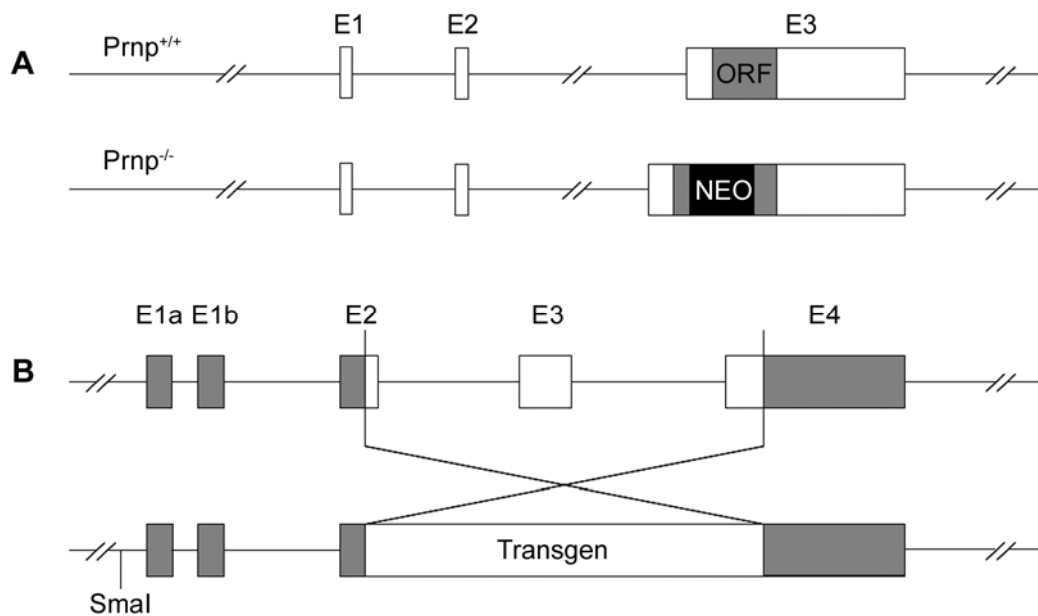


Abb. 18: Knockout- und Transgen-Konstrukte der verwendeten Mauslinien

(A) Wildtyp-Allel des *Prnp*-Gens der Maus und das zugehörige Knockout-Konstrukt, bei dem in Exon3 eine Neomycin-Resistenz eingefügt und Teile der *Prnp*-Sequenz deletiert wurden. **(B)** Modifiziertes Thy-1.2-Expressions-Konstrukt. Durch Deletion von Exon3 wird die Expression im Thymus unterbunden. Das Transgen im Fall der verwendeten Maus ist das Gen für das „Yellow Fluorescent Protein“ (YFP). Abkürzungen: E: Exon; ORF: open reading frame; NEO: Neomycin-Resistenz-Gen; SmaI: Restriktionsschnittstelle für das Enzym SmaI.

2.4.3. Genotypisierung

Zur Genotypisierung der verwendeten Mauslinien wurden Schwanzbiopsien von 3 Wochen alten Tieren genommen. Aus diesen Gewebeproben wurde anschließend genomische DNS isoliert. Mit Hilfe der PCR (Kapitel 2.4.5, S.61) wurden die für die Bestimmung des Genotyps der Maus wichtigen Gene und Transgene amplifiziert. Dazu wurden Gen- und Transgen-spezifische Primer (Tabelle 1, S.61) ausgewählt und eingesetzt. Die PCR-Fragmente wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, und anhand des Bandenmusters konnte der Genotyp der untersuchten Schwanzbiopsie bestimmt werden.

2.4.4. DNS-Isolation aus Mausschwanz-Biopsien

Die Isolation genomischer DNS aus Mausschwanzbiopsien wurde mit dem E.Z.N.A Tissue DNA Mini Kit (peqlab, 12-3396-02; Erlangen) durchgeführt. Dabei wurde nach der Arbeitsanleitung für Mäuseschwänze verfahren.

2.4.5. PCR

Zur Amplifizierung von DNS wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion durchgeführt (PCR; engl.: polymerase chain reaction) (Mullis et al. 1986; Saiki et al. 1988). Dazu wurde der HotMasterMix 2,5x (Eppendorf, 0032 002.722; Hamburg) zusammen mit verschiedenen Primern (MWG, Ebersberg) verwendet. Als PCR-Maschine diente der „MasterCycler epgradient“ (Eppendorf, Hamburg).

Tabelle 1: Primer und Sequenzen

Bezeichnung	Sequenz	Länge	T _m
P2	5-ctt cag cct aaa tac tgg g-3	19	54,5
P4	5-acc acg aga atg cga agc-3	18	56
P42	5-cta ggc cac aga att gaa aga tct-3	24	59,3
P43	5-gta ggt gga aat tct agc atc atc c-3	25	61,3
P872	5-aac ttc atc tgc acc acc g-3	19	56,7
P1416	5-tcc ttg aag aag atg gtg cg-3	20	57,3

Tabelle 2: PCR-Mix für die Genotypisierung von *Prnp*^{+/-}, *Prnp*^{-/-}, *Prnp*^{+/-}-Mäusen

Volumen	Produkt	Konzentration	Endkonzentration
10 µl	Eppendorf HotMasterMix (2,5x)		
0,5 µl	P2 (MWG)	10 µM	200 nM
0,5 µl	P4 (MWG)	10 µM	200 nM
0,5 µl	Template DNS		Bis 200 ng total
13,5 µl	H ₂ O		

Tabelle 3: PCR-Programm P2, P4

Schritt	Zeit	Temp	Repeat
1	1 min 30 sec	94°C	
2	30 sec	95°C	Schritt 2-4
3	30 sec	50°C	35x
4	1 min 30 sec	65°C	
5	10 min	65°C	
6	unendlich	4°C	

Tabelle 4: PCR-Mix für die Genotypisierung von YFP-H-Mäusen

Volumen	Produkt	Konzentration	Endkonzentration
10 µl	Eppendorf HotMasterMix (2,5x)		
1 µl	P42 (MWG)	10 µM	200 nM
1 µl	P43 (MWG)	10 µM	200 nM
1 µl	P872	10 µM	200 nM
1 µl	P1416	10 µM	200 nM
1 µl	Template DNS		Bis 200 ng total
10 µl	H ₂ O		

Tabelle 5: PCR-Programm YFP-H

Schritt	Zeit	Temp	Repeat
1	1 min 30 sec	94°C	
2	30 sec	95°C	Schritt 2-4
3	1 min	56°C	35x
4	1 min	65°C	
5	10 min	65°C	
6	unendlich	4°C	

2.4.6. Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNS-Fragmenten

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNS-Fragmenten wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde Agarose (1% w/v) in TAE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle Moulinex Quickchef 650 (Samou, Radolfzell) gelöst und mit Sybr-Gold (0,1 µg/ml, MoBiTec, Göttingen) versetzt. Die Lösung wurde in eine Flachbettschale gegossen und mit einem Kamm zur Erzeugung von Geltaschen bestückt. Die Agarose wurde durch Abkühlen zum Erstarren gebracht und in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer (Peqlab, Erlangen) überführt. Die DNS-Proben wurden in einem Volumen-Verhältnis von 1:5 mit 5× Gel Loading Solution (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versehen und in die Geltaschen gefüllt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde ein 100 bp -DNS-Standard (New England Biolabs, Frankfurt) mit auf das Gel aufgetragen. Zur elektrophoretischen Auftrennung der DNS-Fragmente wurde für 4 h eine Spannung von 40 mV angelegt. Nach Beendigung der Auftrennung wurden die DNS-Banden durch Bestrahlung mit UV-Licht visualisiert und fotografiert.

2.5. Sonstige Methoden

2.5.1. Quantitative RT-PCR

Die Quantitative RT-PCR wurde in Zusammenarbeit mit Tobias Bittner durchgeführt. Mit Hilfe des Reagenz „Trizol“ (Invitrogen, Karlsruhe) isolierte man aus Hippocampus-Gewebe, das direkt nach Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurde, die Gesamtmenge an RNS. Die RNS (ca. 16 µg) wurde anschließend mit RNeasy Säulen (Quiagen, Hilden) gereinigt. Jetzt wurde mit der reversen Transkriptase „SuperScript2“ (Invitrogen, Karlsruhe) und T7-(dT24)-Primern (MWG, Ebersberg) „first-strand“ cDNS synthetisiert. Daraus wurde abschließend doppelsträngige cDNS generiert. Zwei Mikroliter

verdünnter cDNS (1:10) wurden für die Quantitative RT-PCR eingesetzt. Diese wurde mit „Faststart DNA Master SYBR Green I“ von Roche (Roche, Penzberg) durchgeführt. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt:

Tabelle 6: RT-PCR-Programm

1	„Hotstart“	95°C	10 min
2	Denaturierung	95°C	10 sec
3	Anlagerung	57°C	15 sec
4	Synthese	72°C	10 sec

Zyklus 2-4 wurden 50 mal wiederholt

Zur Normalisierung wurde das β -Aktin-Gen herangezogen. Die Primer für die zu untersuchenden Gene wurden so gewählt, dass sie an Exon-Intron-Grenzen lagen oder Exon-Exon-Splice Stellen überspannten. Damit wurde verhindert, dass potenziell als Verunreinigung vorliegende genomische DNS amplifiziert wurde. Folgende Primer wurden verwendet:

Tabelle 7: Primer für die quantitative RT-PCR

β -Aktin	5-aac cct aag gcc aac cgt gaa aag-3; 5-cta gga gcc aga gca gta atc t-3
<i>Cacna1c</i>	5-cgc agc gta agg atg a-3; 5-gcc ctt cga cct aga g-3
<i>Cacna1d</i>	5-act gag aaa ccg ctg t-3 5-aga cct aat gta agt ctc gt-3
<i>Cacnb2</i>	5-tct gct tag ccg gac t-3; 5-ggt tat gct cgc ggt g-3
<i>Cacnb3</i>	5-cac aac ttg cca aga cc-3 5-cca gta aac ctc taa gta ttc ag-3
<i>Cacnb4</i>	5-agc tta gcg gaa gta caa-3; 5-gct act gct cgt gtg g-3

Relative Expressionslevel der verschiedenen Gene wurden mit einer relativen Quantifizierungsmethode vorgenommen, die in der Gebrauchsanweisung des Lightcyclers beschrieben ist (Roche, technical note LC 13/01).

2.5.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde eine diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970) durchgeführt. Es wurden dafür Gelelektrophorese-Apparaturen für 10×10 cm² große Gele Typ Owl P8DS (VWR, Ismaning) verwendet, wobei 1/4 der Gel-Länge aus dem Sammelgel und 3/4 aus dem Trenngel bestand. Es wurden 7%ige Trenngele mit Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung (Bio-Rad, München) erstellt.

Nach dem Gießen des Trenngels wurde die Trenngellösung mit Isopropanol überschichtet und 30 min zur Polymerisierung bei RT stehengelassen. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt, die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen und der Kamm positioniert. Die Proteinproben wurden mit 5× Proteinprobenpuffer versetzt, 10 min bei 99°C aufgeköcht und nach Abkühlung zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard „Prestained SDS-PAGE standard – broad range“ (Bio-Rad, München) auf das Gel aufgetragen. Der Einlauf der Proben durch das Sammelgel in das Trenngel wurde durch Anlegen einer Spannung von 80 V für 40 min erreicht, wonach die Spannung für die Auftrennung der Proteine im Trenngel auf 140 V erhöht wurde.

2.5.3. Westernblot

Die Westernblots zur Bestimmung der Proteinexpression von $\alpha 1C$ - und $\beta 2$ -Untereinheiten wurden in Zusammenarbeit mit Nicole Haider und Dr. Sven Moosmang durchgeführt (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, TU-München).

Um Proteine immunochemisch nachzuweisen, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und die aufgetrennten Proteine durch eine Elektroelution im „semi-dry“-Verfahren (Towbin et al. 1979; Kyhse-Andersen 1984) auf immobilisierende Immobilon-P PVDF-Membranen (Millipore, Eschborn) übertragen.

Dazu wurden die mit Methanol aktivierte Membran (7 × 9 cm), das SDS-Polyacrylamidgel ohne Trenngel sowie vier an die Größe der Membran angepasste GB 004 Gel-Blotting-Papiere (VWR, Ismaning) in Blotting-Puffer equilibriert, in der Reihenfolge Blotting-Papiere (2×), Membran, SDS-Gel und Filterpapiere (2×) luftblasenfrei in eine Semiphor Transphor Blot-Apparatur (Amersham Biosciences, Freiburg) auf die Anoden-Platte gelegt, mit der Katoden-Platte abgedeckt und der Transfer für 1,5 h bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Gelfläche durchgeführt. Nach dem Proteintransfer auf die PVDF-Membran wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation der Membran in Block-Puffer unter ständigem Schwenken für 1 h bei RT abgesättigt. Anschließend wurde die Membran in einer Lösung des in PBST-verdünnten anti-Ca_v1.2- oder anti- $\beta 2$ -Antikörpers (Moosmang et al. 2003) über Nacht bei 4°C geschwenkt, zweimal für 30 min in PBST gewaschen, für 1 h in einer Lösung des in PBST-verdünnten Sekundär-Antikörpers geschwenkt, wieder zweimal für 30 min in PBST gewaschen und abschließend für 5 min in Chemilumineszenz-(CLZ)-Puffer inkubiert. Der CLZ-Puffer wurde abgegossen, Puffer-Reste durch Abtupfen mit Zellstoff von der Membran entfernt und 0,5 ml CDP-Star Substrat-Lösung (Roche, Mannheim) auf die Membran getropft. Die Membran wurde dann mit Klarsichtfolie umhüllt, in einer

Entwicklungskassette mit verschiedenen Expositionszeiten auf einen Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgelegt und in einer Entwicklungsmaschine Optimax Typ TR (MS Laborgeräte, Wiesloch) entwickelt.

2.5.4. Infektion mit 10%igem RML Hirnhomogenat

Die Infektionen mit 10%igem RML Hirnhomogenat wurden im infektiösen Tierstall des ZNPs von Gerda Mitteregger und Claudia Pace durchgeführt. Intrazerebrale Inokulationen der Mäuse mit dem Scrapie-Erreger (i.c.) wurden mittels intrazerebraler Einführung einer Kanüle durchgeführt. Dazu wurde eine Gesamtmenge von 30 µl 10%igem Hirnhomogenat injiziert. Während der Inokulation wurde die Maus mit Isofluran betäubt. Zur Analgesie wurde einmalig Buprenorphin (0,1 mg/kg i.p. intraperitoneal) gegeben.

2.6. Chemikalien und Lösungen

2.6.1. Lösungen und Puffer zur Protein-Analyse und Aufreinigung

Trenngel:	15% oder 10% Acrylamid, 0,375 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,035% TEMED
Sammelgel:	5% Acrylamid, 0,125 M Tris/HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS und 0,07% TEMED
Laufpuffer:	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1% SDS
5× Probenpuffer:	15% (w/v) SDS, 40% (w/v) Saccharose, 1 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 6,8, 20% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,2% (w/v) Bromphenolblau
Blotting-Puffer:	0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1% SDS, 20% Methanol
Block-Puffer:	3% Magermilchpulver, 0,1% Tween in PBS
PBST:	PBS mit 0,1% Tween
CLZ-Puffer:	20 mM Tris/HCl pH 9,8, 1 mM Magnesiumchlorid
AP-Puffer:	100 mM Natriumchlorid, 5 mM Magnesiumchlorid, 100 mM Tris/HCl pH 9,5
NBT-Lösung:	75 mg/ml in 75% Dimethylformamid
BCIP-Lösung:	50 mg/ml in 100% Dimethylformamid
TBS-Puffer:	500 mM Natriumchlorid, 20 mM Tris/HCl pH 7,5

Entfärber:	25% Ethanol, 8% Essigsäure
Fixierlösung:	50% Methanol, 12% Essigsäure, 0,018% Formaldehyd
Waschlösung:	50% Ethanol
VB-Lösung:	0,2 g/l Natriumthiosulfat
Imprägnierlösung:	2 g/l Silbernitrat, 0,028% Formaldehyd
Entwickler:	60 g/l Natriumcarbonat, 0,018% Formaldehyd, 4 mg/l Natriumthiosulfat
Stopplösung:	50% Methanol, 12% Essigsäure
HL+-Puffer:	150 mM Natriumchlorid, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5% Igepal, 0,5% Desoxycholat, 5 mM EDTA, frisch dazu: „Complete Mini (ohne EDTA)“ Protease-Inhibitoren (Roche, Mannheim) aus einer 25× Stamm-Lösung (1 Tablette in 400 µl H ₂ O)

2.6.2. Sonstige Chemikalien und Lösungen, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Soweit im Text nicht näher angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Ca²⁺-Indikatoren wurden von der Firma MoBiTec (Göttingen) bezogen. Toxine, die bei elektrophysiologischen und Ca²⁺-Imaging-Experimenten eingesetzt wurden, wurden von der Firma Biotrend (Köln) bezogen. Allgemeine Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht) und VWR (Ismaning) bezogen. Die Hersteller spezieller Verbrauchsmaterialien und der verwendeten Geräte sind im laufenden Text angegeben.

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in zwei Hauptschwerpunkte, zum einen in die Untersuchung der physiologischen Funktion von PrP^C und zum anderen in die Untersuchung der Kinetik der Neurodegeneration bei PrP^{Sc}-infizierten Mäusen.

3.1. Untersuchung der physiologischen Funktion von PrP^C an *Prnp*^{-/-}-Mäusen

3.1.1. Elektrophysiologische Analyse der späten Nachhyperpolarisation

Die vorwiegend synaptische Lokalisation von PrP^C legte schon früh die Vermutung nahe, dass die Funktion des Prion-Proteins bei der synaptischen Übertragung zu suchen sei (Hermes et al. 1999). Diese Sicht wurde bestärkt durch die Tatsache, dass *Prnp*^{-/-}-Mäuse verschiedene neurologische und elektrophysiologische Phänotypen aufwiesen (siehe Kapitel 1.3.5; S.17). Der konsistenteste beobachtete elektrophysiologische Phänotyp, der in verschiedenen unabhängig generierten *Prnp*^{-/-}-Mauslinien reproduziert werden konnte, ist die Verminderung der späten Nachhyperpolarisation (sI_{AHP} , engl.: slow afterhyperpolarization current) in CA1-Neuronen des Hippocampus der Maus (Colling et al. 1996; Mallucci et al. 2002; Asante et al. 2004). Da die Auswirkung des Verlusts von PrP^C in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte, wurde dieser Phänotyp als Ausgangspunkt der weiteren Analysen gewählt. Um die Aussagekraft des Befunds der verminderten Nachhyperpolarisation bei der *Prnp*^{-/-}-Maus zu überprüfen, wurde versucht das Ergebnis zu reproduzieren. In den vorangegangenen Arbeiten wurde zur Messung der sI_{AHP} die Current-Clamp-Methode verwendet, die es nicht erlaubt, Zellen auf ein bestimmtes Membranpotenzial zu klemmen und Amplituden von Strömen verlässlich zu messen. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Voltage-Clamp-Methode benutzt, die eine exakte Messung von Stromamplituden ermöglicht (siehe Kapitel 2.2, 2.2.5; S.47, 52). Abb. 19A zeigt den typischen Verlauf einer AHP-Messung. Nach Beendigung der Depolarisation von 200 ms findet man den schnellen und kurzen Ausstrom von K⁺ bedingt durch den I_{AHP} Strom. Daran anschließend beginnt der langsame zweite K⁺-Ausstrom, der den sI_{AHP} Strom ausmacht (Abb. 19). Vergleicht man nun die I_{AHP} und sI_{AHP} Amplituden von *Prnp*^{-/-}- und *Prnp*^{+/+}-Mäusen, so findet man eine signifikante Verminderung der sI_{AHP} Amplitude von hippocampalen *Prnp*^{-/-}-CA1-Neuronen (*Prnp*^{-/-}: 7,7 ± 1 pA, n=31; *Prnp*^{+/+}: 14,3 ± 2,5 pA, n=29; Abb. 19D). Beim Vergleich der I_{AHP} Amplitude in CA1-Neuronen findet man eine tendenzielle Verminderung bei *Prnp*^{-/-}- 143 ± 12 pA; n=31) verglichen mit *Prnp*^{+/+}-Zellen (162 ± 15 pA; n=29) (Abb. 19C), jedoch ist diese nicht

signifikant. Außerdem wurden die Decay-Zeiten der I_{AHP} und sI_{AHP} Amplituden für Knockout- und Wildtyp-CA1-Neurone verglichen. Der I_{AHP} Strom wies ein Tau von 83 ± 8 ms für $Prnp^{-/-}$ (n=19) und 85 ± 7 ms für $Prnp^{+/+}$ (n=17) auf. Der Decay des I_{AHP} Stroms war also unverändert. Ebenso wurde kein statistisch signifikanter Unterschied im sI_{AHP} Decay zwischen $Prnp^{-/-}$ ($1,2 \pm 0,4$ sec; n=16) und $Prnp^{+/+}$ -CA1-Neuronen ($1,5 \pm 0,4$ sec; n=17) festgestellt. Die gefundenen Decay-Zeiten und Amplitudenwerte für I_{AHP} und sI_{AHP} von Wildtyp-CA1-Neuronen entsprechen den aus der Literatur bekannten Werten (Krause et al. 2002).

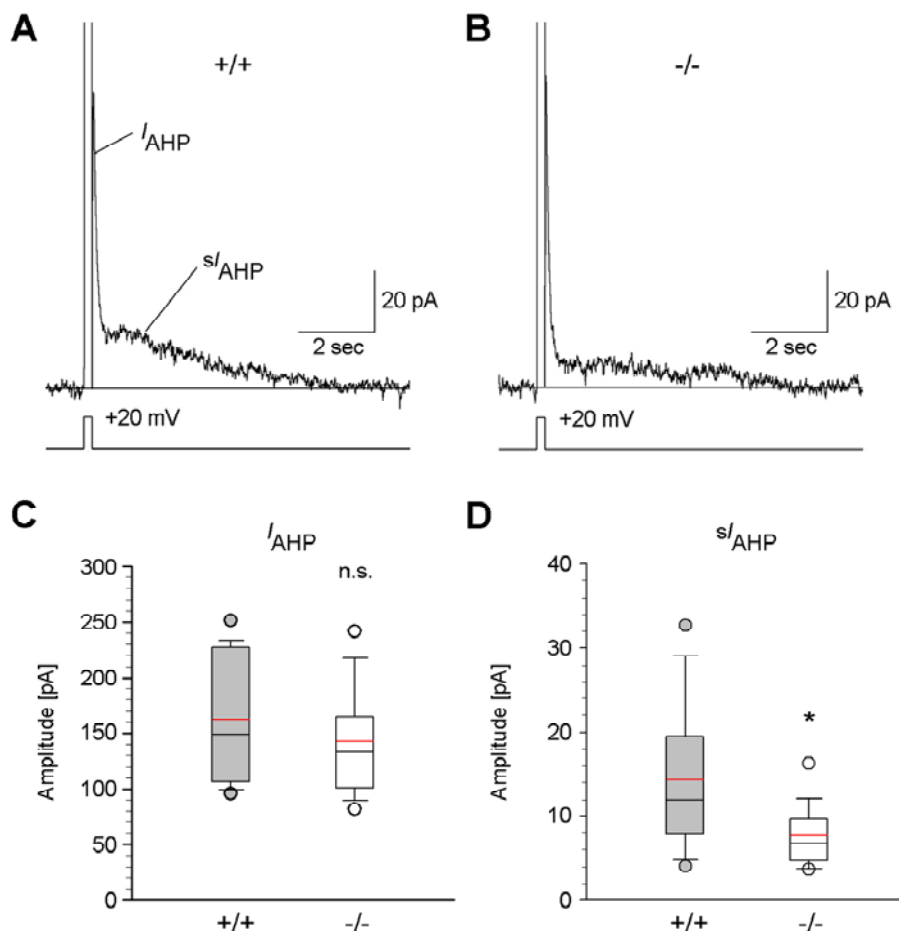


Abb. 19: Verminderte sI_{AHP} Ströme in Hippocampus- $Prnp^{-/-}$ -CA1-Neuronen

(A, B) Repräsentative AHP-Ströme von $Prnp^{+/+}$ - ($+/+$, A) und $Prnp^{-/-}$ -Hippocampus-CA1-Neuronen ($-/-$, B). Direkt nach dem Stimulationsartefakt findet der I_{AHP} Strom statt, gefolgt vom langsameren sI_{AHP} Strom. Die AHP Ströme wurden induziert durch eine 200 ms dauernde Depolarisation der Zelle von -60 mV auf $+20$ mV. (C, D) Boxplot-Diagramme der I_{AHP} und sI_{AHP} Stromamplituden von $Prnp^{+/+}$ - ($+/+$, n=29) und $Prnp^{-/-}$ -CA1-Neuronen ($-/-$, n=31). Die I_{AHP} Amplituden zeigten keine signifikanten Unterschiede (C), während die sI_{AHP} Stromamplituden von $Prnp^{-/-}$ -CA1-Neuronen signifikant vermindert waren im Vergleich zu $Prnp^{+/+}$ (n.s.: $P > 0,05$, *: $P < 0,05$; Student's t test). (C, D) Boxplot-Diagramme enthalten 10, 25, 75 und 90% Perzentilen; roter Balken: Mittelwert; schwarzer Balken: Median.

3.1.2. Fluorimetrische Ca^{2+} -Messung bei der späten Nachhyperpolarisation

Die Bestätigung des Phänotyps des verminderten sI_{AHP} Stroms bei $Prnp^{-/-}$ -CA1-Neuronen führte zu der Frage, was die Ursache für diesen Phänotyp sein könnte. Dabei könnte sich der Verlust von PrP^{C} zum Beispiel direkt auf die Leitfähigkeit der K^+ -Kanäle auswirken, die den sI_{AHP} Strom verursachen. Da I_{AHP} und sI_{AHP} Ströme beide direkt abhängig von Ca^{2+} sind, liegt aber die Hypothese nahe, dass eine Verminderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ die Verminderung der sI_{AHP} Ströme bedingen kann. Um dies genauer zu untersuchen, wurden CA1-Neurone von Knockout- und Wildtyp-Mäusen über die Patch-Pipette mit dem Ca^{2+} -Indikator CG-5N beladen (Kapitel 2.3.1; S.54). Anschließend wurde dasselbe Stimulationsprotokoll wie bei der Messung der I_{AHP} und sI_{AHP} Ströme verwendet und gleichzeitig die Änderung der Fluoreszenzintensität des Ca^{2+} -Indikators aufgezeichnet. Die Änderung der Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$. In Abb. 20 ist ein mit CG-5N beladenes CA1-Neuron dargestellt. Der Vergleich von $Prnp^{-/-}$ - und $Prnp^{+/+}$ -CA1-Neuronen hinsichtlich der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ ergab eine Verminderung der maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ nach Depolarisation bei $Prnp^{-/-}$ (+/+ : $13,6 \pm 1,1\%$, $n=31$; -/- : $9,8 \pm 1\%$, $n=32$; Abb. 20C). Keinen Unterschied ergab die Analyse der Decay-Zeiten des Ca^{2+} -Signals (+/+ : $3,2 \pm 0,3$ sec, $n=31$; -/- : $3,4 \pm 0,3$ sec, $n=29$; Abb. 20D). Um herauszufinden, ob vornehmlich der Einstrom über die Plasmamembran durch den Verlust von PrP^{C} beeinträchtigt wird, wurden die konvokalen Bilder der Ca^{2+} -Indikator-Intensitätsänderungen genauer analysiert. EILERS und Kollegen (Eilers et al. 1995) hatten eine ähnliche Methode bereits angewendet und den Ca^{2+} -Transienten in einer Membran-Schale und einer Zytosol-Schale analysiert. Abb. 21A zeigt die Lagerung der Membran-Schale im Vergleich zur Zytosol-Schale und eine konfokale mikroskopische Aufnahme eines CA1-Neurons im Verlauf einer Stimulation. Die Falschfarbendarstellung entspricht dem Intensitätsprofil des Ca^{2+} -Indikators, die proportional zur intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist. Der zeitliche Verlauf des Ca^{2+} -Transienten der Membran-Schale (Decay: $1,9 \pm 0,1$ sec) ist schneller als der der Zytosol-Schale (Decay: $3,4 \pm 0,3$ sec). Der Ca^{2+} -Transient der Membran-Schale spiegelt hauptsächlich den Einstrom von Ca^{2+} durch VGCCs und die Diffusion von Ca^{2+} zu mehr somatisch gelegenen Regionen wider. Dem langsamen Ca^{2+} -Transienten der Zytosol-Schale liegt im Wesentlichen der Ca^{2+} -Abtransport durch Ca^{2+} -Pumpen und Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher sowie die Bindung von Ca^{2+} an endogene Puffer mit hoher Affinität zugrunde (Eilers et al. 1995). Bei der Messung wurde der Ca^{2+} -Ladungstransfer (charge transfer: CT) für die Membran-Schale (CT_{Mem}) und die Zytosol-Schale (CT_{Cyt}) bestimmt. Der Wert für CT berechnet sich aus der Fläche, die unter dem Ca^{2+} -Transienten gemessen wird. $Prnp^{-/-}$ -CA1-Neurone zeigten einen verminderten

CT_{Cyt} ($4,8 \pm 0,7$, n=30; 4 Tiere) im Vergleich zu *Prnp*^{+/+} ($7,9 \pm 0,8$; n=31, 4 Tiere; $P < 0,005$; Abb. 21E). Ebenso war der Wert für CT_{Mem} vermindert von $12,3 \pm 1,4$ (*Prnp*^{+/+}, n=31, 4 Tiere) auf $8,4 \pm 1,2$ (*Prnp*^{-/-}, n=30, 4 Tiere; $P < 0,05$; Abb. 21D).

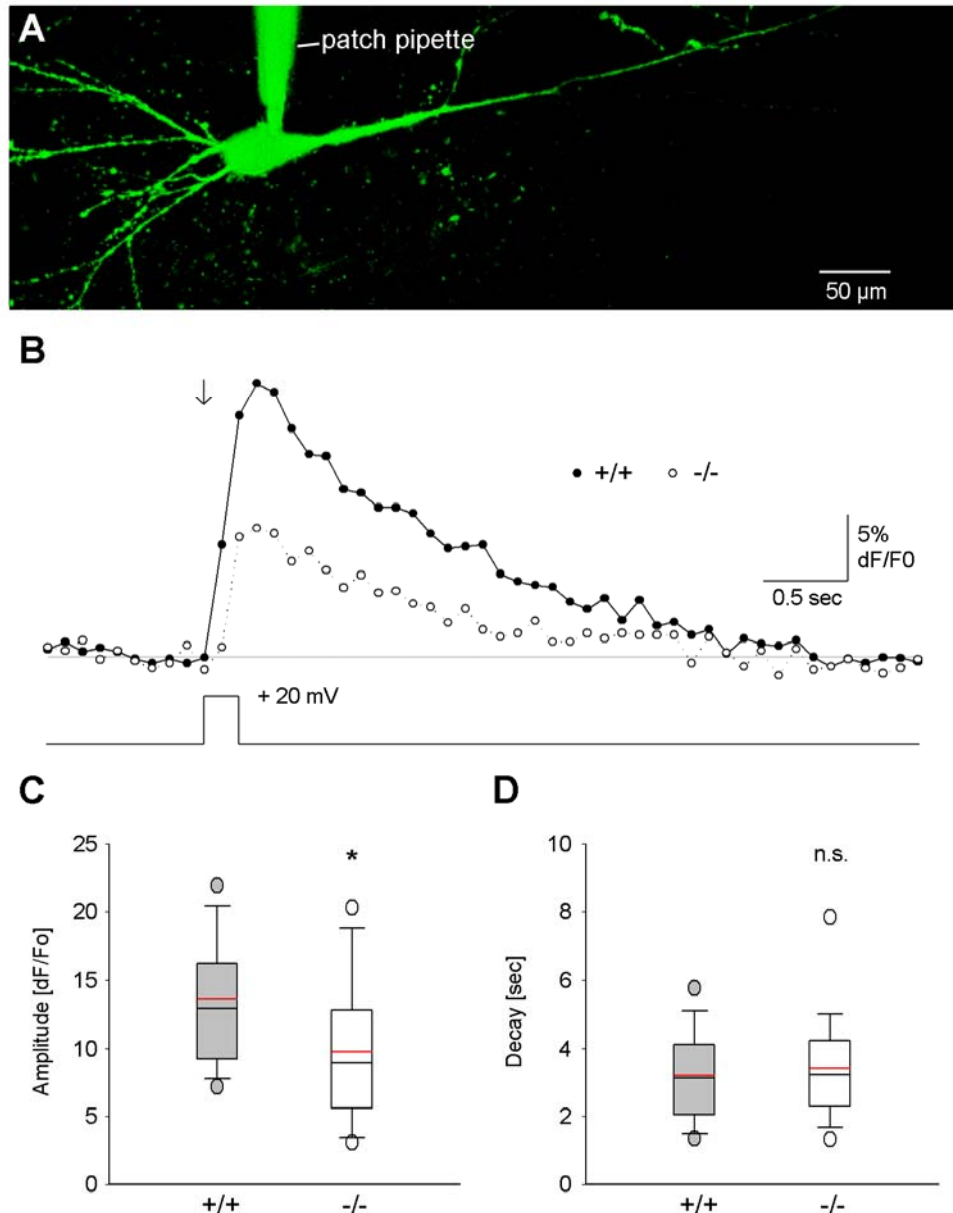


Abb. 20: Verminderte freie Ca^{2+} -Konzentration im Soma von *Prnp*^{-/-}-CA1-Neuronen

(A) Beispielaufnahme eines Ca^{2+} -Indikator-gefüllten CA1-Neurons im vitalen Hippocampus-Schnitt einer 18 Tage alten Maus. **(B)** Repräsentative somatische Ca^{2+} -Transiente von *Prnp*^{+/+}- (ausgefüllte Kreise) und *Prnp*^{-/-}-Hippocampus-CA1-Neuronen (offene Kreise). Die Zellen wurden über die Patch-Pipette für 200 ms depolarisiert vom Haltepotenzial (-60 mV) auf +20 mV (Pfeil). **(C, D)** Boxplot-Diagramme der Maximalamplituden und Decay-Zeiten von Wildtyp- (n=31) und *Prnp*^{-/-}-Neuronen (n=29). Die Ca^{2+} -Amplituden von *Prnp*^{-/-}-Hippocampus-CA1-Neuronen sind im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen signifikant vermindert (+/+ : $13,6 \pm 1,1\%$, n=31; -/- : $9,8 \pm 1\%$, n=32). Kein Unterschied wurde beim Vergleich der Decay-Zeiten festgestellt (+/+ : $3,2 \pm 0,3$ sec, n=31; -/- : $3,4 \pm 0,3$ sec, n=29). Boxplot-Diagramme enthalten 10, 25, 75 und 90% Perzentilen; roter Balken: Mittelwert; schwarzer Balken: Median (* $P < 0,05$; n.s. $P > 0,05$ Student's *t* test).

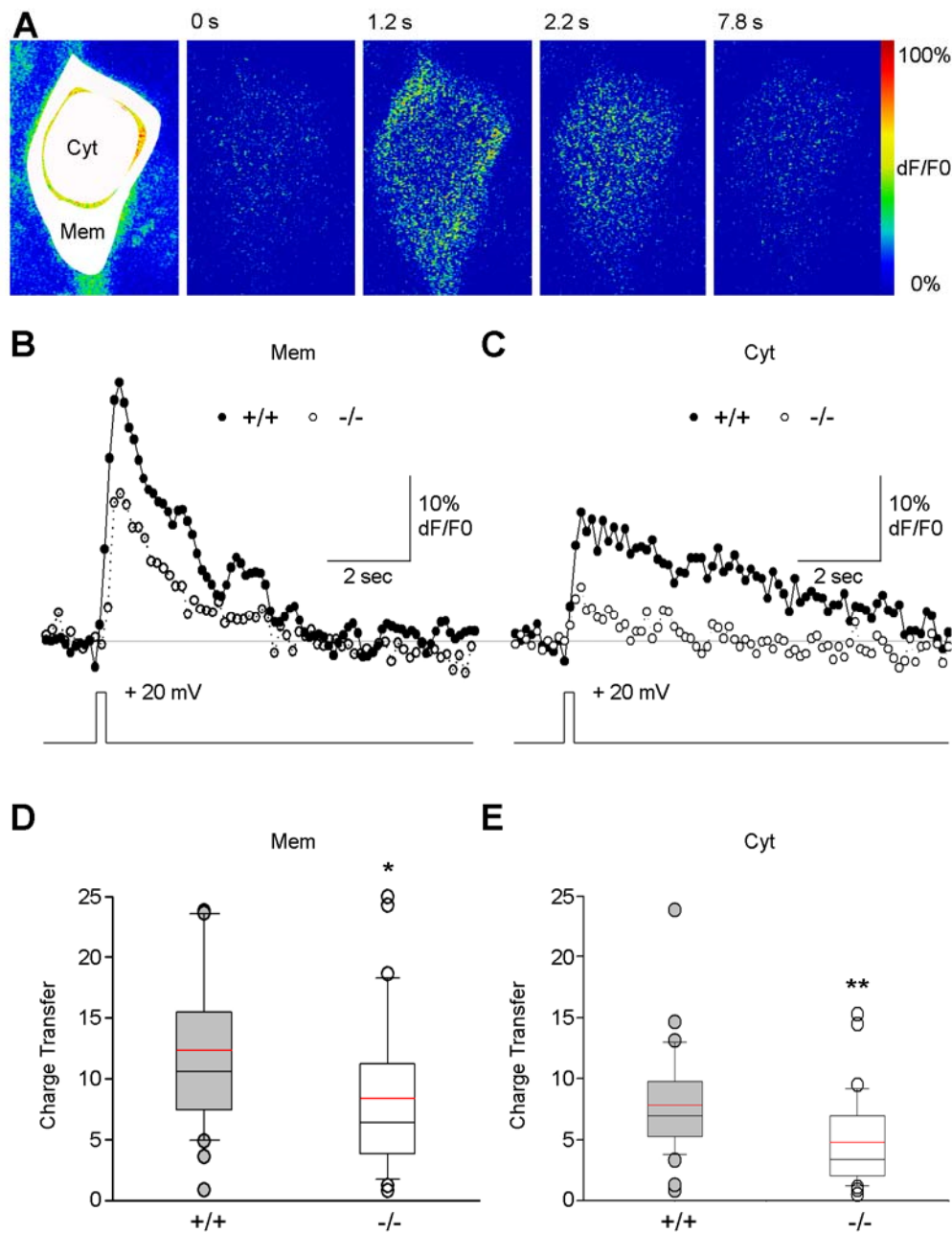


Abb. 21: CT_{Mem} und CT_{Cyt} sind vermindert bei *Prnp*^{-/-}-CA1-Neuronen

(A) Typische mit konfokaler Mikroskopie aufgenommene Zeitserie der Änderung der Fluoreszenzintensität eines Ca²⁺-Indikator-gefüllten Somas eines CA1-Neurons im Hippocampus. Die zeitliche Änderung der Ca²⁺-Konzentration wurde in den Kompartimenten Zytosol-Schale (Cyt) und Membran-Schale (Mem) gemessen. Nach der Depolarisation (200 ms) detektiert man ein zirkuläres Membran-assoziiertes Signal bei 1,2 sec. Bilder von späteren Zeitpunkten zeigen ein vornehmlich zytosolisches Signal (2,2 und 7,8 sec). (B, C) Repräsentative Ca²⁺-Transiente von *Prnp*^{+/-}- versus *Prnp*^{-/-}-CA1-Neurone (-/-) in den verschiedenen Kompartimenten Mem und Cyt. (D, E) Ca²⁺-Ladungstransfer (CT, engl.: charge transfer), der sich aus der Fläche unter dem Transienten berechnet. *Prnp*^{-/-}-CA1-Neurone (-/-; n=30) zeigen signifikant verminderte CT_{Mem} und CT_{Cyt} Werte gegenüber Wildtyp (+/+; n=31). (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$ Student's t test). Boxplot-Diagramme enthalten 10, 25, 75 und 90% Perzentilen; roter Balken: Mittelwert; schwarzer Balken: Median.

3.1.3. IP3-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER

Die verminderten Ca^{2+} -Ladungstransfers CT_{Mem} und CT_{Cyt} , die bei der Untersuchung von CA1-Neuronen in *Prnp*^{-/-}-Mäusen gefunden wurden, deuteten sowohl auf einen verminderten Ca^{2+} -Einstrom über die Membran hin, als auch auf eine verminderte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration. Eine mögliche Ursache für die verminderte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration stellt die verminderte Ausschüttung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern wie dem ER dar. Weil die IP3-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER von Purkinjezellen am besten untersucht und verstanden ist, und weil in Purkinjezellen von *Prnp*^{-/-}-Mäusen auch eine verminderte späte Nachhyperpolarisation nachgewiesen werden konnte (Herms et al. 1995), wurde ergänzend die IP3-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER an Purkinjezellen von *Prnp*^{-/-}- und *Prnp*^{+/+}-Mäusen analysiert. Die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER von Purkinjezellen ist gesichert untersucht (Takechi et al. 1998; Finch und Augustine 1998) und wurde deshalb als Modellsystem herangezogen.

Wie unter 2.3.2 (S.55) beschrieben, wurden mit Hilfe der Parallelfaserstimulation physiologische Mengen Glutamat an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse freigesetzt. In Abb. 22A ist exemplarisch eine Purkinjezelle dargestellt, die mit dem Ca^{2+} -Indikator Oregon Green Bapta-1 (OGB-1) über die Patch-Pipette beladen wurde. Die Ausschnittsvergrößerung im rechten unteren Bildteil zeigt den stimulierten Bereich. Hier wurde an einem Dendriten mit anhängenden Spines ein „Line-Scan“ durchgeführt (Abb. 22B). Die zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität ist im Diagramm Abb. 22C dargestellt. Das biphasische Signal setzt sich aus einem initialen Ca^{2+} -Einstrom durch AMPA-Rezeptoren und einem verzögerten Ausstrom von Ca^{2+} aus dem ER zusammen. Bei Stimulation der Purkinjezelle unterhalb des Schwellenwerts zur Auslösung eines Aktionspotenzials führt die Glutamatbindung an AMPA- und metabotrope Glutamat-Rezeptoren (mGluR) zu dem beschriebenen lokalen biphasischen Ca^{2+} -Signal in Dendriten und Spines (Abb. 22A, B, C). Der Vergleich der durch AMPA-Ströme bedingten Ca^{2+} -Amplitude für Purkinjezellen von *Prnp*^{-/-}- ($72 \pm 14\%$; n=7) und *Prnp*^{+/+}-Mäusen ($89 \pm 9\%$; n=8) ergab keinen signifikanten Unterschied (Abb. 22E). Ebenso war die IP3-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER von Purkinjezellen von *Prnp*^{-/-}- ($115 \pm 13\%$; n=7) und *Prnp*^{+/+}-Mäusen ($137 \pm 14\%$; n=8) unverändert (Abb. 22F).

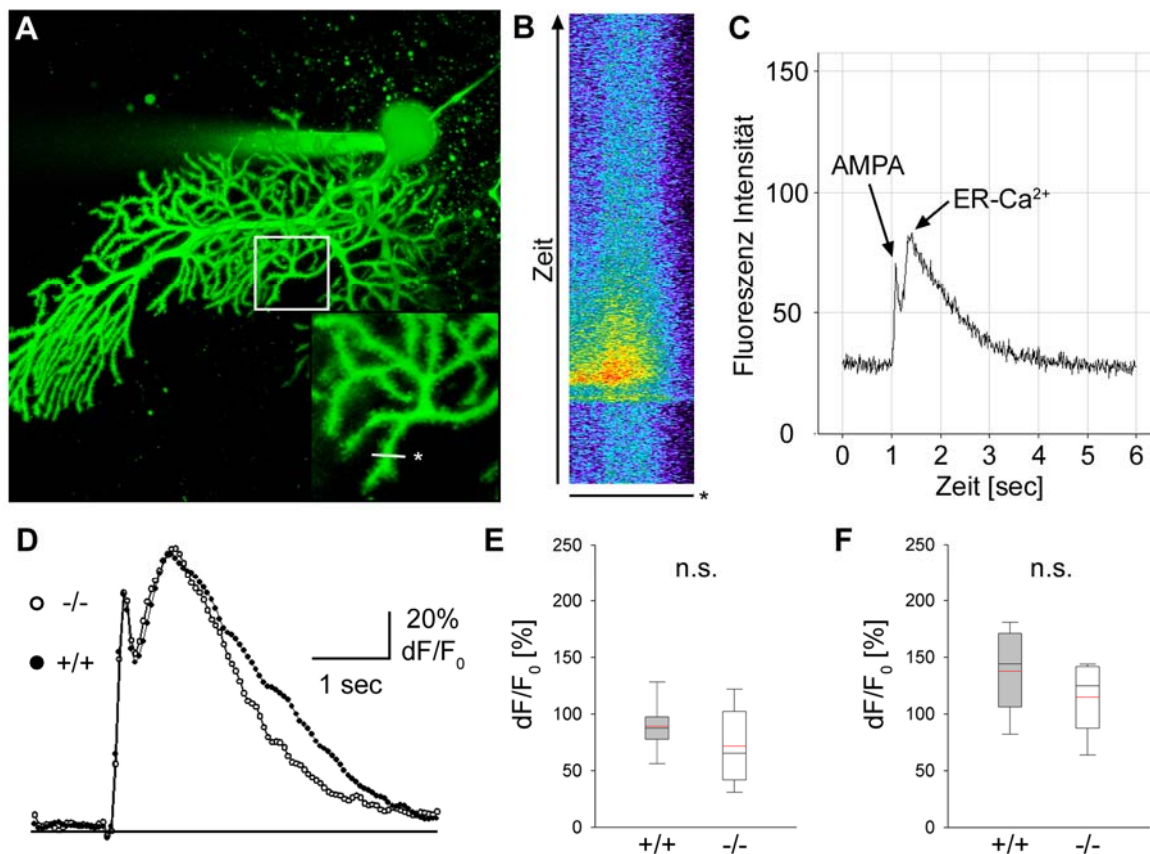


Abb. 22: Unveränderte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER von Purkinjezellen

(A) Purkinjezelle, die mit dem Ca^{2+} -Indikator OGB-1 über die Patch-Pipette beladen wurde. In der unteren rechten Bildecke ist eine Ausschnittsvergrößerung gezeigt. Der Stern (*) zeigt die Stelle an, wo ein schneller Line-Scan durchgeführt wurde. (B) Falschfarbencodierte Änderung der Fluoreszenzintensität über die Zeit, während des Line-Scans (*). (C) Mittlere Fluoreszenzintensität des Line-Scans über die Zeit. Man sieht das biphasische Signal, mit initialem Ca^{2+} -Einstrom durch AMPA-Rezeptoren und das zeitlich verzögerte Freisetzen von Ca^{2+} aus dem ER. (D) Repräsentative Verläufe IP3-vermittelter Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER von Purkinjezellen von Wildtyp- (+/+) und *Prnp*^{-/-}-Purkinjezellen (-/-). (E, F) Boxplot-Diagramme zum Vergleich der Maximalamplituden der AMPA (E) und IP3-vermittelten (F) Ca^{2+} -Freisetzung bei *Prnp*^{+/-}- (AMPA: $89 \pm 9\%$; IP3: $137 \pm 14\%$; n=8) versus *Prnp*^{-/-}-Purkinjezellen (AMPA: $72 \pm 14\%$; IP3: $115 \pm 13\%$; n=7). (n.s. $P > 0,05$ Student's *t* test). Boxplot-Diagramme enthalten 10, 25, 75 und 90% Perzentilen; roter Balken: Mittelwert; schwarzer Balken: Median.

3.1.4. Elektrophysiologische Analyse von VGCCs

Da die Untersuchung der IP3-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER von Purkinjezellen keine Hinweise lieferte, dass der Verlust von PrP^C einen Einfluss auf diese Prozesse hat, wurde nun der zweite Aspekt, nämlich der Einstrom von Ca^{2+} über die Membran, genauer untersucht. Ca^{2+} , das nach Depolarisation in die Zelle gelangt, strömt zum größten Teil über spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (VGCCs) ein (siehe Kapitel 1.6; S.26). SK-Kanäle, die für den I_{AHP} Strom verantwortlich sind, liegen räumlich eng benachbart zu L-Typ-VGCCs (Marrion und Tavalin 1998). Durch VGCCs einströmendes Ca^{2+} bindet an Calmodulin (CaM), das konstitutiv und Ca^{2+} -unabhängig an SK-Kanäle gebunden ist. Die Bindung von

Ca^{2+} führt zu einer Konformationsänderung des SK-Kanals, so dass dieser sich öffnet (Stocker 2004). Eine Verminderung des Ca^{2+} -Einstroms durch L-Typ-VGCCs könnte also direkt zu einer Verminderung der I_{AHPS} und sI_{AHPS} führen. Um diese Hypothese zu testen, wurde der Ca^{2+} -Einstrom durch VGCCs an CA1-Neuronen analysiert. Bei der Messung des Ca^{2+} -Einstroms durch VGCCs muss sichergestellt sein, dass keine anderen spannungsaktivierten Leitfähigkeiten zum gemessenen Strom beitragen. Spannungsaktivierte Na^{2+} -Kanäle, über die ein relevanter Na^{+} -Einstrom bei Depolarisation fließen könnte, werden mit Hilfe des Kugelfischgifts TTX blockiert. Außerdem wird durch den Einsatz von Na^{+} -freier IZL und EZL verhindert, dass überhaupt Na^{2+} -Ionen zur Verfügung stehen. Wie in Kapitel 1.6 (S.26) bereits beschrieben, gibt es verschiedene VGCCs, die man nur pharmakologisch unterscheiden kann. Den L-Typ-Anteil am Gesamtstrom der VGCCs kann man ermitteln, indem man Nifedipin appliziert, ein spezifischer Antagonist für L-Typ-Kanäle. (Bean 1991, Kapitel 1.6, S.26). *I/V*-Verhältnisse werden bestimmt, indem das gepatchte CA1-Neuron für 200 ms vom Ruhepotenzial auf ein Haltepotenzial geklemmt wird und die maximale Stromamplitude für jedes angesteuerte Haltepotenzial bestimmt wird. Das Haltepotenzial wird dazu in 10 mV-Schritten von -80 mV auf +40 mV angehoben. Bei einem bestimmten Wert des Haltepotenzials öffnen sich dann die VGCCs und es kommt zu einem messbaren Ca^{2+} -Einstrom. Die maximale Amplitude dieses Einstroms wird bestimmt und gegen das angelegte Haltepotenzial graphisch aufgetragen. *I/V*-Verhältnisse erlauben genaue Aussagen über die Höhe der Amplitude des Stroms, verursacht durch das einströmende untersuchte Ion.

In Abb. 23 (A, B Einsätze) sind repräsentative Stromverläufe von *Prnp*^{+/+}- (Abb. 23A, Einsatz) und *Prnp*^{-/-}-CA1-Neuronen dargestellt (Abb. 23B, Einsatz). Die Applikation von Nifedipin (10 μM) reduzierte diese Ströme verlässlich (Abb. 23A, B, Einsätze). Ebenso ist die inaktivierende Komponente des Ca^{2+} -Einstroms dargestellt (Abb. 23A, ΔX). Die inaktivierende Komponente wurde ebenfalls durch Nifedipin reduziert, was auf einen L-Typ-Kanal-vermittelten Stromanteil hindeutet (Avery und Johnston 1996). Abb. 23A, B zeigt den mittleren Verlauf des Strom/Spannungs-Verhältnisses (engl.: *I/V*-relationship) von Wildtyp- und Knockout-CA1-Neuronen, mit und ohne Applikation von Nifedipin. Vergleicht man die Maximalamplituden von *Prnp*^{+/+}- mit *Prnp*^{-/-}-CA1-Neuronen, so stellt man eine deutliche Verminderung bei *Prnp*^{-/-} fest (+/+ : 1555 \pm 157 pA; n=9, 3 Tiere; -/- : 1141 \pm 101 pA; n=9, 3 Tiere; * $P < 0,05$; Student's *t* test; Abb. 23C). Die Applikation von Nifedipin führt zu einer partiellen Reduktion der Maximalamplitude auf vergleichbare Werte für *Prnp*^{+/+} (865 \pm 170 pA; n=9, 3 Tiere, Abb. 23C) und *Prnp*^{-/-} (946 \pm 60 pA; n=9, 3 Tiere; Abb. 23C, n.s. $P > 0,05$).

Es ist wichtig zu beachten, dass die prozentuale Reduktion der Maximalamplitude bei *Prnp*^{+/+}-CA1-Neuronen ($44 \pm 10\%$) signifikant höher ist, als bei *Prnp*^{-/-}-CA1-Neuronen ($17 \pm 2\%$) (* $P < 0,05$; Abb. 23D).

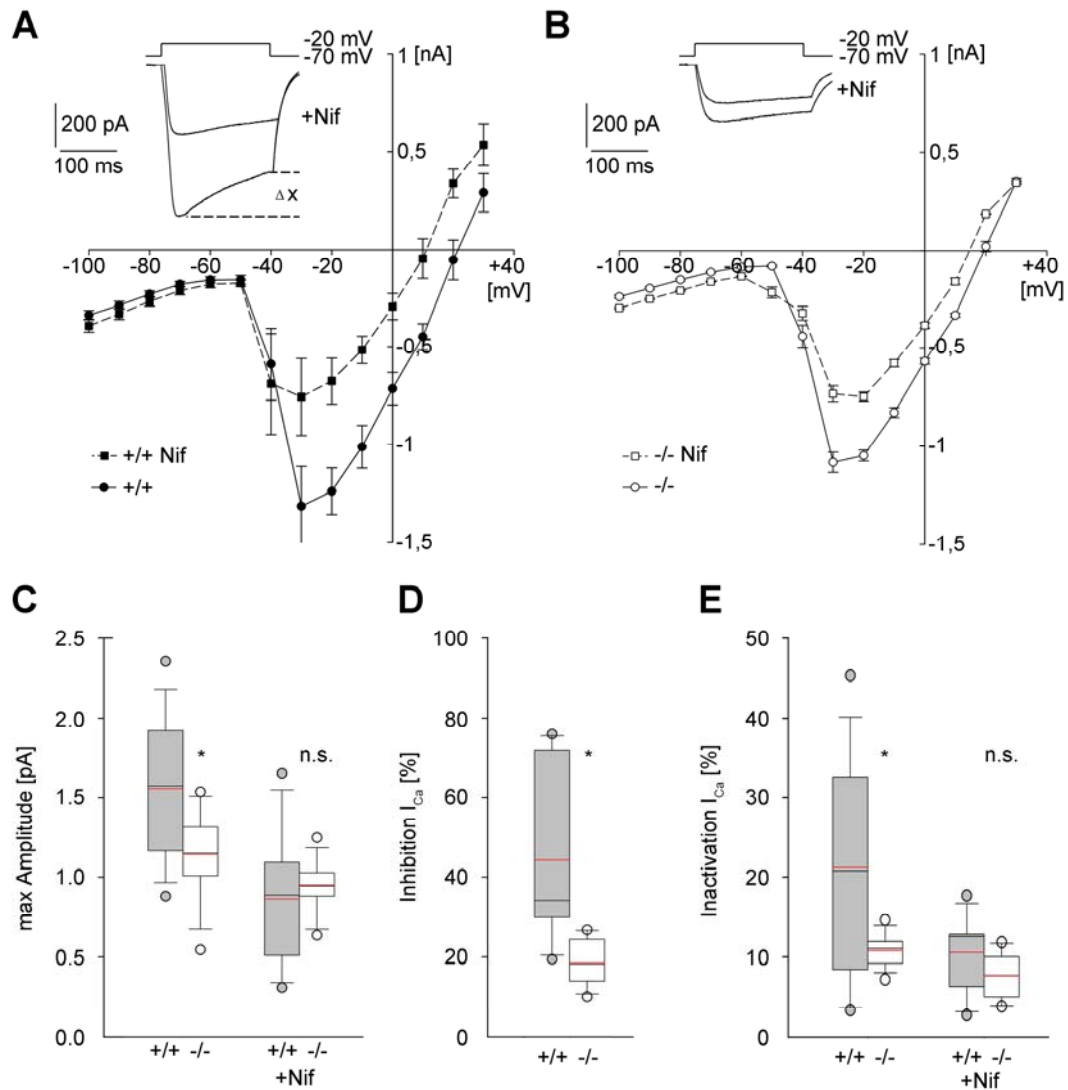


Abb. 23: Analyse der VGCCs von *Prnp*^{-/-}- und *Prnp*^{+/+}-CA1-Neuronen

(A) Mittlere I/V-Verhältnisse von *Prnp*^{+/+}-CA1-Neuronen mit (+Nif) und ohne Nifedipin (10 μ M). Einsatz: Repräsentative Ca^{2+} -Ströme durch VGCCs bei maximaler Öffnung mit und ohne Nifedipin. Die Inaktivierung der VGCCs ist bei Nifedipin-Zugabe kleiner als ohne Nifedipin (ΔX). **(B)** Mittlere I/V-Verhältnisse von *Prnp*^{-/-}-CA1-Neuronen mit und ohne Nifedipin (10 μ M). Einsatz: Repräsentative Ca^{2+} -Ströme durch VGCCs bei maximaler Öffnung mit und ohne Nifedipin. **(C)** Boxplot-Diagramm der Maximalamplituden von *Prnp*^{+/+}- (+/+) und *Prnp*^{-/-}-CA1-Neuronen (-/-) mit und ohne Nifedipin (10 μ M). **(D)** Boxplot-Diagramm der prozentualen Verminderung (Inhibition) der Maximalamplitude nach Zugabe von Nifedipin (10 μ M) bei CA1-Neuronen von *Prnp*^{+/+}- und *Prnp*^{-/-}-Tieren. **(E)** Prozentuale Inaktivierung (siehe A, ΔX) des Ca^{2+} -Stroms bei *Prnp*^{+/+}- und *Prnp*^{-/-}-CA1-Neuronen mit und ohne Nifedipin (10 μ M). Boxplot Diagramme enthalten 10, 25, 75 und 90% Perzentilen; roter Balken: Mittelwert, schwarzer Balken: Median; * $P < 0,05$, n.s. $P > 0,05$, Student's t test.

Die Analyse der Nifedipin-sensitiven inaktivierenden Komponente des Ca^{2+} -Stroms offenbarte eine signifikant kleinere inaktivierende Komponente in *Prnp*^{-/-}-CA1-Neuronen ($10,8 \pm 0,7\%$) verglichen mit *Prnp*^{+/+} ($21,2 \pm 4,5\%$) (Abb. 23E). Die Applikation von Nifedipin reduzierte die inaktivierende Komponente von *Prnp*^{-/-}-CA1-Neuronen auf $7,7 \pm 1\%$, während diese bei *Prnp*^{+/+}-CA1-Neuronen um 50% auf $10,6 \pm 1,9\%$ reduziert wurde (Abb. 23E). Diese Ergebnisse deuten auf einen verminderten Ca^{2+} -Einstrom durch L-Typ-VGCCs in *Prnp*^{-/-}-CA1-Neuronen des Hippocampus hin.

3.1.5. Protein- und mRNS-Expression von Ca^{2+} -Kanaluntereinheiten

Um zu untersuchen, ob die Ursache für den verminderten Ca^{2+} -Einstrom durch L-Typ-VGCCs durch eine verminderte Anzahl an Poren bildenden $\alpha 1\text{C}$ ($\text{CaV}1.2$; *Cacna1C*) Untereinheiten bedingt ist, wurde die mRNS-Expression dieser Kanäle in Wildtyp- und Knockout-Hippocampi untersucht. Die relative mRNS-Expression der untersuchten Gene wurde wie in Kapitel 2.5.1 (S.62) beschrieben mit quantitativer PCR bestimmt. Als Kandidaten-Gene wurden die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle *Cacna1c* und *Cacna1d* ausgewählt. Diese Kanäle werden nachweislich in somatodendritischen Kompartimenten von Hippocampus-CA1-Neuronen exprimiert (Westenbroek et al. 1990). Beim Vergleich der relativen Expressionslevel in *Prnp*^{+/+}- und *Prnp*^{-/-}-Hippocampi hinsichtlich *Cacna1c* (+/+ : $1,8 \pm 0,6$; -/- : $1,82 \pm 0,4$; $P > 0,05$; $n=3$) und *Cacna1d* (+/+ : $0,96 \pm 0,16$; -/- : $0,84 \pm 0,24$; $P > 0,05$; $n=3$) wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Abb. 24A). Außerdem wurde die mRNS-Expression der regulatorischen β -Untereinheiten untersucht, die den Membraneinbau der Poren bildenden α -Untereinheiten steuern (Catterall 2000; Dalton et al. 2005). Als Kandidaten-Gene wurden *Cacnb2-4* ausgewählt. Die relative mRNS-Expression dieser Gene war nicht signifikant verändert zwischen *Prnp*^{-/-}- und *Prnp*^{+/+}-Hippocampi: *Cacnb2* (+/+ : $1,09 \pm 0,2$; -/- : $0,95 \pm 0,2$; $P > 0,05$; $n=3$), *Cacnb3* (+/+ : $2,9 \pm 0,5$; -/- : $3,3 \pm 0,5$; $P > 0,05$; $n=3$), *Cacnb4* (+/+ : $0,23 \pm 0,03$; -/- : $0,25 \pm 0,02$; $P > 0,05$; $n=3$). Zusätzlich zur mRNS-Expressionsanalyse wurde eine Westernblot-Untersuchung zum Nachweis der Proteinexpression durchgeführt. Dazu wurde die Proteinexpression der Poren bildenden $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit und der regulatorischen $\beta 2$ -Untereinheit (*Cacnb2*) untersucht. Während die Proteinexpression der $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit unverändert war, wurde eine verstärkte Expression der $\beta 2$ -Untereinheit festgestellt (Abb. 24B $n=3$ Hippocampi für *Prnp*^{-/-} und *Prnp*^{+/+}).

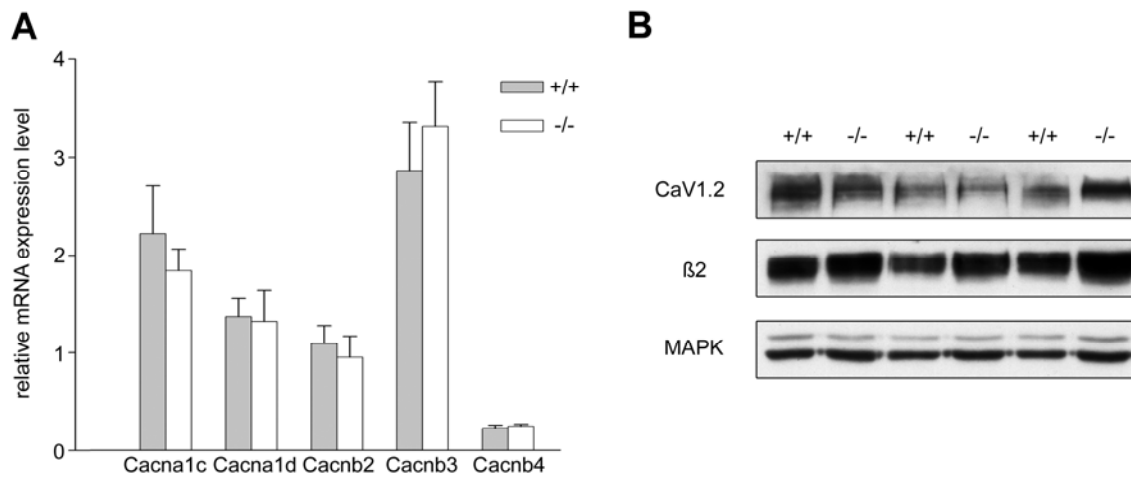


Abb. 24: mRNS und Proteinexpressionslevel der α - und β -Ca²⁺-Kanaluntereinheiten

(A) Keine signifikanten Unterschiede der relativen mRNS-Expression von *Cacna1c*, *Cacna1d* und *Cacnb2-4* Genen zwischen Wildtyp- (+/+) und Knockout-Hippocampus-Gewebe (-/-). **(B)** Westernblot Analyse der korrespondierenden Hemisphären aus (A) hinsichtlich der Proteinexpression von CaV1.2 (α 1C) und β 2 (β 2) für *Prnp*^{+/+} und *Prnp*^{-/-}. MAPK (engl.: mitogen activated protein kinase) wurde als Ladekontrolle verwendet. Während die CaV1.2 Proteinexpression unverändert ist, findet man einen höheren Anteil an β 2-Untereinheiten im Hippocampus von *Prnp*^{-/-}-Mäusen.

3.2. In vivo 2-Photonen Analyse der Kinetik der Neurodegeneration bei Scrapie

Neurone weisen an Dendriten kleine Fortsätze mit einer Größe von 1-3 μm auf. Diese pilzartigen, an einen Türknauf erinnernden Fortsätze stellen den postsynaptischen Teil einer Synapse dar und werden Spine genannt. Der korrespondierende präsynaptische Teil wird häufig „Bouton“ (franz.: Knospe) genannt und stellt das Ende von Axonen dar. Obwohl die genaue Funktion von Spines nicht geklärt ist, spielen sie vermutlich eine besondere Rolle bei der Kommunikation zwischen Neuronen und bei der Aufrechterhaltung neuronaler Verbindungen (Calabrese et al. 2006). Eine wachsende Anzahl an Studien untersucht die Prozesse der Spine-Plastizität während der Embryonalentwicklung und im Erwachsenenalter im Kortex der Maus mit Hilfe der 2-Photonen *in vivo* Mikroskopie (Grutzendler et al. 2002; Trachtenberg et al. 2002; Holtmaat et al. 2005; Zuo et al. 2005; Majewska et al. 2006). Darüber hinaus wurde zusätzlich zur Spine-Plastizität auch die strukturelle Plastizität von Axonen über Zeiträume von bis zu 9 Monaten intravitalmikroskopisch untersucht. (De Paola et al. 2006). Im Vergleich dazu ist die Anzahl an Studien, die strukturelle Plastizität von postsynaptischen Spines oder präsynaptischen axonalen Endigungen im Verlauf von neurodegenerativen Erkrankungen untersuchen, bis jetzt relativ klein. Als Ursache dafür ist wohl die extrem aufwendige Technik der Intravitalmikroskopie zu sehen (siehe Kapitel 1.9, 2.1; S.34, 39), gepaart mit den relativ langen Wartezeiten bis zum Ausbruch der Krankheit, die neurodegenerative Erkrankungen auch in Tiermodellen aufweisen. TSAI analysierte die Spine-Dichte und die Morphologie von Neuritenästen in der Nachbarschaft von Alzheimer-Plaques. Dabei stellte sie Spine-Verlust an Neuritenästen, die durch Plaques verliefen, gepaart mit Dendritenbrüchen fest (Tsai et al. 2004). Außerdem fanden sie eine erhöhte Anzahl Varikositäten in der Nähe von Alzheimer-Plaques und postulierten, dass diese wohl axonalen Ursprungs seien. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Untersuchung eines anderen Alzheimer-Tiermodells erzielt (Spires et al. 2005). Beide Studien beschränken sich jedoch auf die Analyse struktureller Plastizität von Spines und Dendriten in der Nachbarschaft von Amyloid-Plaques und lassen die Untersuchung der Plastizität in Hirnregionen ohne Plaques aus. Um einen besseren Einblick in die strukturelle Plastizität von neuronalen Schaltkreisen im Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen zu bekommen, wurde die strukturelle Plastizität von Spines und Dendriten im Verlauf der Prionerkrankung untersucht. Zu diesem Zweck wurden 8 Wochen alte Mäuse, die in kortikalen Layer-5-Neuronen YFP exprimierten (Feng et al. 2000), intrazerebral mit Prionen des RML-Stamms infiziert (siehe Kapitel 2.5.4, S.65). Zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion von der präsymptomatischen (90-120 dpi) bis zur

symptomatischen (120-160 dpi) Phase der Erkrankung wurden kraniale Fenster über dem rechten somatosensorischen Kortex implantiert, so dass dieselben dendritischen Elemente und Spines über Zeiträume von drei Stunden bis zu zwei Monaten wiederholt intravitalmikroskopisch untersucht werden konnten.

3.2.1. Analyse der Kurzzeit-Plastizität von Spines und Dendriten 100 versus 130 dpi

Phänomene der Kurzzeit-Plastizität wurden bereits erfolgreich mit Hilfe von *in vitro* Modellsystemen analysiert (Tada und Sheng 2006). LTP (Long term potentiation) induziert zum Beispiel das Anschwellen von Spines, im Gegensatz dazu verursacht LTD (Long term depression) das Schrumpfen von Spines. Diese gegenteiligen Effekte werden vermittelt durch Aktin-Polymerisation und -Depolymerisation (Okamoto et al. 2004).

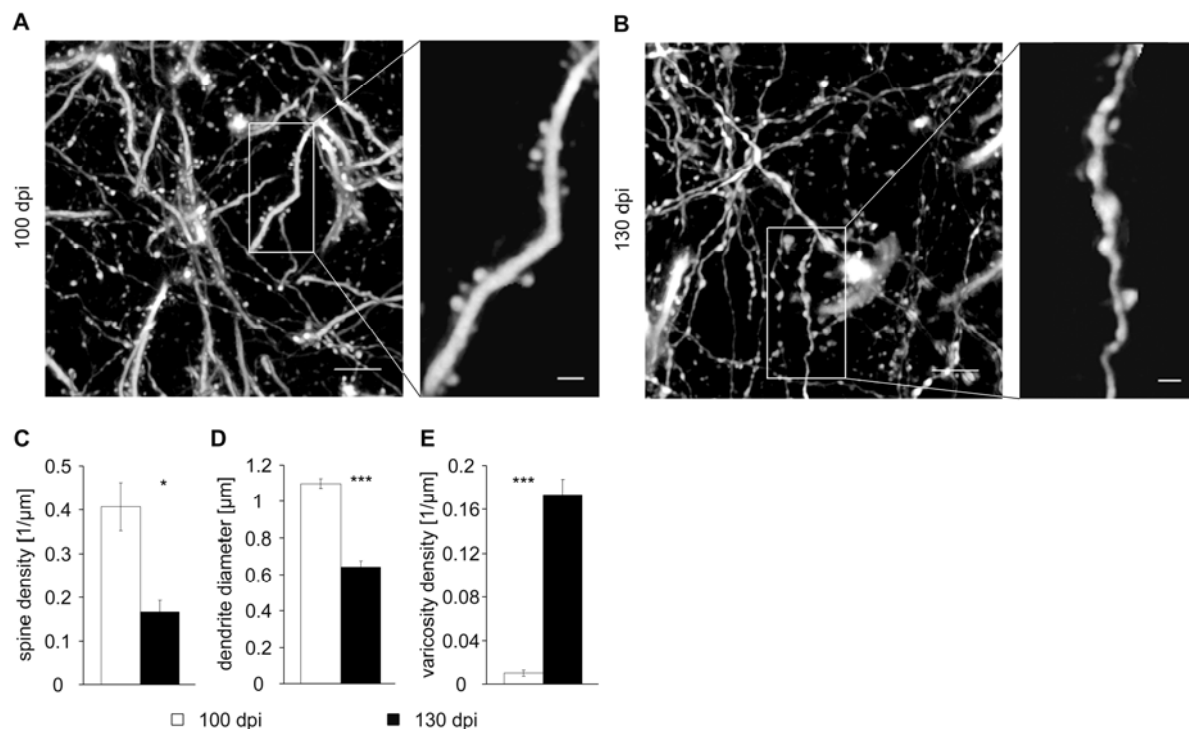


Abb. 25: Typische Spine- und Dendriten-Veränderungen in Scrapie-infizierten Mäusen

(A, B) Repräsentative Bilder von apikalen Dendriten und anhängenden Spines von präsymptomatischen (100 dpi) und symptomatischen (130 dpi) Scrapie-infizierten YFP-exprimierenden Mäusen. Die Bilder wurden mit Hilfe der 2-Photonen *in vivo* Mikroskopie aufgenommen. Im Gegensatz zu den intakten Dendriten und Spines bei präsymptomatischen Mäusen, zeigen symptomatische Mäuse Spine-Verlust und eine Erhöhte Anzahl von Schwellungen an Dendriten (Varikositäten). (C) Die mittlere Spine-Dichte [$1/\mu\text{m}$ Dendriten Länge] ist bei symptomatischen im Vergleich zu präsymptomatischen Mäusen signifikant reduziert (100 dpi: $0,4 \pm 0,05 \mu\text{m}^{-1}$; 130 dpi: $0,17 \pm 0,03 \mu\text{m}^{-1}$; $n=6$ Tiere, 3029 Spines, * $P < 0,05$ Student's *t* test). (D) Scrapie-infizierte Mäuse in der symptomatischen Phase weisen Dendriten mit einem verminderten Durchmesser [μm] auf (100 dpi: $1,1 \pm 0,03 \mu\text{m}$; 130 dpi: $0,64 \pm 0,04 \mu\text{m}$; $n=6$ Tier, *** $P < 0,001$ Student's *t* test). (E) Während der präsymptomatischen Phase weisen Dendriten weniger Varikositäten auf als in der symptomatischen Phase (100 dpi: $0,009 \pm 0,002 \mu\text{m}^{-1}$; 130 dpi: $0,17 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$; $n=6$ Tiere, *** $P < 0,001$ Student's *t* test). Größenmaßstab: (A, B): $10 \mu\text{m}$; Einsatz: $2 \mu\text{m}$.

Um herauszufinden, ob es im Verlauf der Prionerkrankung zu kurzzeitigen strukturellen Veränderungen an Spines und Dendriten kommt, wurde die Kurzzeit-Plastizität an präsymptomatischen (100 dpi) und symptomatischen (130 dpi) Scrapie-infizierten Mäusen intravitalmikroskopisch untersucht. In Abb. 25A ist ein repräsentatives, mit 2-Photonen *in vivo* Mikroskopie aufgenommenes Bild von unversehrten Dendriten und Spines während der präsymptomatischen Phase der Prionerkrankung (100 dpi) dargestellt. Im Vergleich dazu zeigt Abb. 25B die typischen Veränderungen von Dendriten und Spines in der symptomatischen Krankheitsphase (130 dpi). Die Dendriten besitzen weniger Spines und zeigen vermehrt Schwellungen, die Varikositäten genannt werden. Tiere in der symptomatischen Krankheitsphase wiesen eine signifikant verminderte Spine-Dichte pro Mikrometer Dendritenlänge gegenüber präsymptomatischen Tieren auf (Abb. 25C; 100 dpi: $0,4 \pm 0,05 \mu\text{m}^{-1}$; 130 dpi: $0,17 \pm 0,03 \mu\text{m}^{-1}$; $n=6$ Tiere, 3029 Spines, $P < 0,05$). Zusätzlich zur verminderten Spine-Dichte findet man bei Scrapie-infizierten Mäusen in der symptomatischen Krankheitsphase signifikant kleinere mittlere Dendriten-Durchmesser (Abb. 25D; 100 dpi: $1,1 \pm 0,03 \mu\text{m}$; 130 dpi: $0,64 \pm 0,04 \mu\text{m}$; $n=6$ Tiere, $P < 0,001$). Tiere in der präsymptomatischen Krankheitsphase zeigten nur wenige Varikositäten. Im Gegensatz dazu hatten Tiere in der symptomatischen Krankheitsphase eine signifikant erhöhte Varikositäten-Dichte (Abb. 25E; 100 dpi: $0,009 \pm 0,002 \mu\text{m}^{-1}$; 130 dpi: $0,17 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$; $n=6$ Tiere, $P < 0,001$).

Die Beobachtung identischer Dendriten und Spines über einen Zeitraum von drei Stunden mit Hilfe der 2-Photonen *in vivo* Mikroskopie ergab einen Einblick in die Kurzzeit-Plastizität dieser Strukturen bei Scrapie-infizierten Mäusen. In Abb. 26A ist ein Übersichtsbild von Neuriten aus dem somatosensorischen Kortex eines Tiers in der präsymptomatischen Phase zu Beginn (0 min) und am Ende (180 min) der Intravitalmikroskopie dargestellt. Ungefähr 99% der untersuchten Spines waren stabil über einen Zeitraum von drei Stunden in präsymptomatischen und symptomatischen Scrapie-infizierten Mäusen (Abb. 26B, C; 100 dpi: $99,4 \pm 0,2\%$; 130 dpi: $98,0 \pm 0,4\%$; $n=6$ Tiere, 6779 Spines, $P > 0,05$). Ebenso blieb der mittlere Dendriten-Durchmesser über diesen Zeitraum stabil (Abb. 26C; 100 dpi: $99,3 \pm 1,8\%$ stabiler Dendriten-Ø; 130 dpi: $99,8 \pm 1,6\%$ stabiler Dendriten-Ø; $n=6$ Tiere; $P > 0,05$). Auch die Analyse dendritischer Varikositäten ergab ein ähnliches Bild. Varikositäten an Dendriten von präsymptomatischen und symptomatischen Scrapie-infizierten YFP-H-Mäusen blieben stabil über einen Untersuchungszeitraum von drei Stunden (Abb. 26C; 100 dpi 0-3 h: $103 \pm 2\%$ stabile Varikositäten; 130 dpi 0-3h: $104 \pm 3\%$ stabile Varikositäten; $n=6$ Tiere, $P > 0,05$). Morphologische Veränderungen, wie zum Beispiel „Sprouting“ (deutsch: sprießen;

vermehrte Bildung von Filopodien ähnelnden Spines), Spine-Schwellung oder -Schrumpfung wurden nicht beobachtet. Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass - obwohl grundlegende Veränderungen der strukturellen Plastizität in Scrapie-infizierten Mäusen zu finden sind – diese Veränderungen nicht zu der Klasse der Kurzzeit-Plastizität gehören, die innerhalb von Stunden abläuft.

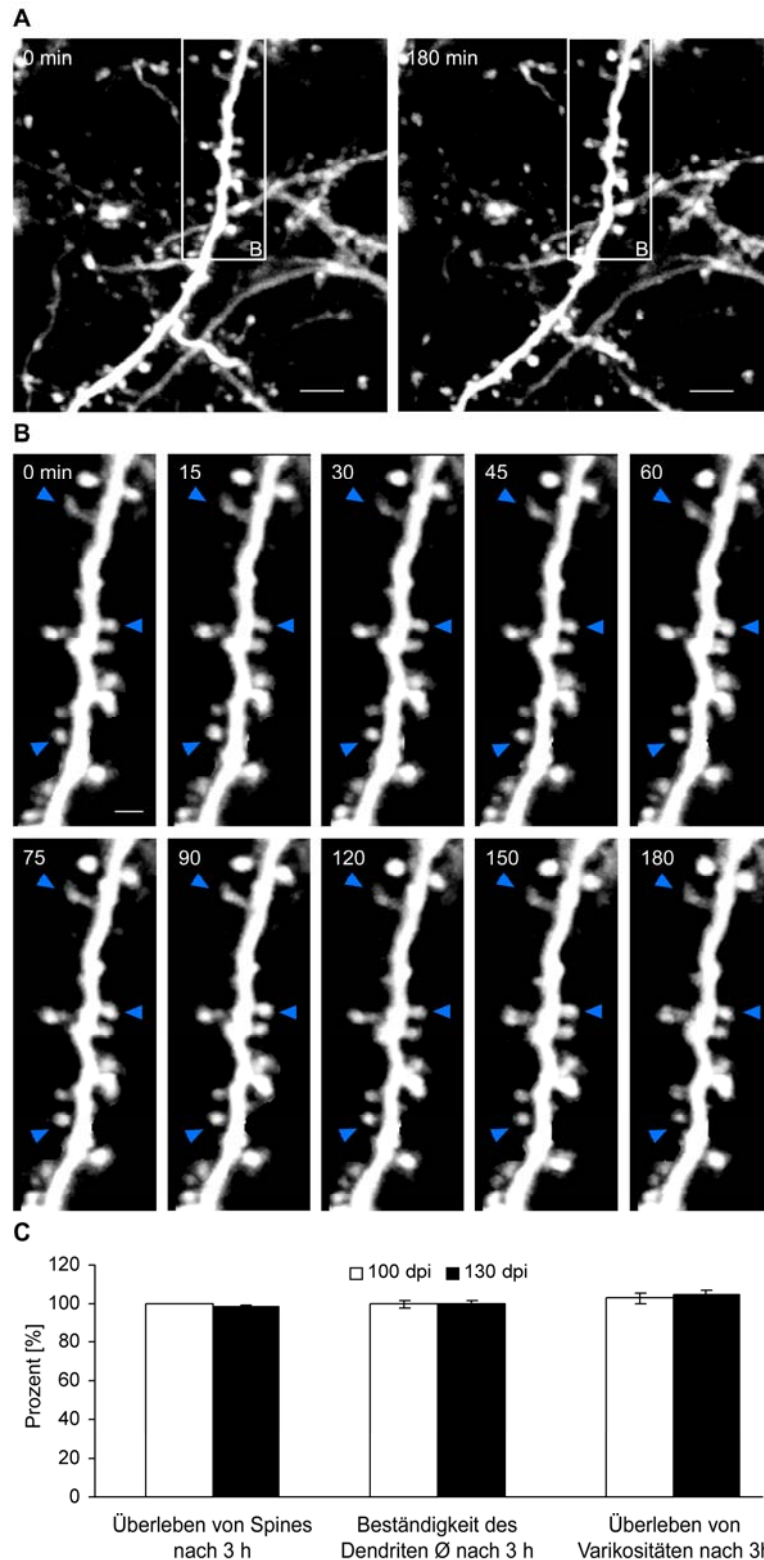


Abb. 26: Kurzzeit-Plastizität von Spines und Varikositäten

(A) Typisches Bild apikaler Dendriten und Spines aus dem Hirn einer Scrapie-infizierten Maus während der präsymptomatischen Phase zu Beginn (0 min) und am Ende (180 min) der 2-Photonen *in vivo* Mikroskopie.

(B) Vergrößerung eines Teils des apikalen Dendriten in (A). Derselbe Teil des Dendriten wurde alle 15 Minuten über einen Zeitraum von 3 Stunden wiederholt mikroskopiert. Dabei ist anzumerken, dass die Spines über den gesamten Zeitraum persistieren. Die blauen Pfeile weisen exemplarisch auf persistierende Spines hin.

(C) In präsymptomatischen und symptomatischen Scrapie-infizierten Mäusen, die über einen Zeitraum von 3 Stunden mikroskopiert wurden, lag das Überleben von Spines, die Beständigkeit des Dendriten-Durchmessers (\emptyset) und das Überleben von Varikositäten bei nahe zu 100%.

(Spines: 100 dpi: 99,4 \pm 0,2%; 130 dpi: 98,0 \pm 0,4%; n=6 Tiere, 6779 Spines, $P > 0,05$ Student's t test;

Dendriten- \emptyset : 100 dpi: 99,3 \pm 1,8% stabiler Dendriten- \emptyset ; 130 dpi: 99,8 \pm 1,6% stabiler Dendriten- \emptyset ; n=6 Tiere; $P > 0,05$ Student's t test;

Varikositäten: 100 dpi 0-3 h: 103 \pm 2% stabile Varikositäten; 130 dpi 0-3h: 104 \pm 3% stabile Varikositäten; n=6 Tiere, $P > 0,05$ Student's t test).

Maßstab: (A) 5 μ m; (B): 2 μ m.

3.2.2. Kurzzeitiger Spine-Gewinn geht langsamem Spine-Verlust voraus

Während der ersten zwei Monate nach der Geburt finden grundlegende Verschaltungsprozesse im jungen Maushirn statt. Ein beträchtlicher Anteil Spines verschwindet an apikalen Dendriten von kortikalen Layer-5-Neuronen in verschiedenen Bereichen des Kortex (Holtmaat et al. 2005; Zuo et al. 2005). Mit zunehmendem Alter werden die Spines stabiler, so dass cirka 70% aller Spines über einen Zeitraum von 18 Monaten stabil bleiben, vermutlich sogar über die gesamte Lebensspanne. Was aber passiert mit den Spines während des Alterns und noch wichtiger unter neuropathologischen Bedingungen? Dass Spines bei vielen neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer (Tsai et al. 2004; Spires et al. 2005), Parkinson (Patt et al. 1991) und Prionerkrankungen (Hogan et al. 1987; Johnston et al. 1997; Brown et al. 2001) verloren gehen, konnte bereits gezeigt werden. Bei Ischämie kommt es zu einem akuten Spine-Verlust innerhalb von Stunden (Zhang et al. 2005), während bei Epilepsie und den meisten Formen von geistiger Retardierung, wie bei pränataler Infektion, Unterernährung, Toxin Exposition und Alkohol Abhängigkeit permanenter Spine-Verlust auftritt (Jiang et al. 1998; Fiala et al. 2002). Mit 2-Photonen *in vivo* Mikroskopie wurden die Studien von SPIRES (2005), TSAI (2004) und ZHANG (2005) für Alzheimer und Ischämie durchgeführt. In den Arbeiten zu Alzheimer (Tsai et al. 2004; Spires et al. 2005) wurden zwei Zeitpunkte mit einem Abstand von Wochen miteinander verglichen, so dass Aussagen über die Zeit dazwischen nicht möglich waren. Die Arbeit zu Ischämie untersucht Zeiträume von Stunden. Das bedeutet, dass es bis jetzt keine zeitlich hochauflösende Untersuchung zur Spine- und Dendriten-Pathologie unter Neuropathologischen Bedingungen gibt, die die 2-Photonen *in vivo* Mikroskopie benutzt. Um diese Wissenslücke zu schließen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Prionerkrankung als Modell für eine neurodegenerative Erkrankung herangezogen und eine zeitlich hochauflösende Untersuchung der Kinetik der Spine- und Dendriten-Pathologie während der Scrapie-Infektion vorgenommen. Dazu wurde die strukturelle Plastizität von Dendriten und anhängenden Spines in Scrapie-infizierten fünf Monate alten Mäusen von der prä- bis zur symptomatischen Phase der Erkrankung quantifiziert. 2-Photonen Intravitalmikroskopie wurde im Abstand von vier Tagen durchgeführt, um dieselben dendritischen Elemente von Layer-5-Neuronen im primären somatosensorischen Kortex wiederholt über Zeiträume bis zu drei Monaten zu beobachten (Kapitel 1.9, 2.1; S.34, 39).

Die Spine-Dichte im primären somatosensorischen Kortex präsymptomatischer Scrapie-infizierter YFP-H-Mäuse ($0,35 \pm 0,04 \mu\text{m}^{-1}$ bei 100 dpi) war vergleichbar mit der Spine-Dichte in nicht-infizierten Kontroll-Mäusen ($0,38 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$; 5 Monate alt) und mit der

Spine-Dichte in bereits publizierten Studien ($0,29 \pm 0,08 \mu\text{m}^{-1}$; 6 Monate alt; (Holtmaat et al. 2005). Einzelne Spines wurden über die gesamte Untersuchungsperiode von bis zu 3 Monaten im Abstand von 4 Tagen verfolgt, so dass persistierende und transiente Spines identifiziert und unterschieden werden konnten. Um die erhobenen Daten mit bereits publizierten vergleichen zu können, wurden die gleichen Kriterien angewendet, um Spines den Gruppen persistent und transient zuzuordnen (Holtmaat et al. 2005). Spines, die für 8 Tage oder länger stabil waren, wurden als persistent klassifiziert, und Spines, die 4 Tage oder weniger vorhanden waren, wurden transient klassifiziert (Kapitel 2.1.4, S.44). Ebenso wurde mit der Quantifizierung der täglichen Spine-Umsatzrate (dTOR, engl.: daily turnover ratio) verfahren, die den Anteil an täglich hinzukommenden und verlorenen Spines widerspiegelt (Kapitel 2.1.4, S.44). Kontroll-Tiere wiesen stabile Spine-Dichten und dTOR über den gesamten Untersuchungszeitraum auf (Abb. 27D, E). Scrapie-infizierte YFP-H-Mäuse zeigten eine konstante Abnahme der Spine-Dichte über den gesamten Untersuchungszeitraum, beginnend in der präsymptomatischen Phase bei Werten, die vergleichbar mit den Kontrollen waren, bis hin zu gänzlichem Spine-Verlust während der terminalen Phase der Erkrankung (Abb. 27D). Der fortschreitende Spine-Verlust an apikalen Dendriten von Scrapie-infizierten YFP-H-Mäusen vollzog sich über eine Periode von Tagen bis Wochen und unterschied sich darin grundlegend von Kurzzeit-Plastizitäts-Veränderungen.

Schon während der präsymptomatischen Phase der Prionerkrankung wiesen infizierte Mäuse im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte dTOR-Werte auf (100 dpi: $0,04 \pm 0,005$; Kontrolle: $0,02 \pm 0,002$; $n=6$ Tiere; $P < 0,05$). Die dTOR-Werte der Kontrollen blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum bei niedrigen Werten (Abb. 27E). Die dTOR-Werte von Scrapie-infizierten Tieren erhöhten sich substantiell mit dem Beginn der symptomatischen Phase der Prionerkrankung und steigerten sich bis zur terminalen Phase noch (120 dpi, Abb. 27E). Die dTOR-Werte setzen sich aus Spine-Gewinn und -Verlust zusammen. Um aufzuklären, ob der beobachtete Anstieg der dTOR ab 120 dpi durch vermehrten Spine-Gewinn oder -Verlust bedingt ist, wurden Gewinn und Verlust einzeln betrachtet. Der zeitliche Verlauf des täglichen Spine-Verlustanteils (Abb. 27G) bewegte sich immer oberhalb des Spine-Gewinnanteils (Abb. 27F) in Scrapie-infizierten Tieren. Der Spine-Verlustanteil zeigte einen deutlichen Anstieg ab 135 dpi, als die symptomatische Phase bereits begonnen hatte (Abb. 27G).

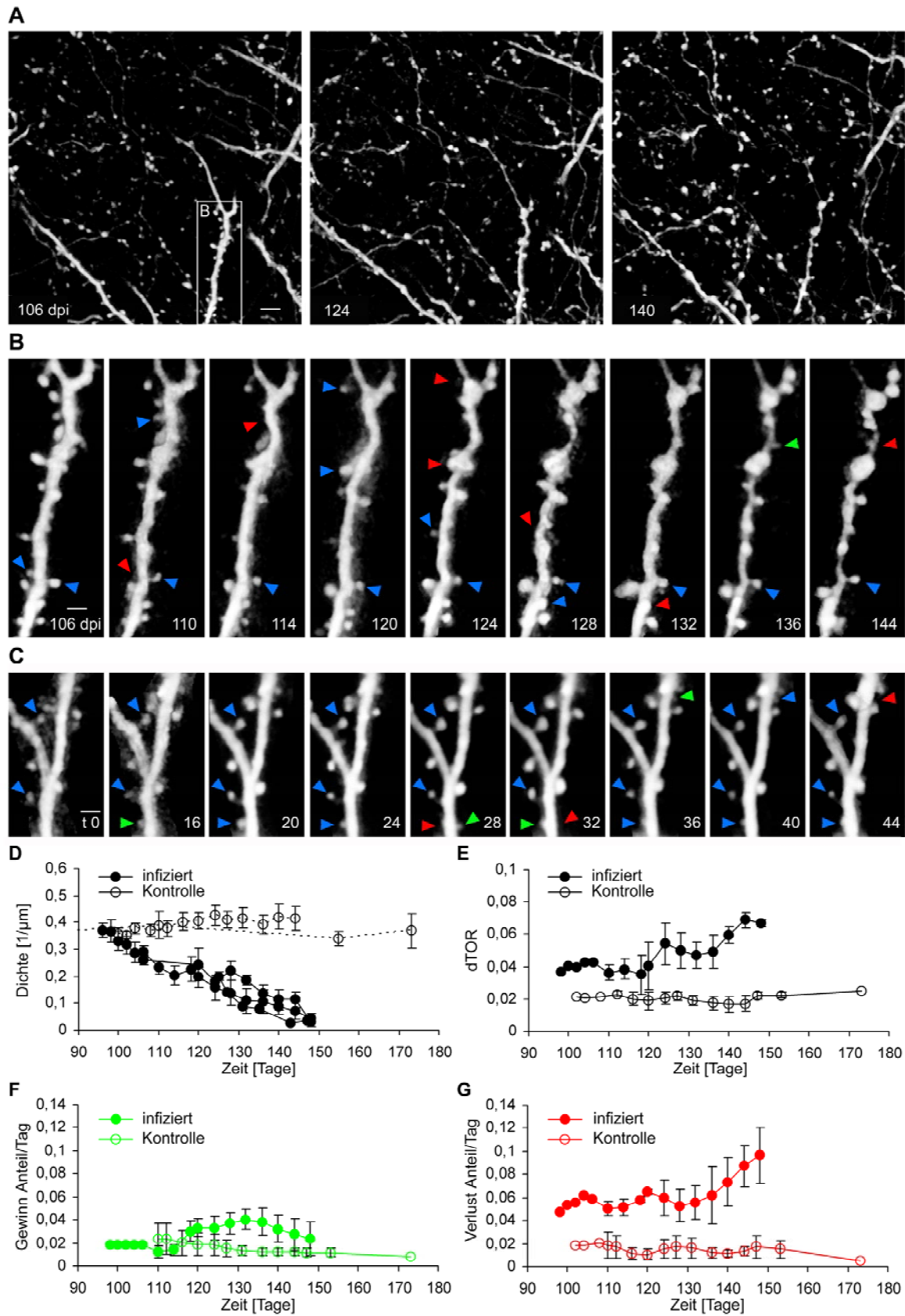


Abb. 27: Langzeit Spine-Plastizität in Scrapie-infizierten Mäusen

(A) Zeitserie von Übersichtsaufnahmen aus dem somatosensorischen Kortex einer YFP-exprimierenden Scrapie-infizierten Maus von der präsymptomatischen bis zur symptomatischen Phase der Krankheit. **(B)** Zeitserie eines apikalen Dendriten über 38 Tage (Vergrößerung aus (A)). Die blauen Pfeile weisen exemplarisch auf bis zum jeweiligen Zeitpunkt persistierende Spines hin. Rote Pfeile zeigen exemplarisch verlorene Spines an, und grüne Pfeile markieren beispielhaft neu entstandene Spines. Es ist zu beachten, dass die persistierenden Spines kontinuierlich während der symptomatischen Phase verloren gehen. Dabei wird der Spine-Verlust nicht durch neu entstehende Spines kompensiert. **(C)** Zeitserie eines Dendritenasts einer nicht-infizierten Kontroll-Maus im gleichen Alter. Der Zeitraum der Mikroskopie beträgt 44 Tage und entspricht somit in etwa dem der Scrapie-infizierten Maus. Anzumerken ist, dass die meisten Spines persistieren (blaue Pfeile), während der Verlust (rote Pfeile) und Gewinn (grüne Pfeile) von Spines ausgeglichen ist. **(D)** Spine-Dichte von Scrapie-infizierten (gefüllte Kreise) und nicht infizierten Kontroll-Mäusen (offene Kreise). Jede Linie entspricht einem untersuchten Tier, und jeder Kreis entspricht einem Untersuchungszeitpunkt. Die Werte der verschiedenen Untersuchungszeitpunkte entsprechen Mittelwerten von 5-8 unabhängigen Dendriten Ästen. Während die Spine-Dichte bei den Kontroll-Mäusen konstant bleibt, weisen Scrapie-infizierte Tiere einen kontinuierlichen Verlust von Spines auf, der von der präsymptomatischen bis zur symptomatischen Phase reicht. **(E)** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der mittleren täglichen Spine-Umsatzrate (dTOR: daily turnover rate) von Scrapie-infizierten (gefüllte Kreise; n=3 Tiere) und Kontroll-Mäusen (offene Kreise; n=3 Tiere). Während die dTOR-Werte der Kontrollen konstant auf niedrigem Niveau bleiben, weisen Scrapie-infizierte Tiere einen konstanten Verlauf auf leicht erhöhtem Niveau bis zum Ende der präsymptomatischen Phase auf. Von da an steigen die dTOR-Werte die gesamte symptomatische Phase hindurch stark an. **(F)** Zeitlicher Verlauf des mittleren Gewinnanteils an Spines pro Tag von Scrapie-infizierten und Kontroll-Mäusen. Während der präsymptomatischen Phase ist der Gewinnanteil an Spines bei beiden Gruppen ähnlich, und die Kontrollen bleiben auf diesem Niveau während des gesamten Untersuchungszeitraums. Mit dem Beginn der symptomatischen Phase (120 dpi) zeigen Scrapie-infizierte Tiere einen erhöhten Spine-Gewinnanteil. **(G)** Zeitlicher Verlauf des mittleren Spine-Verlustanteils pro Tag von Scrapie-infizierten und Kontroll-Mäusen. Schon während der präsymptomatischen Phase weisen Scrapie-infizierte Tiere einen höheren Spine-Verlustanteil als die Kontrollen auf. In der Mitte der symptomatischen Phase ab 135 dpi steigt der Spine-Verlustanteil stark an. Es ist anzumerken, dass der Phase des starken Spine-Verlusts (135 bis 150 dpi) bei Scrapie-infizierten Tieren eine Phase des vermehrten Spine-Gewinns vorangeht (120 bis 135 dpi). Maßstab: (A) 5 μm , (B, C): 2 μm . Fehler Balken: SEM.

Überraschenderweise wies der Spine-Gewinnanteil einen Anstieg zu Beginn der symptomatischen Phase auf (120 dpi; Abb. 27F). Somit ist der Anstieg der dTOR zu Beginn der symptomatischen Phase (120 dpi; Abb. 27E) bedingt durch eine vermehrte Bildung von Spines, und nicht durch einen höheren Spine-Verlust (vergleiche Abb. 27F, G). Der spätere noch stärkere Anstieg der dTOR ist hingegen eindeutig auf einen gesteigerten Spine-Verlust ab 135 dpi zurückzuführen. Der Anstieg des Spine-Gewinnanteils ging dem Anstieg des Spine-Verlustanteils deutlich voraus (vergleiche Abb. 27F, G). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass ein kritischer Zeitpunkt der Prionerkrankung mit Beginn der symptomatischen Phase (ab 120 dpi) erreicht ist, an dem die Neurone auf den zunehmenden Spine-Verlust mit vermehrter Spine-Neubildung reagieren. Allerdings scheint die vermehrte Spine-Neubildung jedoch nicht ausreichend zu sein, um die fortschreitende Erkrankung mit noch größerem Spine-Verlust ab 135 dpi aufzuhalten. Diese Untersuchung zeigt aber auch, dass Mechanismen, die die Spine-Neubildung regulieren, offensichtlich nicht gestört sind.

Fünf verschiedene Studien untersuchten bis jetzt persistierende und transiente Spines in verschiedenen Gebieten des Kortex während der Gehirnentwicklung der Maus in juvenilen und adulten Stadien (Grutzendler et al. 2002; Trachtenberg et al. 2002; Holtmaat et al. 2005; Zuo et al. 2005; Majewska et al. 2006). Die Studien stimmen darin überein, dass Spines in adulten Tieren (älter als drei Monate) mit der Zeit immer stabiler werden. Holtmaat et al. (2005) fanden den größten Anteil transients Spines (stabil für 4 oder weniger Tage) im somatosensorischen und visuellen Kortex, der mit zunehmendem Alter abnahm. In den anderen Studien wurde hingegen ein kleinerer Anteil transients Spines gefunden und ein höherer Anteil persistierender Spines. Der Verlust von Spines während der Prionerkrankung erforderte die Bestimmung von transienten und persistierenden Spines für jeden Untersuchungszeitpunkt, so dass als Referenzwert nicht der erste Mikroskopietag, sondern die jeweils zwei vorherigen Untersuchungszeitpunkte dienen (Kapitel 2.1.4; S.44). Diese Methode schließt somit auch Spines ein, die nach dem ersten Mikroskopietag entstehen und sich später als persistierend herausstellen (Abb. 27C, Tag 16 grüner Pfeil). Die Analyse der Dichte und des Anteils persistierender und transients Spines über die Zeit in Scrapie-infizierten und Kontroll-Mäusen ergab stabile Werte für die Kontrollen über den gesamten Untersuchungszeitraum (Tabelle 8, S.86). Die Dichte transients Spines blieb in Scrapie-infizierten Mäusen konstant über den gesamten Untersuchungszeitraum. Der Anteil transients Spines nahm von der präsymptomatischen bis zur symptomatischen Krankheitsphase zu. Diese Zunahme ist jedoch nicht real, sondern spiegelt vielmehr wider, dass die Dichte und der Anteil persistierender Spines über den Untersuchungszeitraum abnimmt (Tabelle 8, S.86). Aus den vorliegenden Ergebnissen wurde geschlossen, dass besonders persistierende Spines im Verlauf der Prionerkrankung und speziell während der symptomatischen Phase verloren gehen. Dagegen scheinen transiente Spines davon nicht betroffen zu sein.

Tabelle 8: Transiente und persistierende Spines

Kontrolle	Tag 8	Tag 20	Tag 46
Dichte persistierender Spines [μm^{-1}]	0,31 \pm 0,02	0,32 \pm 0,02	0,33 \pm 0,02
Anteil persistierender Spines [%]	82,7 \pm 4,5	82 \pm 5,9	83,9 \pm 5,1
Dichte transients Spines [μm^{-1}]	0,06 \pm 0,02	0,05 \pm 0,02	0,05 \pm 0,02
Anteil transients Spines [%]	14,3 \pm 5,0	12,1 \pm 5,8	11,3 \pm 4,3
Scrapie-infiziert	Tag 110	Tag 124	Tag 144
Dichte persistierender Spines [μm^{-1}]	0,21 \pm 0,03	0,13 \pm 0,02	0,03 \pm 0,01
Anteil persistierender Spines [%]	93,0 \pm 2,0	82,2 \pm 3,6	65,3 \pm 8,4
Dichte transients Spines [μm^{-1}]	0,02 \pm 0,007	0,03 \pm 0,008	0,02 \pm 0,006
Anteil transients Spines [%]	7,0 \pm 2,0	16,5 \pm 3,6	35,7 \pm 10,1

3.2.3. Entstehung von Varikositäten führt zu „dendritic Beading“

Ein Phänomen, das häufig unter neuropathologischen Bedingungen beobachtet wird, ist das Anschwellen von Dendriten. Diese Schwellungen werden auch Varikositäten genannt. Gebräuchlich ist auch der Begriff „dystrophe Neuriten“. Varikositäten liegen häufig nebeneinander, so dass der Eindruck einer Perlenschnur entsteht. Von diesem Phänomen leitet sich der englische Ausdruck „dendritic beading“ (deutsch: Perlenbildung an Dendriten) ab. Unter bestimmten Bedingungen wie subletale Hypoxie, überhöhte Glutamat-Rezeptor-Aktivität oder Exozytotoxizität können Varikositäten an Dendriten innerhalb von Minuten oder Stunden entstehen (Park et al. 1996; Hasbani et al. 2001). Dieser Prozess wird häufig begleitet von einer Verminderung des Dendriten-Durchmessers. Dies konnte bei der Alzheimer-Erkrankung bereits gezeigt werden (Spires et al. 2005). Außerdem wurden in einem Alzheimer-Tiermodell auch Varikositäten am Axon in nächster Nähe zu amyloiden Plaques festgestellt (Tsai et al. 2004). Für die strukturelle Plastizität von Varikositäten ebenso wie für die strukturelle Spine-Plastizität fehlt bis heute eine zeitlich hochauflösende Kinetik im Verlauf einer neurodegenerativen Erkrankung. Die akuten 2-Photonen *in vivo* Experimente der vorliegenden Arbeit zeigten bereits, dass die Varikositäten-Dichte an apikalen Dendriten Scrapie-infizierter YFP-H-Mäuse stark erhöht ist (Kapitel 3.2.1, S.79, Abb. 25E; 100 dpi: $0,009 \pm 0,002 \mu\text{m}^{-1}$; 130 dpi: $0,17 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$; n=6 Tiere, $P < 0,001$). Ebenso wurde ein verminderter Dendriten-Durchmesser bei Scrapie-infizierten Mäusen in der symptomatischen Krankheitsphase festgestellt (Abb. 25D; 100 dpi: $1,1 \pm 0,03 \mu\text{m}$; 130 dpi: $0,64 \pm 0,04 \mu\text{m}$; n=6 Tiere, $P < 0,001$). Um einen Einblick in die Veränderungen von Varikositäten an Dendriten von Scrapie-infizierten Mäusen über die Zeit zu bekommen, wurden ähnliche Parameter wie bei der Untersuchung der strukturellen Spine-Plastizität analysiert. Dazu gehörten die Dichte von Varikositäten, tägliche Varikositäten-Umsatzraten, persistierende Varikositäten und der tägliche Gewinn- und Verlustanteil an Varikositäten. Abb. 28A zeigt eine Zeitserie von 2-Photonen *in vivo* Mikroskopie Bildern eines repräsentativen Dendriten, an dem die Entstehung und Entwicklung von Varikositäten im Verlauf der Prionerkrankung gut zu verfolgen ist. Die Varikositäten-Dichte pro Mikrometer Dendritenlänge nahm im Verlauf des Krankheitsprozesses in Scrapie-infizierten Mäusen zu (Abb. 28B). Die Neubildung von Varikositäten vollzieht sich während der präsymptomatischen Phase und erreicht ein Plateau während der terminalen Phase der Erkrankung. $61 \pm 5\%$ aller während des gesamten Untersuchungszeitraums entstehenden Varikositäten werden bis 124 dpi gebildet. Die Entstehung von Varikositäten führt zu „dendritic beading“ und Verminderung des Dendriten-Durchmessers zwischen benachbarten Varikositäten (Abb. 28A).

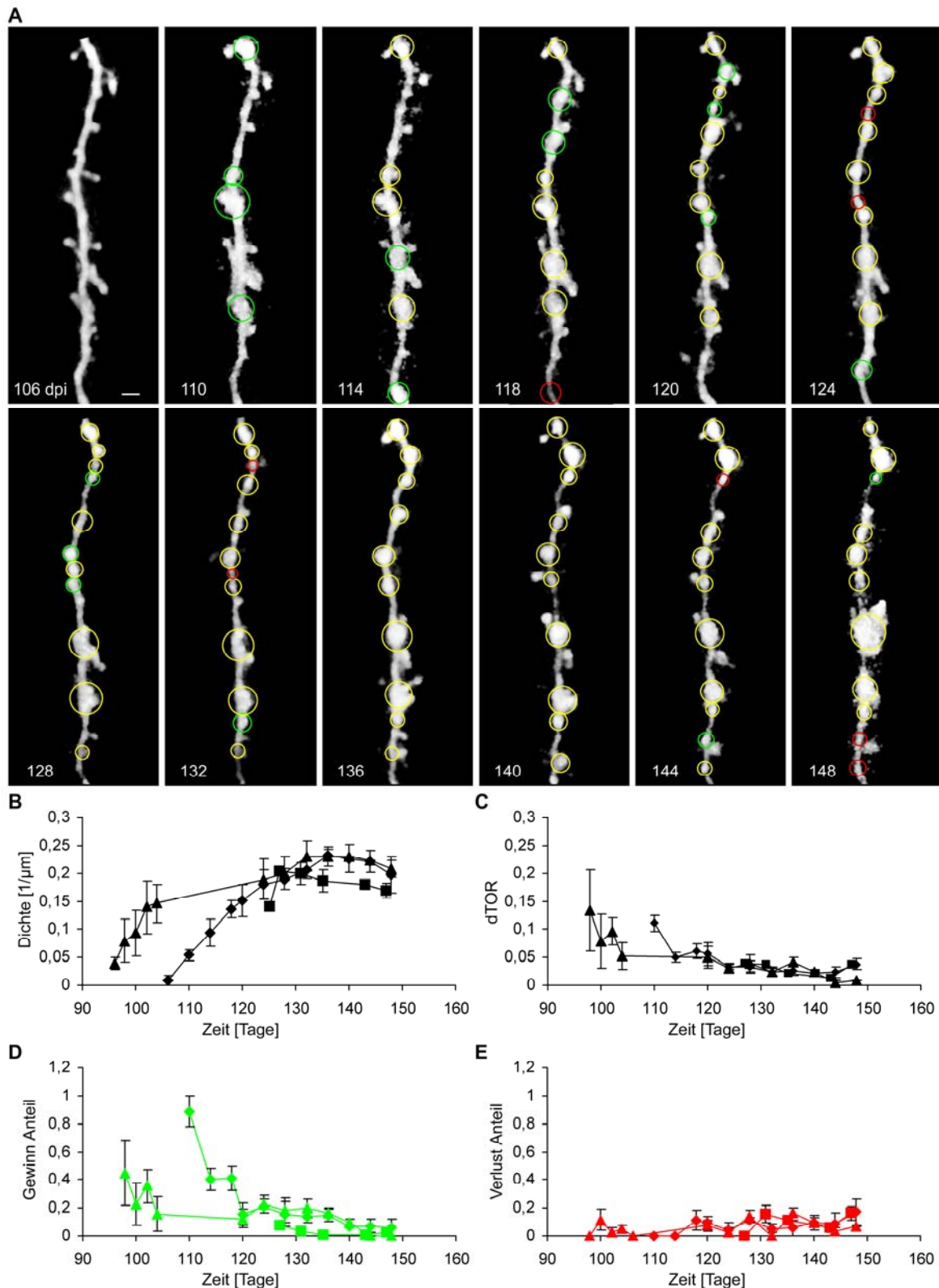


Abb. 28: Langzeit Plastizität von Varikositäten in Scrapie-infizierten Mäusen

(A) Repräsentative Zeitserie eines Dendriten einer Scrapie-infizierten YFP-H-Maus untersucht mit 2-Photonen *in vivo* Mikroskopie. Die grünen Kreise weisen auf entstandene, gelbe auf persistierende und rote auf verlorene Varikositäten hin. Man beachte, dass ein großer Anteil an Varikositäten während der präsymptomatischen Phase bis 120 dpi entsteht. $90 \pm 2,7\%$ der entstandenen Varikositäten persistieren während des gesamten Untersuchungszeitraums. Selten wurde der Verlust von Varikositäten beobachtet. (B) Zeitlicher Verlauf der Varikositäten-Dichte Scrapie-infizierter Mäuse.

Jede Linie entspricht einem Tier, und die Symbole markieren Untersuchungszeitpunkte. Die Mittelwerte zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden aus der Varikositäten-Dichte von 5-8 unabhängigen Dendriten pro Tier ermittelt (Fehlerbalken: SEM). Die Varikositäten-Dichte steigt während der präsymptomatischen und symptomatischen Phase der Krankheit kontinuierlich an, bis sie ab 130 dpi in ein Plateau übergeht. **(C)** Zeitverlauf der Varikositäten-Umsatzrate pro Tag. Die Varikositäten-Umsatzrate ist während der präsymptomatischen Phase erhöht (bis 120 dpi). Danach bleibt sie relativ konstant bei niedrigen Werten. **(D)** Zeitlicher Verlauf des mittleren Varikositäten-Gewinnanteils bei Prion-infizierten Mäusen. Der Gewinnanteil ist während der präsymptomatischen Phase sehr hoch und bleibt während der symptomatischen Phase auf konstant niedrigem Niveau. **(E)** Zeitlicher Verlauf des mittleren Varikositäten-Verlustanteils bei Prion-infizierten Mäusen. Der Verlustanteil bleibt während des gesamten Untersuchungszeitraums auf niedrigem Niveau. Maßstab: (A) 2,5 μm .

Dendritenbrüche wurden selten beobachtet und wenn, dann während der späten terminalen Krankheitsphase. Die tägliche Varikositäten-Umsatzrate ($d\text{TOR}_v$) war während der präsymptomatischen Phase erhöht, fiel zu Beginn der symptomatischen Phase ab und blieb dann konstant bis zum Ende der Untersuchung (Abb. 28C). In Scrapie-infizierten YFP-H-Mäusen blieb der tägliche Anteil an verschwindenden Varikositäten während des gesamten Beobachtungszeitraums klein. Dagegen fiel der Anteil an hinzukommenden Varikositäten während der prä-symptomatischen Phase von hohen Werten auf ein Niveau ähnlich dem des Varikositäten-Verlustanteils (vergleiche Abb. 28D, E). $90 \pm 2,7\%$ aller entstehenden Varikositäten persistieren bis zum Ende der Untersuchungsperiode. Dies bedeutet, dass Varikositäten verstärkt während der präsymptomatischen Phase der Prionerkrankung gebildet werden, um anschließend die gesamte symptomatische und terminale Krankheitsphase bis zum Ende der Untersuchung zu persistieren.

3.2.4. Spines verschwinden dort, wo Varikositäten entstehen

Bei der unabhängigen Analyse der strukturellen Plastizität von Spines und Dendriten im Verlauf der Prionerkrankung wurde festgestellt, dass während der präsymptomatischen Krankheitsphase vermehrt Varikositäten an Dendriten auftreten (Kapitel 3.2.3, S.87, Abb. 28). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Spine-Verlust im Vergleich dazu verspätet, besonders während der symptomatischen Phase, zum Ende der Krankheit hin auftritt (Kapitel 3.2.2, S.82, Abb. 27). Um herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Varikositäten und dem Verlust von Spines besteht, wurden weitere Parameter analysiert. So wurde beispielsweise untersucht, an welchen Stellen des Dendriten Varikositäten entstehen und wie hoch dort die jeweilige Dichte ist. Außerdem wurde die Dichte von Spines bestimmt, die an Varikositäten verschwinden. In Abb. 29A, B sind repräsentative Zeitserien von apikalen Dendriten und den daran entstehenden Varikositäten und verschwindenden Spines abgebildet.

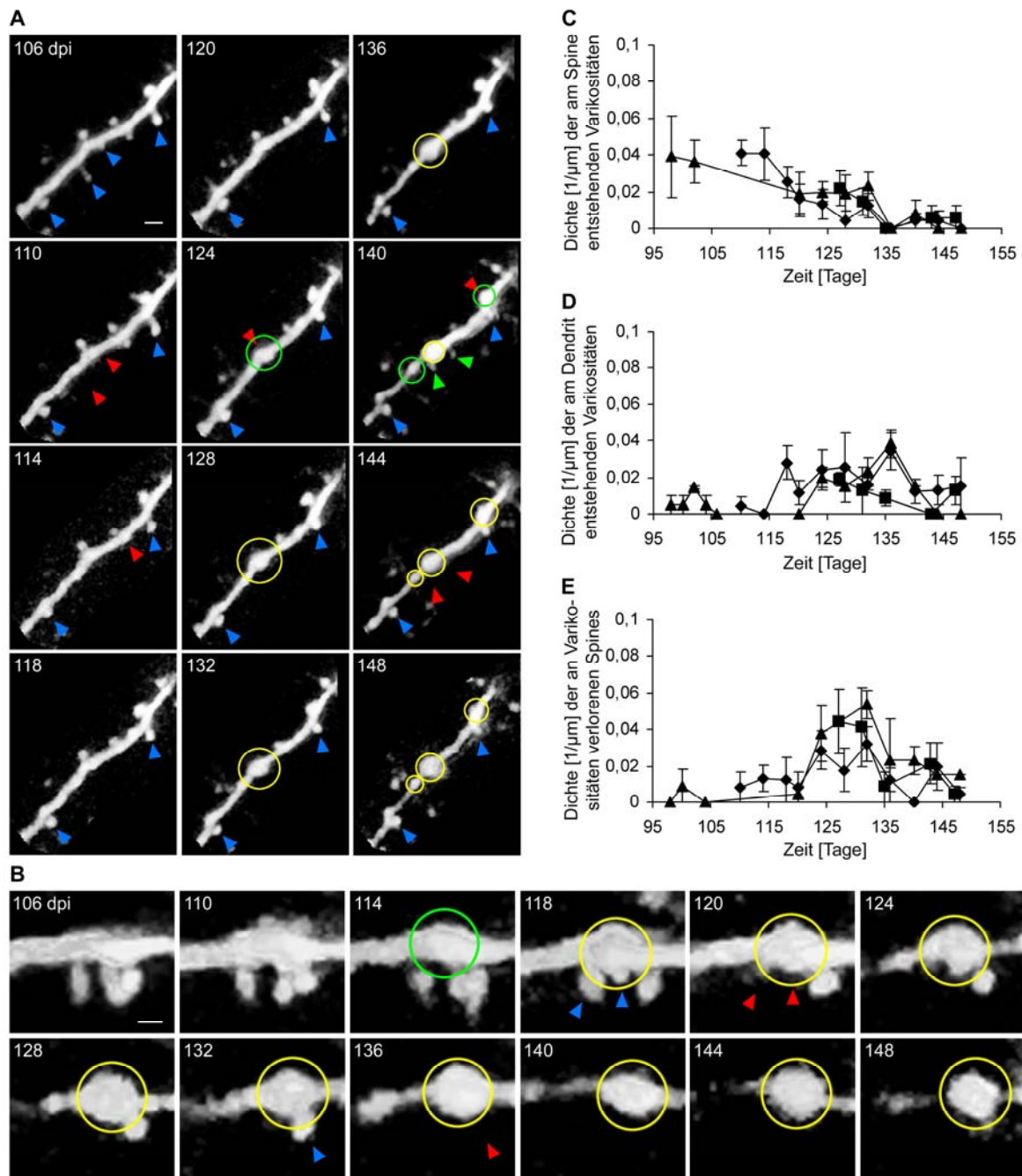


Abb. 29: Varikositäten entstehen an Spines und Spines verschwinden an Varikositäten

(A) Repräsentative Zeitserie eines Dendritenasts einer Scrapie-infizierten YFP-H-Maus. Persistierende Spines (blaue Pfeile) gehen während der symptomatischen Phase verloren. Varikositäten (entstanden: grüne Kreise, persistierend: gelbe Kreise) entstehen hauptsächlich an Stellen am Dendriten, wo auch Spines zu finden sind. Anschließend verschwinden Spines (rote Pfeile) während der symptomatischen Phase an Stellen, wo sich bereits Varikositäten befinden oder neu gebildet haben. Selten werden auch an Varikositäten neue Spines gebildet (grüne Pfeile).

(B) Zeitserie hochauflösender Bilder dendritischer Spines über 42 Tage in einer Scrapie-infizierten Maus. Eine Varikosität entsteht an einer Stelle, an der drei Spines entspringen (grüner Kreis). Die Spines verschwinden, während die Varikosität bis zum Ende der Untersuchung bestehen bleibt.

(C) Zeitlicher Verlauf der am Spine entstehenden Varikositäten-Dichte [$1/\mu\text{m}$ Dendriten Länge] (Jede Linie entspricht einem Tier, und die Symbole markieren Untersuchungszeitpunkte). Die Dichte von am Spine entstehenden Varikositäten ist während der präsymptomatischen Phase relativ hoch und fällt dann auf nahezu null während der terminalen Krankheitsphase (ab 135 dpi).

(D) Zeitverlauf der am Dendriten entstehenden Varikositäten-Dichte [$1/\mu\text{m}$ Dendriten Länge] (Jede Linie entspricht einem Tier, und die Symbole markieren Untersuchungszeitpunkte). Die Dichte von am Dendriten entstehenden Varikositäten ist klein während der präsymptomatischen Krankheitsphase und steigt leicht an während der symptomatischen Phase (ab 120 dpi). **(E)** Zeitlicher Verlauf der an Varikositäten verschwindenden Spine-Dichte [$1/\mu\text{m}$ Dendriten Länge] in Scrapie-infizierten YFP-H-Mäusen (Jede Linie entspricht einem Tier, und die Symbole markieren Untersuchungszeitpunkte). Spine-Verlust an Varikositäten tritt selten während der präsymptomatischen Phase auf. Der Spine-Verlust an Varikositäten steigt während der symptomatischen Phase an und erreicht einen Peak bei etwa 130 dpi, um dann in der terminalen Phase wieder abzufallen. Maßstab: (A) $2\ \mu\text{m}$; (B) $1\ \mu\text{m}$.

In Scrapie-infizierten YFP-H-Mäusen entstehen Varikositäten zu einem großen Teil während der präsymptomatischen Phase der Prionerkrankung ($61 \pm 5\%$; $n=3$). Diese, während der präsymptomatischen Krankheitsphase gebildeten Varikositäten, entstehen zu $72 \pm 4\%$ an Stellen des Dendriten, wo sich Spines befinden (diese Varikositäten werden im Folgenden „spine-gained“ Varikositäten genannt). Außerdem werden $75 \pm 6\%$ aller im Verlauf des gesamten Untersuchungszeitraums auftretenden spine-gained Varikositäten während der präsymptomatischen Phase der Prionerkrankung gebildet. Diese Beobachtung wird deutlich, wenn man den zeitlichen Verlauf der Dichte der spine-gained Varikositäten betrachtet (Abb. 29C). Die Dichte der am Spine entstehenden Varikositäten fällt von höheren Werten während der präsymptomatischen Phase auf niedrigere Werte in der symptomatischen Krankheitsphase (präsymptomatisch: $0,04 \pm 0,007\ \mu\text{m}^{-1}$; symptomatisch $0,004 \pm 0,002\ \mu\text{m}^{-1}$; $P < 0,05$). Die Dichte der am Dendriten (Stellen, an denen sich keine Spines befinden) entstehenden Varikositäten war klein während der präsymptomatischen Phase und nahm mit dem Beginn der symptomatischen Krankheitsphase zu (Abb. 29D; präsymptomatisch $0,01 \pm 0,003\ \mu\text{m}^{-1}$; 136 dpi: $0,03 \pm 0,005\ \mu\text{m}^{-1}$; $P < 0,05$). Dabei ist die Zunahme der dendrite-gained Varikositäten wohl eher auf die Abnahme der Spine-Dichte zurückzuführen, als auf eine tatsächliche Zunahme der am Dendriten entstehenden Varikositäten. Die Analyse des zeitlichen Verlaufs der Dichte von Spines, die an Varikositäten verschwanden, ergab, dass während der präsymptomatischen Phase nur wenige Spines an Varikositäten zurückgebildet werden. Mit dem Beginn der symptomatischen Phase der Prionerkrankung nimmt die Dichte von Spines, die an Varikositäten verschwinden, jedoch zu und erreicht einen Höhepunkt bei cirka 130 dpi. Danach fällt der Wert zum Ende der Krankheit hin wieder ab (Abb. 29E; präsymptomatisch: $0,009 \pm 0,005\ \mu\text{m}^{-1}$; symptomatisch: $0,04 \pm 0,007\ \mu\text{m}^{-1}$, terminal: $0,007 \pm 0,003\ \mu\text{m}^{-1}$; $P < 0,05$). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein beträchtlicher Anteil an Varikositäten während der präsymptomatischen Phase an Spines entsteht. Im weiteren Verlauf der Prionerkrankung gehen genau die Spines zugrunde, die an Stellen am Dendriten entspringen, an denen vorher Varikositäten gebildet wurden.

4. Diskussion

4.1. Veränderte Ca²⁺-Homöostase in Hippocampus-CA1-Neuronen von Prnp^{-/-}-Mäusen

Die Funktion des Prion-Proteins ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Das beste Experiment zur Funktionsaufklärung, die Generierung von PrP-Knockout-Mäusen (Bueler et al. 1992; Manson et al. 1994), lieferte keine genauen Erkenntnisse, weil keine der erzeugten Linien einen eindeutigen Phänotyp aufwies. Dies gilt sowohl für die konditionalen als auch für die permanenten Knockouts. Die Herangehensweise über den Ort der Expression des Prion-Proteins etwas über dessen Funktion zu erfahren, führte schnell zu der Erkenntnis, dass das Prion-Protein eine Funktion im Gehirn ausüben müsste (Kretzschmar et al. 1986a). Genauer gesagt, fand man das Prion-Protein vorwiegend in Synapsen an der Zelloberfläche lokalisiert (Herms et al. 1999). Offenbar ist das Prion-Protein vorwiegend in Lipid-Rafts zu finden (Keshet et al. 2000). Dies passte auch gut zur Struktur des Prion-Proteins, die es als ein GPI-verankertes glykosiliertes Membranprotein ausweist (Stahl et al. 1987). Ausgehend von der synaptischen membranständigen Lokalisation des Prion-Proteins lag die Hypothese nahe, dass PrP^C eine Rolle in Signaltransduktionprozessen übernehmen könne (Martins et al. 2001). Dabei wurde vermutet, dass PrP^C entweder selbst als Rezeptor agiert, oder aber zusammen mit anderen Molekülen einen Rezeptor-Komplex bilden könnte. Daraus entstand die Suche nach potentiellen Bindungspartnern für PrP^C. Bis heute wurde eine ganze Reihe von Interaktionspartnern von PrP^C identifiziert, die allerdings in vielen Fällen verschiedenen und nicht einem gemeinsamen Signalweg zugeordnet werden konnten. So existieren heute verschiedene Hypothesen, welche Rolle PrP^C bei Signaltransduktionsprozessen spielt. Eine Vermutung ist die Beteiligung an pro- und anti-apoptotischen Signalwegen. Die Interaktion von PrP^C mit STI1 (engl.: stress-inducible protein 1) kann über Phosphorylierung die Aktivierung der MAPK (engl.: mitogen-activated protein kinase) und somit Neuritogenese in kultivierten Retina Neuronen induzieren. Auf der anderen Seite führt die STI1- PrP^C Wechselwirkung zur Aktivierung von PKA (engl.: cAMP-dependent protein kinase A) und wirkt dann neuroprotektiv (Lopes et al. 2005). Eine Beteiligung des Prion-Proteins an Neuriten-Entwicklung und -Wachstum wurde auch von Santuccione et al. gezeigt. Dabei interagiert PrP^C mit NCAM (engl.: neural cell adhesion molecule) und bewirkt über p59^{fyn} (engl.: nonreceptor tyrosine kinase, fyn) Neuritenwachstum in Zellkulturmodellen (Santuccione et al. 2005). Im Gegensatz dazu lösten gegen PrP^C gerichtete Antikörper Apoptose in hippocampalen Neuronen der Maus *in vivo* aus (Solforosi et al. 2004). Auch hier

wurde angenommen, dass es durch Quervernetzung von PrP^C zur Aktivierung eines Signaltransduktionsprozesses kommt, der zur Apoptose führt.

Die Fähigkeit des Prion-Proteins zur Kupferbindung (Brown et al. 1997a), die Lokalisation von PrP^C in der präsynaptischen Membran (Herms et al. 1999) sowie die Stimulation der PrP^C-Endozytose durch Zugabe von Kupfer in das Kulturmedium neuronaler Zellen (Pauly und Harris 1998) deuten auf eine Rolle in der Kupfer-Homöostase an der Synapse hin (Kretzschmar et al. 2000). Weiterhin zeigen kultivierte neuronale Zellen von *Prnp*^{-/-}-Mäusen eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress, was mit einer verringerten Superoxid-Dismutase-Aktivität assoziiert zu sein scheint (Brown et al. 1997b; Brown und Besinger 1998). Im Skelett- und Herzmuskel sowie in der Leber von *Prnp*^{-/-}-Mäusen lässt sich eine gesteigerte Oxidation von Proteinen und Lipiden nachweisen (Klamt et al. 2001), weshalb PrP^C auch eine mögliche anti-oxidative Wirkung zugeschrieben wird.

In weiteren Arbeiten konnte außerdem gezeigt werden, dass phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) PrP^C-abhängig aktiviert wird und Hirnlysate von *Prnp*^{-/-}-Mäusen eine verminderte PI3K-Aktivität aufweisen (Vassallo et al. 2005). Verminderte PI3K-Aktivität wiederum könnte mögliche Ursache für das Auftreten von vergrößerten Hirninfarkten und erhöhte Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress bei *Prnp*^{-/-}-Mäusen sein (Vassallo et al. 2005; Weise et al. 2006).

Neben der Hypothese, dass PrP^C neuroprotektiv wirkt und an Neuriten-Wachstum beteiligt ist, führte die Lokalisation des Prion-Proteins in Synapsen zu einer weiteren wichtigen Hypothese. Warum sollte das Prion-Protein nicht eine Rolle bei der synaptischen Reizweiterleitung spielen? Hinweise darauf stammen aus Untersuchungen der *Prnp*^{-/-}-Mäuse, die neben einer Umorganisation der Präsynapse im Hippocampus (Mossyfiber) (Colling et al. 1997), elektrophysiologische Phänotypen, wie vermindertes LTP (engl.: long term potentiation) (Collinge et al. 1994) und beeinträchtigte „Feld Exzitatorische Postsynaptische Potenziale“ (fEPSPs) aufweisen (Carleton et al. 2001). Ebenso wurden reduzierte Kupferkonzentration in Synaptosomen von *Prnp*^{-/-}-Mäusen gefunden, die ebenfalls eine beeinträchtigte Synapsenfunktion implizieren (Brown et al. 1997a; Herms et al. 1999). So verwundert es nicht, dass bei *Prnp*^{-/-}-Mäusen auch kognitive Defekte (Criado et al. 2005) und veränderte zirkadiane Aktivitäts- und Schlafrhythmen festgestellt wurden (Tobler et al. 1996; Tobler et al. 1997). Der konsistenteste beobachtete elektrophysiologische Phänotyp, der auf eine Funktion des Prion-Proteins bei der synaptischen Übertragung hinweist und in verschiedenen unabhängig generierten *Prnp*^{-/-}-Mauslinien reproduziert werden konnte, ist die Verminderung der späten Nachhyperpolarisation (sI_{AHP} : slow afterhyperpolarization current)

in CA1-Neuronen des Hippocampus der Maus (Colling et al. 1996; Mallucci et al. 2002; Asante et al. 2004). Wie bereits in Kapitel 1.7 (S.29) beschrieben, wird durch Nachhyperpolarisation die Erregbarkeit von Neuronen moduliert. Nach einer Depolarisation der Zellmembran gelangen Ca^{2+} -Ionen über spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (VGCCs) in die Zelle und binden an benachbarte SK (engl.: small conductance) K^+ -Kanäle. K^+ -Ionen, die durch Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle aus der Zelle herausströmen, bewirken eine Hyperpolarisation des Membranpotenzials, so dass die Zelle gegenüber weiterer Depolarisation desensibilisiert wird. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel herauszufinden, ob der Verlust von PrP^{C} einen direkten Einfluss auf K^+ -Kanäle hat oder ob der Phänotyp der verminderten Nachhyperpolarisation der *Prnp*^{-/-}-Maus indirekt bedingt ist durch eine Störung der Ca^{2+} -Homöostase. Hinweise darauf lieferten bereits von der Arbeitsgruppe durchgeführte Studien an Purkinjezellen im vitalen Hirnschnitt und an kultivierten Körnerzellen von *Prnp*^{-/-}-Mäusen. Dabei wurde gezeigt, dass es nach Depolarisation zu einem verminderten Anstieg der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bei diesen Zellen von *Prnp*^{-/-}-Mäusen kommt (Herms et al. 2000; Herms et al. 2001). Kürzlich wurde auch an CHO Zellen, die mit verschiedenen Ca^{2+} -sensitiven Aequorin-Chimären transfiziert wurden, gezeigt, dass der Verlust von PrP^{C} die intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst (Brini et al. 2005).

Um zu klären, ob der Verlust von PrP einen direkten oder indirekten Einfluss auf die verminderte Nachhyperpolarisation ausübt, wurde zuerst der in hippocampalen CA1-Neuronen gefundene Phänotyp reproduziert (Kapitel 3.1.1, S.67). Im Gegensatz zu früheren Studien, die die elektrophysiologische Current-Clamp-Methode benutzten, wurde in der vorliegenden Arbeit mit der Voltage-Clamp-Konfiguration gearbeitet, die eine genaue Bestimmung und den Vergleich von Stromamplituden ermöglicht. CA1-Neurone des Hippocampus von *Prnp*^{-/-}-Mäusen zeigten eine signifikant verminderte späte Nachhyperpolarisation (Kapitel 3.1.1, S.67). Mit Hilfe der Methode des Ca^{2+} -Imagings (Kapitel 2.3.1, S.54) konnte gezeigt werden, dass CA1-Neurone des Hippocampus von Knockout-Mäusen einen verminderten Anstieg der freien Ca^{2+} -Konzentration nach Depolarisation aufweisen (Kapitel 3.1.2, S.69; Abb. 20, S.70). Dabei wurden die Depolarisationsbedingungen so gewählt, dass sie exakt denen entsprachen mit denen man nachweislich sI_{AHPs} auslöst. Dieses Ergebnis deutete stark daraufhin, dass der Verlust von PrP^{C} keinen direkten Einfluss etwa auf die Funktionalität der dem sI_{AHP} zugrunde liegenden K^+ -Kanäle ausübt. Vielmehr schien die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bereits gestört zu sein. Generell kann man sich drei verschiedene Mechanismen vorstellen, die durch den Verlust von PrP^{C} beeinflusst werden können. Zum einen könnte der Ca^{2+} -Einstrom von außen

über VGCCs verändert sein. Zweitens, könnte durch das Fehlen von PrP^C die Ca²⁺-vermittelte Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern oder deren Füllung gestört sein. Drittens könnte es zu einem Unterangebot von Ca²⁺ in der Zelle kommen. Denkbare Mechanismen dafür stellen verstärkte Bindung von Ca²⁺ an endogene Puffer und das Abpumpen von Ca²⁺ aus dem Zytosol über die Plasmamembran nach außen oder in andere Zellorganellen, dar. Die genaue lokale Analyse des Ca²⁺-Ladungstransfers (CT) in einer Zytosol- (CT_{Cyt}) und einer Membran-Schale (CT_{Mem}) in CA1-Neuronen zeigte, dass der Ladungstransfer in beiden Kompartimenten bei *Prnp*^{-/-}-Mäusen vermindert ist (Kapitel 3.1.2, S.69; Abb. 21, S.71). Dieses Ergebnis bedeutete, dass sowohl der Ca²⁺-Einstrom über die Membran, als auch der Ausstrom von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern als Ursache für verminderte *sI*_{AHP} Ströme in Hippocampus CA1-Neuronen von Prion-Protein Knockout-Mäusen in Frage kamen. Die Analyse der IP₃-vermittelten Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER von Purkinjezellen offenbarte, dass *Prnp*^{-/-}-Mäuse keine Defekte bei der Ausschüttung von Ca²⁺ aus dem ER aufweisen (Kapitel 3.1.3, S.72; Abb. 22, S.73). Auch wenn dieses Ergebnis nicht direkt auf CA1-Neurone des Hippocampus übertragbar ist, so entkräftet es doch die Hypothese, dass die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER gestört sei. Vielmehr kann auch der verminderte CT_{Cyt}-Wert Folge des schon kleineren CT_{Mem}-Wertes sein. Um die Rolle des Ca²⁺-Einstroms durch VGCCs zu beleuchten, wurde die Ca²⁺-Leitfähigkeit dieser Kanäle mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden untersucht (Kapitel 2.2.6, S.53). Schon der einfache Vergleich der *I/V*-Verhältnisse machte deutlich, dass Hippocampus-CA1-Neurone von *Prnp*^{-/-}-Mäusen einen signifikant verminderten Einstrom von Ca²⁺ durch VGCCs aufweisen (Kapitel 3.1.4, S. 73; Abb. 23C, S.75). Die weitere pharmakologische Analyse zeigte, dass der L-Typ-Kanal-Blocker Nifedipin den Ca²⁺-Strom durch VGCCs bei CA1-Neuronen von Wildtyp-Tieren stärker blockierte als bei *Prnp*^{-/-}-CA1-Neuronen (Kapitel 3.1.4, S. 73; Abb. 23C, D, S.75). Zusätzlich wiesen CA1-Neurone von *Prnp*^{+/+}-Mäusen eine signifikant größere inaktivierende Komponente auf als *Prnp*^{-/-}-CA1-Neurone (Kapitel 3.1.4, S. 73; Abb. 23A, E, S.75). Die inaktivierende Komponente (ΔX , Abb. 23A, S.75) wird hauptsächlich durch L-Typ-Kanäle vermittelt und kann deshalb auch mit Nifedipin blockiert werden. Vergleicht man den Einfluss von Nifedipin auf die inaktivierende Komponente von *Prnp*^{+/+}- und *Prnp*^{-/-}-CA1-Neuronen, so zeigt sich, dass ein viel größerer Teil der inaktivierenden Komponente bei Wildtyp- als bei Knockout-Tieren blockierbar ist (Abb. 23E, S.75). Dieses Ergebnis führt zu der Schlussfolgerung, dass CA1-Neurone von *Prnp*^{-/-}-Mäusen einen verminderten Einstrom von Ca²⁺ durch L-Typ-VGCCs aufweisen. Verminderter Einstrom von Ca²⁺ durch L-Typ-VGCCs stellt eine mögliche Ursache für die verminderten *sI*_{AHP} Ströme dar. Daraufhin stellt

sich sofort die Frage nach der Ursache für die verminderten Ca^{2+} -Leitfähigkeiten durch L-Typ-VGCCs. Exprimieren Knockout-Mäuse weniger L-Typ-VGCCs? Um diese Frage zu beantworten wurden mit Hilfe quantitativer RT-PCR die relativen mRNA-Expressionslevel von verschiedenen Kanaluntereinheiten spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle bestimmt (Kapitel 2.5.1, S.62). Weiterhin wurde die Proteinexpression mittels Westernblot analysiert (Kapitel 2.5.2, S.63/2.5.3, S.64). Bei der Analyse der mRNA-Expressionslevel wurden keine Unterschiede für die Poren bildenden Kanaluntereinheiten (*Cacna1c*, *Cacna1d*) und die regulatorischen β -Untereinheiten (*Cacnb2*, *3*, *4*) gefunden (Kapitel 3.1.5, S.76; Abb. 24A, S.77). Die Proteinexpression der Poren bildenden $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit war ebenfalls unverändert zwischen *Prnp*^{-/-} und *Prnp*^{+/+}-Hippocampus-Gewebe, jedoch wiesen *Prnp*^{-/-}-Hippocampi reproduzierbar erhöhte Level an $\beta 2$ -Untereinheiten auf (Kapitel 3.1.5, S.76; Abb. 24B, S.77). Die $\beta 2$ -Untereinheit steuert den Transport zur und den Einbau von Poren bildenden α -Untereinheiten in die Zellmembran. Dieser Prozess wird reguliert durch die PI3K/Akt-abhängige Phosphorylierung der $\beta 2$ -Untereinheit (Viard et al. 2004). Über diesen Prozess sind β -Untereinheiten auch in der Lage die Ca^{2+} -Leitfähigkeit von Zellen durch VGCCs zu beeinflussen (Dalton et al. 2005). Dieses Ergebnis passt zu einer anderen Studie aus unserer Arbeitsgruppe, die herausfand, dass die PrP^C-abhängige Aktivierung der PI3K (engl.: phosphatidylinositol 3 kinase) neuroprotektiv wirkt (Vassallo et al. 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Hirnlysate von *Prnp*^{-/-}-Mäusen eine verminderte PI3K-Aktivität aufwiesen (Vassallo et al. 2005). Theoretisch könnte eine verminderte PI3K-Aktivität bei *Prnp*^{-/-}-Mäusen, die bedingt ist durch fehlendes Signaling über PrP^C, zu einer verminderten Phosphorylierung von $\beta 2$ -Untereinheiten führen. Zu geringe Phosphorylierung der $\beta 2$ -Untereinheiten wiederum könnte dann eine kompensatorisch erhöhte Expression der $\beta 2$ -Untereinheiten bedingen. Die verstärkte Expression der $\beta 2$ -Untereinheit ist aufgrund verminderter PI3K-Aktivität und Phosphorylierung allerdings wirkungslos, so dass weniger $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheiten in die Membran eingebaut werden und es letztendlich zu einem verminderten Ca^{2+} -Einstrom über VGCCs kommt.

Auch in Zellen, die mit PrP^{Sc} infiziert wurden, konnte eine Verminderung von VGCCs Strömen nachgewiesen werden (Sandberg et al. 2004). Denkbar wäre die Möglichkeit, dass dieses Phänomen durch einen „loss of function“ Mechanismus zustande kommt. Dadurch, dass aggregiertes PrP^{Sc} die normale Funktion von PrP^C nicht mehr ausführt, zeigt sich ein ähnlicher Phänotyp wie in der vorliegenden Arbeit beobachtet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein direkter Effekt des Verlusts von PrP^C auf Ca²⁺-abhängige K⁺-Kanäle als Ursache für verminderte sI_{AHP} Ströme ausgeschlossen werden kann. Vielmehr scheint ein verminderter Ca²⁺-Einstrom über L-Typ-VGCCs die Ursache für den lange bekannten Phänotyp zu sein. Die Leitfähigkeit von L-Typ-VGCCs wird dabei möglicherweise von einer Signaltransduktionskaskade moduliert, in der ausgehend von PrP^C die PI3-Kinase und die $\beta 2$ -Untereinheit von VGCCs involviert sind.

4.2. Langzeit Plastizität von Spines und Varikositäten im Verlauf der Prionerkrankung

Die Entwicklung der 2-Photonen *in vivo* Mikroskopie (Denk et al. 1990) ermöglichte die Untersuchung von fluoreszierenden Hirnstrukturen über lange Zeiträume, bis hin zu vielen Monaten im lebenden Tier. Besondere Aufmerksamkeit galt von Beginn an dendritischen Spines. Dendritische Spines bilden die postsynaptische Seite einer Synapse und sind entlang der Dendriten von Neuronen als kleine Pilz- oder Türknopf-artige Fortsätze mit einer Größe von 1-3 μm zu finden (siehe auch Kapitel 1.9, S.34; Abb. 8A, S.37). Die ersten Arbeiten mit 2-Photonen Intravitalmikroskopie an transgenen Mäusen von GRUTZENDLER UND TRACHTENBERG befassten sich mit der Frage der Stabilität von Spines. Werden Spines neu gebildet? Bleiben ein und dieselben Spines stabil? GRUTZENDLER fand heraus, dass junge sich entwickelnde Tiere einen hohen Spine-Umsatz besitzen, während Spines bei älteren Tieren eher stabil sind (Grutzendler et al. 2002). HOLTMAAT untersuchte ebenfalls, wie die Änderung der Spine-Plastizität während der Entwicklung von Mäusen nach der Geburt bis hin zum Erwachsenenalter verläuft. Auch hier wurde gefunden, dass junge Mäuse höhere Umsatzraten zeigen als ältere (Holtmaat et al. 2005). TRACHTENBERG untersuchte, ob es in Abhängigkeit von Lernen oder Erfahrungen zu Veränderungen an Spines kommt. Dabei wurde herausgefunden, dass es bei Mäusen, denen die Schnurrhaare gestutzt wurden, zu Erfahrungs-abhängiger Steigerung der Spine-Umsatzraten kommt (Trachtenberg et al. 2002). Die grundlegende Frage, die hinter diesen Untersuchungen steckte war immer, ob Spines ein morphologisches Korrelat für Lernen und Erfahrung darstellen. Anders gefragt: „Werden beim Lernen neue Synapsen hinzugefügt, weggenommen oder bleiben sie stabil?“ Können dann auf diese Weise neue Verbindungen zwischen Neuronen geknüpft werden und entsprechen diese neuen Verknüpfungen dann neu erlernten Sachverhalten? Die ersten Untersuchungen legten diesen Schluss nahe. Aus diesen Studien ergaben sich dann schnell neue Fragen. Was passiert zum Beispiel mit Spines wenn das Denken nicht mehr

richtig funktioniert, wie bei der Alzheimer-Krankheit. TSAI untersuchte dendritische Spines in der Nähe von Alzheimer-Plaques in transgenen Mäusen, die für die Alzheimer-Krankheit typische Mutationen aufwiesen, und fand, dass es zu einer Verminderung der Spine-Dichte an Dendriten kommt, die durch Plaques verlaufen. Außerdem beobachtete sie, dass sich in der Nähe von Plaques vermehrt Varikositäten finden (Tsai et al. 2004). Ähnliche Beobachtungen wurden von SPIRES gemacht (Spires et al. 2005). Diese Studien legen nahe, dass Alzheimer-Plaques neurotoxisch wirken und die daraus resultierende Neurodegeneration zu dem für die Alzheimer-Krankheit typischen Gedächtnisverlust führt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kinetik der strukturellen Spine-Plastizität während der Prionerkrankung im transgenen Mausmodell mit Hilfe der 2-Photonen Intravitalmikroskopie erstmals untersucht. Dabei erlaubte es diese Technik dieselben dendritische Elemente und Spines über Zeiträume von bis zu drei Monaten wiederholt im Verlauf der Prionerkrankung morphologisch zu untersuchen.

Als erstes wurden dazu Akut-Experimente (Kapitel 2.1, S.39) durchgeführt. Scrapie-infizierte YFP-exprimierende Mäuse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (100 und 130 dpi) über einen Zeitraum von drei Stunden intravitalmikroskopisch untersucht und am Ende des Experiments getötet. Diese Untersuchung sollte klären, ob die kurzzeitige Spine-Plastizität während der symptomatischen im Vergleich zur präsymptomatischen Krankheitsphase verschieden ist. Es zeigte sich, dass Spine-Dichte, Dendriten-Durchmesser und Varikositäten-Dichte über einen Zeitraum von drei Stunden sowohl in der prä- als auch in der symptomatischen Krankheitsphase stabil blieben (Abb. 26, S.81). Allerdings wiesen Scrapie-infizierte Mäuse während der symptomatischen Krankheitsphase, im Gegensatz zur präsymptomatischen Phase, verminderte Spine-Dichte, Dendriten-Durchmesser und erhöhte Varikositäten-Dichte auf (Abb. 25, S.79).

Die Analyse der Spine-Plastizität von 100 bis 145 dpi der Prionerkrankung zeigte, dass es zu einer kontinuierlichen Abnahme der Spine-Dichte während des gesamten Krankheitsverlaufs kommt (Abb. 27D, S.85). Betrachtet man die Spine-Umsatzrate (dTOR), die ein Maß für Gewinn und Verlust an Spines darstellt, so stellt man fest, dass diese mit Beginn der symptomatischen Phase ansteigt (Abb. 27E, S.85). Grund dafür ist jedoch nicht ein vermehrter Verlust von Spines, sondern ein leicht gestiegener Anteil an neu hinzukommenden Spines ab 120 dpi (vgl. Abb. 27F, G). Erst ab 135 dpi steigt der Spine-Verlustanteil so stark an, dass der Spine-Verlust durch neu hinzukommende Spines nicht mehr ausgeglichen werden kann. Dieses Ergebnis führte zu dem Schluss, dass mit dem Beginn der symptomatischen Phase ein kritischer Punkt der Prionerkrankung erreicht ist. Scheinbar setzen Neurone dem

fortschreitenden Spine-Verlust eine vermehrte Bildung neuer Spines entgegen. Allerdings ist diese Reaktion nicht erfolgreich, um den Spine-Verlust zu kompensieren. Dieses Ergebnis zeigt auch, dass Mechanismen der Spine-Neubildung während der Prionerkrankung nicht beeinträchtigt zu sein scheinen. Die Analyse transienter (Präsenz ≤ 4 Tage) und persistierender Spines (Präsenz ≥ 8 Tage) im Verlauf der Erkrankung führte zu einem weiteren interessanten Ergebnis. Während der Erkrankung nimmt besonders die Dichte persistierender Spines ab, während die Dichte transienter Spines konstant bleibt (Tabelle 8, S.86). Persistierende Spines repräsentieren intakte neuronale Verbindungen. So konnte KNOTT erst kürzlich zeigen, dass transiente Spines nur selten eine Synapse bilden, weil der präsynaptische Eingang fehlt. Im Gegensatz dazu bilden alle persistierenden Spines eine Synapse aus (Knott et al. 2006). Außerdem konnte HOLTMAAT (2006) zeigen, dass der Anteil persistierender Spines abnimmt, wenn man die Schnurrhaare von Mäusen trimmt. Dabei kommt es anschließend zu einer vermehrten Neubildung von persistierenden Spines, die den Verlust aufwiegen (Holtmaat et al. 2006). Der Verlust persistierender Spines während der Prionerkrankung könnte demnach Ursache für die auftretenden neurologischen Defizite sein. Ebenso kann man sich vorstellen, dass vermehrt präsynaptische Kontakte während der Erkrankung verloren gehen, sodass es zum Verlust von persistierenden Spines kommt. Die Degeneration der Präsynapse wäre demnach zeitlich vor dem der postsynaptischen Spines anzusiedeln. Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Präsynapse vor den Spines verloren geht stellt die vermehrte Bildung neuer Spines von 120 bis 140 dpi dar (Abb. 27F, S.85).

Neben der Spine-Plastizität wurde auch die Plastizität von Varikositäten im Verlauf der Prionerkrankung analysiert. Bei einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit tauchten sie vermehrt in der Nähe von Plaques auf (Tsai et al. 2004). Varikositäten wurden auch bei Scrapie-infizierten Hamstern (Hogan et al. 1987), Mäusen (Belichenko et al. 2000; Brown et al. 2001) und auch beim Menschen beschrieben (Ferrer et al. 1981). Es wird vermutet, dass Varikositäten Vorformen der für TSEs typischen Vakuolen darstellen. Bei der Analyse der Kinetik der strukturellen Varikositäten-Plastizität zeigte sich, dass ein großer Teil ($61 \pm 5\%$; Kapitel 3.2.3, S.87), der im Verlauf der Prionerkrankung gebildeten Varikositäten, während der präsymptomatischen Phase gebildet wird und anschließend bis zum Ende der Erkrankung persistiert ($90 \pm 2,7\%$; Kapitel 3.2.3, S.87). Während der symptomatischen Phase erreicht die Varikositäten-Dichte ein Plateau (Abb. 28, S.88). Das bedeutet, dass das Auftreten von Varikositäten zeitlich vor dem starken Spine-Verlust in der symptomatischen Phase stattfindet. Um den Zusammenhang zwischen Spine-Verlust und Varikositäten-Gewinn genauer zu untersuchen, wurden beide Phänomene gemeinsam betrachtet. Dabei stellte sich

heraus, dass $72 \pm 4\%$ aller während der präsymptomatischen Phase gebildeten Varikositäten an Stellen am Dendriten entstehen, an denen sich Spines befinden (spine-gained Varikositäten; Abb. 29C, S.90). Bemerkenswerterweise entstehen $75 \pm 6\%$ aller während des gesamten Untersuchungszeitraums gebildeten spine-gained Varikositäten während der präsymptomatischen Phase. Varikositäten, die am Dendriten gebildet werden, wo sich keine Spines befinden (dendrite-gained Varikositäten, Abb. 29D, S.90) treten selten während der präsymptomatischen und etwas häufiger in der symptomatischen Krankheitsphase auf (Abb. 29D, S.90). Die Analyse der an Varikositäten verschwindenden Spines zeigte, dass diese nur selten während der präsymptomatischen Phase verloren gehen. Mit dem Beginn der symptomatischen Phase, verschwinden Spines vermehrt an Varikositäten mit einem Maximum bei 130 dpi (Abb. 29E, S.90). Fasst man diese Befunde zusammen, so ergibt sich folgendes Bild: Während der präsymptomatischen Phase der Prionerkrankung entstehen Varikositäten an Stellen des Dendriten, wo sich Spines befinden. Anschließend verschwinden während der symptomatischen Phase vermehrt Spines an genau den Stellen, an denen zuvor Varikositäten gebildet wurden. Dass Varikositäten auftreten bevor Spines verloren gehen, lässt auf einen kausalen Zusammenhang schließen. Möglicherweise bedingen Varikositäten den Verlust von Spines. Der Verlust persistierender Spines, die nachweislich immer eine Verbindung zu einem präsynaptischen Bouton aufweisen (Holtmaat et al. 2006), deutet darauf hin, dass möglicherweise eine Degeneration der Präsynapse dem Untergang von postsynaptischen Spines vorangeht. Weiterhin zeigt der Verlust persistierender Spines, dass vorher intakte Verbindungen zwischen Neuronen verloren gehen, die unter nicht-pathologischen Umständen mutmaßlich bis ans Lebensende bestanden hätten. Das Auflösen intakter neuronaler Verbindungen könnte die Ursache für die auftretenden neurologischen Defizite darstellen. Die Untersuchung hat zu einer detaillierten Kenntnis der Kinetik der strukturellen Plastizität von Spines und Varikositäten während der Prionerkrankung geführt und dient nun als Grundlage für die weitere Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Funktion des Prion-Proteins und die strukturelle Spine-Plastizität während der Prionerkrankung untersucht. Die Analyse hippocampaler CA1-Neurone von *Prnp*^{-/-}-Mäusen zeigte, dass der Phänotyp der verminderten späten Nachhyperpolarisation (sI_{AHP}) zurückzuführen ist auf eine verminderte intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration. Damit wurde ausgeschlossen, dass der Verlust von PrP^C einen direkten Einfluss auf die dem sI_{AHP} zugrunde liegenden K^+ -Kanäle hat. Vielmehr wurde herausgefunden, dass bereits der Einstrom von Ca^{2+} über L-Typ-VGCCs bei Knockout-Mäusen vermindert ist und die Ursache für verminderte sI_{AHP} K^+ -Ströme darstellt. Weiterhin wiesen Hippocampi von *Prnp*^{-/-}-Mäuse eine höhere Expression regulatorischer $\beta 2$ -Untereinheiten auf, die für den Einbau von Poren bildenden VGCC α -Untereinheiten verantwortlich sind. Dieses Phänomen ist möglicherweise Folge der verminderten PI3K-Aktivität im Gehirn von *Prnp*^{-/-}-Mäusen. Verringerte PI3K-Aktivität, die bedingt ist durch fehlende Signaltransduktion über PrP^C, führt wahrscheinlich zu eingeschränkter Phosphorylierung der $\beta 2$ -Untereinheiten, was wiederum eine kompensatorische Erhöhung der Expression derselben bedingen könnte. Die verstärkte Expression der $\beta 2$ -Untereinheit ist aufgrund verminderter PI3K-Aktivität und Phosphorylierung allerdings wirkungslos, so dass weniger $\alpha 1C$ -Untereinheiten in die Membran eingebaut werden und es letztendlich zu einem verminderten Ca^{2+} -Einstrom über VGCCs kommt. Demnach besäße PrP^C eine Signaltransduktions-Funktion, die die Dichte von VGCCs in der Membran über PI3K und $\beta 2$ -Untereinheiten moduliert und so maßgeblich die synaptische Übertragung beeinflusst.

Die Analyse der strukturellen Spine-Plastizität im Verlauf der Prionerkrankung mit 2-Photonen Intravitalmikroskopie lieferte erstmals einen genauen zeitlichen Ablauf der räumlichen und zeitlichen Kinetik der Neurodegeneration. Spine-Verlust ist ein langsamer Prozess, der über Tage bis Wochen verläuft und während der gesamten Krankheitsphase stattfindet. Zu Beginn der symptomatischen Phase kommt es zu einer vermehrten Bildung von Spines, die aber den starken Verlust nicht kompensiert. Varikositäten entstehen vorwiegend während der präsymptomatischen Phase, wobei $72 \pm 4\%$ an Stellen des Dendriten entstehen, an denen sich Spines befinden. Anschließend degenerierten Spines während der symptomatischen Phase an genau den Stellen, wo vorher Varikositäten entstanden waren. Dieser Befund deutet auf einen kausalen Zusammenhang zwischen Varikositäten-Bildung und Spine-Verlust hin. Besonders persistierende Spines degenerierten im Verlauf der Prionerkrankung. Da persistierende Spines intakte über Monate stabile neuronale Verbindungen repräsentieren, könnte der Verlust persistierender Spines die Ursache für die auftretenden neurologischen Symptome darstellen. Persistierende Spines bilden stets intakte Synapsen, so dass angenommen werden kann, dass dem Verlust persistierender Spines die Degeneration präsynaptischer Endigungen vorangeht.

6. Literatur

Abbott J. R. and Litzinger M. J. (1994) Different omega-conotoxins mark the development of Swiss Webster mouse cortex suggesting N-type voltage sensitive calcium channel subtypes. *Int J Dev Neurosci* **12**, 43-47.

Alger B. E. and Nicoll R. A. (1980) Epileptiform burst afterhyperpolarization: calcium-dependent potassium potential in hippocampal CA1 pyramidal cells. *Science* **210**, 1122-1124.

Alper T. (1985) Scrapie agent unlike viruses in size and susceptibility to inactivation by ionizing or ultraviolet radiation. *Nature* **317**, 750.

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.

Alper T., Haig D. A., and Clarke M. C. (1966) The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun* **22**, 278-284.

Anderson R. M., Donnelly C. A., Ferguson N. M., Woolhouse M. E., Watt C. J., Udy H. J., MaWhinney S., Dunstan S. P., Southwood T. R., Wilesmith J. W., Ryan J. B., Hoinville L. J., Hillerton J. E., Austin A. R., and Wells G. A. (1996) Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* **382**, 779-788.

Aronoff-Spencer E., Burns C. S., Avdievich N. I., Gerfen G. J., Peisach J., Antholine W. E., Ball H. L., Cohen F. E., Prusiner S. B., and Millhauser G. L. (2000) Identification of the Cu²⁺ binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy. *Biochemistry* **39**, 13760-13771.

Asante E. A., Li Y. G., Gowland I., Jefferys J. G., and Collinge J. (2004) Pathogenic human prion protein rescues PrP null phenotype in transgenic mice. *Neurosci Lett* **360**, 33-36.

Avery R. B. and Johnston D. (1996) Multiple channel types contribute to the low-voltage-activated calcium current in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J Neurosci* **16**, 5567-5582.

Baker H. F., Ridley R. M., and Wells G. A. (1993) Experimental transmission of BSE and scrapie to the common marmoset. *Vet Rec* **132**, 403-406.

- Barrow P. A., Holmgren C. D., Tapper A. J., and Jeffrey J. G. R. (1999) Intrinsic physiological and morphological properties of principal cells of the hippocampus and neocortex in hamsters infected with scrapie. *Neurobiol Disease* **6**, 406-423.
- Barry R. A., Kent S. B., McKinley M. P., Meyer R. K., DeArmond S. J., Hood L. E., and Prusiner S. B. (1986) Scrapie and cellular prion proteins share polypeptide epitopes. *J Infect Dis* **153**, 848-854.
- Bartz J. C., McKenzie D. I., Bessen R. A., Marsh R. F., and Aiken J. M. (1994) Transmissible mink encephalopathy species barrier effect between ferret and mink: PrP gene and protein analysis. *J Gen Virol* **75**, 2947-2953.
- Basler K., Oesch B., Scott M., Westaway D., Walchli M., Groth D. F., McKinley M. P., Prusiner S. B., and Weissmann C. (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**, 417-28.
- Bean B. P. (1991) Pharmacology of calcium channels in cardiac muscle, vascular muscle, and neurons. *Am J Hypertens* **4**, 406S-411S.
- Belichenko P. V., Brown D., Jeffrey M., and Fraser J. R. (2000) Dendritic and synaptic alterations of hippocampal pyramidal neurones in scrapie-infected mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* **26**, 143-149.
- Bendheim P. E., Barry R. A., DeArmond S. J., Stites D. P., and Prusiner S. B. (1984) Antibodies to a scrapie prion protein. *Nature* **310**, 418-421.
- Bendheim P. E., Brown H. R., Rudelli R. D., Scala L. J., Goller N. L., Wen G. Y., Kascak R. J., Cashman N. R., and Bolton D. C. (1992) Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* **42**, 149-156.
- Birnbaumer L., Campbell K. P., Catterall W. A., Harpold M. M., Hofmann F., Horne W. A., Mori Y., Schwartz A., Snutch T. P., Tanabe T., and . (1994) The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **13**, 505-506.

- Bolton D. C., McKinley M. P., and Prusiner S. B. (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**, 1309-1311.
- Bolton D. C., Meyer R. K., and Prusiner S. B. (1985) Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein. *J Virol* **53**, 596-606.
- Borchelt D. R., Scott M., Taraboulos A., Stahl N., and Prusiner S. B. (1990) Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* **110**, 743-752.
- Bosque P. J., Ryou C., Telling G., Peretz D., Legname G., DeArmond S. J., and Prusiner S. B. (2002) Prions in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 3812-3817.
- Bourinet E., Zamponi G. W., Stea A., Soong T. W., Lewis B. A., Jones L. P., Yue D. T., and Snutch T. P. (1996) The alpha 1E calcium channel exhibits permeation properties similar to low-voltage-activated calcium channels. *J Neurosci* **16**, 4983-4993.
- Bouso P. and Robey E. A. (2004) Dynamic behavior of T cells and thymocytes in lymphoid organs as revealed by two-photon microscopy. *Immunity* **21**, 349-355.
- Bowden S. E., Fletcher S., Loane D. J., and Marrion N. V. (2001) Somatic colocalization of rat SK1 and D class (Ca(v)1.2) L-type calcium channels in rat CA1 hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* **21**, RC175.
- Bradley R. and Wilesmith J. W. (1993) Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Br Med Bull* **49**, 932-959.
- Brandner S., Isenmann S., Raeber A., Fischer M., Sailer A., Kobayashi Y., Marino S., Weissmann C., and Aguzzi A. (1996) Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* **379**, 339-343.
- Brini M., Miuzzo M., Pierobon N., Negro A., and Sorgato M. C. (2005) The prion protein and its paralogue doppel affect calcium signaling in chinese hamster ovary cells. *Mol Biol Cell* **16**, 2799-2808.

Brotherston J. G., Renwick C. C., Stamp J. T., Zlotnik I., and Pattison I. H. (1968) Spread and scrapie by contact to goats and sheep. *J Comp Pathol* **78**, 9-17.

Brown D., Belichenko P., Sales J., Jeffrey M., and Fraser J. R. (2001) Early loss of dendritic spines in murine scrapie revealed by confocal analysis. *Neuroreport* **12**, 179-183.

Brown D. R. and Besinger A. (1998) Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J* **334**, 423-429.

Brown D. R., Qin K., Herms J. W., Madlung A., Manson J., Strome R., Fraser P. E., Kruck T., von Bohlen A., Schulz-Schaeffer W., Giese A., Westaway D., and Kretzschmar H. (1997a) The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**, 684-687.

Brown D. R., Schmidt B., and Kretzschmar H. A. (1996) A neurotoxic prion protein fragment enhances proliferation of microglia but not astrocytes in culture. *Glia* **18**, 59-67.

Brown D. R., Schulz-Schaeffer W. J., Schmidt B., and Kretzschmar H. A. (1997b) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* **146**, 104-112.

Bruce M. E., Chree A., McConnell I., Foster J., Pearson G., and Fraser H. (1994) Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **343**, 405-411.

Bruce M. E., Will R. G., Ironside J. W., McConnell I., Drummond D., Suttie A., McCardle L., Chree A., Hope J., Birkett C., Cousens S., Fraser H., and Bostock C. J. (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**, 498-501.

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.

Burns C. S., Aronoff-Spencer E., Dunham C. M., Lario P., Avdievich N. I., Antholine W. E., Olmstead M. M., Vrieling A., Gerfen G. J., Peisach J., Scott W. G., and Millhauser G. L. (2002) Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein. *Biochemistry* **41**, 3991-4001.

Burns C. S., Aronoff-Spencer E., Legname G., Prusiner S. B., Antholine W. E., Gerfen G. J., Peisach J., and Millhauser G. L. (2003) Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein. *Biochemistry* **42**, 6794-6803.

Cahalan M. D., Parker I., Wei S. H., and Miller M. J. (2003) Real-time imaging of lymphocytes in vivo. *Curr Opin Immunol* **15**, 372-377.

Calabrese B., Wilson M. S., and Halpain S. (2006) Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology (Bethesda)* **21**, 38-47.

Calzolari L., Lysek D. A., Guntert P., von Schroetter C., Riek R., Zahn R., and Wuthrich K. (2000) NMR structures of three single-residue variants of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8340-5.

Calzolari L., Lysek D. A., Perez D. R., Guntert P., and Wuthrich K. (2005) Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 651-655.

Calzolari L. and Zahn R. (2003) Influence of pH on NMR structure and stability of the human prion protein globular domain. *J Biol Chem* **278**, 35592-35596.

Capellari S., Vital C., Parchi P., Petersen R. B., Ferrer X., Jarnier D., Pegoraro E., Gambetti P., and Julien J. (1997) Familial prion disease with a novel 144-bp insertion in the prion protein gene in a Basque family. *Neurology* **49**, 133-141.

Carleton A., Tremblay P., Vincent J. D., and Lledo P. M. (2001) Dose-dependent, prion protein (PrP)-mediated facilitation of excitatory synaptic transmission in the mouse hippocampus. *Pflugers Arch* **442**, 223-229.

Caroni P. (1997) Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J Neurosci Methods* **71**, 3-9.

Cashman N. R., Loertscher R., Nalbantoglu J., Shaw I., Kascsak R. J., Bolton D. C., and Bendheim P. E. (1990) Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* **61**, 185-192.

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

Catterall W. A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 521-555.

Caughey B., 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.

Caughey B., Race R. E., Ernst D., Buchmeier M. J., and Chesebro B. (1989) Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol* **63**, 175-181.

Caughey B., Race R. E., Vogel M., Buchmeier M. J., and Chesebro B. (1988) In vitro expression in eukaryotic cells of a prion protein gene cloned from scrapie-infected mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 4657-4661.

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.

Chesebro B., Race R., Wehrly K., Nishio J., Bloom M., Lechner D., Bergstrom S., Robbins K., Mayer L., Keith J. M., Garon C., and Haase A. (1985) Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* **315**, 331-333.

Chesebro B., Trifilo M., Race R., Meade-White K., Teng C., LaCasse R., Raymond L., Favara C., Baron G., Priola S., Caughey B., Masliah E., and Oldstone M. (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* **308**, 1435-1439.

Chiesa R. and Harris D. A. (2001) Prion diseases: what is the neurotoxic molecule? *Neurobiol Dis* **8**, 743-763.

Cloues R. K., Tavalin S. J., and Marrion N. V. (1997) Beta-adrenergic stimulation selectively inhibits long-lasting L-type calcium channel facilitation in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* **17**, 6493-6503.

Colling S. B., Collinge J., and Jefferys J. G. (1996) Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K⁺ currents. *Neurosci Lett* **209**, 49-52.

Colling S. B., Khana M., Collinge J., and Jefferys J. G. (1997) Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. *Brain Res* **755**, 28-35.

Collinge J., Palmer M. S., Sidle K. C., Hill A. F., Gowland I., Meads J., Asante E., Bradley R., Doey L. J., and Lantos P. L. (1995) Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature* **378**, 779-783.

Collinge J., 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., Whittington M. A., Sidle K. C., Smith C. J., Palmer M. S., Clarke A. R., and Jefferys J. G. (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**, 295-297.

Creutzfeldt H. G. (1920) Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Ges Neurol Psychiatr* **57**, 1-18.

Criado J. R., Sanchez-Alavez M., Conti B., Giacchino J. L., Wills D. N., Henriksen S. J., Race R., Manson J. C., Chesebro B., and Oldstone M. B. (2005) Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol Dis* **19**, 255-265.

Cuillé J. and Chelle P. L. (1936) La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *C R Acad Sci Paris* **203**, 1552-1554.

Dalton S., Takahashi S. X., Miriyala J., and Colecraft H. M. (2005) A single CaVbeta can reconstitute both trafficking and macroscopic conductance of voltage-dependent calcium channels. *J Physiol* **567**, 757-769.

De Paola V., Holtmaat A., Knott G., Song S., Wilbrecht L., Caroni P., and Svoboda K. (2006) Cell type-specific structural plasticity of axonal branches and boutons in the adult neocortex. *Neuron* **49**, 861-875.

Degioia L., Selvaggini C., Ghibaudi E., Diomede L., Bugiani O., Forloni G., Tagliavini F., and Salmona M. (1994) Conformational polymorphism of the amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. *J Biol Chem* **269**, 7859-7862.

Denk W., Strickler J. H., and Webb W. W. (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**, 73-76.

Denk W. and Svoboda K. (1997) Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron* **18**, 351-357.

Dickinson A. G., Stamp J. T., and Renwick C. C. (1974) Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *J Comp Pathol* **84**, 19-25.

Diringer H., Beekes M., and Oberdieck U. (1994) The nature of the scrapie agent: the virus theory. *Ann N Y Acad Sci* **724**, 246-258.

Diringer H., Braig H. R., and Czub M. (1988) Scrapie: a virus-induced amyloidosis of the brain. *Ciba Found Symp* **135**, 135-145.

Diringer H., Gelderblom H., Hilmert H., Ozel M., Edelbluth C., and Kimberlin R. H. (1983) Scrapie infectivity, fibrils and low molecular weight protein. *Nature* **306**, 476-478.

Dodelet V. C. and Cashman N. R. (1998) Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood* **91**, 1556-1561.

Donne D. G., Viles J. H., Groth D., Mehlhorn I., James T. L., Cohen F. E., Prusiner S. B., Wright P. E., and Dyson H. J. (1997) Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 13452-13457.

Eilers J., Callewaert G., Armstrong C., and Konnerth A. (1995) Calcium signaling in a narrow somatic submembrane shell during synaptic activity in cerebellar Purkinje neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10272-10276.

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.

Ertel S. I., Ertel E. A., and Clozel J. P. (1997) T-type Ca²⁺ channels and pharmacological blockade: potential pathophysiological relevance. *Cardiovasc Drugs Ther* **11**, 723-739.

Feng G., Mellor R. H., Bernstein M., Keller-Peck C., Nguyen Q. T., Wallace M., Nerbonne J. M., Lichtman J. W., and Sanes J. R. (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* **28**, 41-51.

Ferrer I., Costa F., and Grau Veciana J. M. (1981) Creutzfeldt-Jacob disease: a golgi study. *Neuropathol Appl Neurobiol* **7**, 237-242.

Fiala J. C., Spacek J., and Harris K. M. (2002) Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev* **39**, 29-54.

Finch E. A. and Augustine G. J. (1998) Local calcium signalling by inositol-1,4,5-trisphosphate in Purkinje cell dendrites. *Nature* **396**, 753-756.

- Fischer M., Rulicke T., Raeber A., Sailer A., Moser M., Oesch B., Brandner S., Aguzzi A., and Weissmann C. (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* **15**, 1255-1264.
- Florio T., Grimaldi M., Scorziello A., Salmona M., Bugiani O., Tagliavini F., Forloni G., and Schettini G. (1996) Intracellular calcium rise through L-type calcium channels, as molecular mechanism for prion protein fragment 106-126-induced astroglial proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* **228**, 397-405.
- Florio T., Thellung S., Amico C., Robello M., Salmona M., Bugiani O., Tagliavini F., Forloni G., and Schettini G. (1998) Prion protein fragment 106-126 induces apoptotic cell death and impairment of L-type voltage-sensitive calcium channel activity in the GH3 cell line. *Journal of Neuroscience Research* **54**, 341-352.
- Forloni G., Angeretti N., Chiesa R., Monzani E., Salmona M., Bugiani O., and Tagliavini F. (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* **362**, 543-546.
- Foster J. D., Hope J., and Fraser H. (1993) Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet Rec* **133**, 339-341.
- Gabizon R., McKinley M. P., Groth D., and Prusiner S. B. (1988) Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 6617-6621.
- Gabriel J. M., Oesch B., Kretzschmar H., Scott M., and Prusiner S. B. (1992) Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 9097-9101.
- Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Jr., and Alpers M. (1967) Transmission and passage of experimental "kuru" to chimpanzees. *Science* **155**, 212-214.
- Gasset M., Baldwin M. A., Fletterick R. J., and Prusiner S. B. (1993) Perturbation of the secondary structure of the scrapie prion protein under conditions that alter infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 1-5.
- Gerstmann J. (1928) Über ein noch nicht beschriebenes Reflexphänomen bei einer Erkrankung des zerebellären Systems. *Wien Medizin Wochenschr* **78**, 906-908.

Gerstmann J., Strüssler E., and Scheinker I. (1936) Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems; zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z Ges Neurol Psychiatr* **154**, 736-762.

Gibbons R. A. and Hunter G. D. (1967) Nature of the scrapie agent. *Nature* **215**, 1041-1043.

Giese A., Brown D. R., Groschup M., Feldmann C., Haist I., and Kretzschmar H. A. (1998) Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol* **8**, 449-457.

Giese A. and Kretzschmar H. A. (2001) Prion-induced neuronal damage--the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies. *Curr Top Microbiol Immunol* **253**, 203-217.

Goepfert-Mayer M. (1931) *Ann Physik* **9**, 273.

Goldfarb L. G., Brown P., McCombie W. R., Goldgaber D., Swergold G. D., Wills P. R., Cervenakova L., Baron H., Gibbs C. J., Jr., and Gajdusek D. C. (1991) Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 10926-10930.

Gordon J. W., Chesa P. G., Nishimura H., Rettig W. J., Maccari J. E., Endo T., Seravalli E., Seki T., and Silver J. (1987) Regulation of Thy-1 gene expression in transgenic mice. *Cell* **50**, 445-452.

Gossert A. D., Bonjour S., Lysek D. A., Fiorito F., and Wuthrich K. (2005) Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 646-650.

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 USA* **101**, 8342-8347.

Griffith J. S. (1967) Self-replication and scrapie. *Nature* **215**, 1043-1044.

Grutzendler J., Kasthuri N., and Gan W. B. (2002) Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature* **420**, 812-816.

Hadlow W. J. (1959) Scrapie and kuru. *Lancet* **2**, 289-290.

Hagiwara N., Irisawa H., and Kameyama M. (1988) Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* **395**, 233-253.

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

Harris D. A., Lele P., and Snider W. D. (1993) Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 4309-4313.

Harris D. A. and True H. L. (2006) New insights into prion structure and toxicity. *Neuron* **50**, 353-357.

Hartsough G. R. and Burger D. (1965) Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis* **115**, 387-392.

Hasbani M. J., Viquez N. M., and Goldberg M. P. (2001) NMDA receptors mediate hypoxic spine loss in cultured neurons. *Neuroreport* **12**, 2731-2735.

Helmchen F. and Denk W. (2002) New developments in multiphoton microscopy. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 593-601.

Helmchen F. and Denk W. (2005) Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* **2**, 932-940.

Helmchen F., Fee M. S., Tank D. W., and Denk W. (2001) A miniature head-mounted two-photon microscope. high-resolution brain imaging in freely moving animals. *Neuron* **31**, 903-912.

Herms J., Tings T., Gall S., Madlung A., Giese A., Siebert H., Schurmann P., Windl O., Brose N., and Kretzschmar H. (1999) Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* **19**, 8866-75.

- Herms J. W., Korte S., Gall S., Schneider I., Dunker S., and Kretzschmar H. A. (2000) Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. *J Neurochem* **75**, 1487-1492.
- Herms J. W., Kretzschmar H. A., Titz S., and Keller B. U. (1995) Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar purkinje cells of prion protein knockout mice. *Eur J Neurosci* **7**, 2508-2512.
- Herms J. W., Madlung A., Brown D. R., and Kretzschmar H. A. (1997) Increase of intracellular free Ca²⁺ in microglia activated by prion protein fragment. *Glia* **21**, 253-257.
- Herms J. W., Tings T., Dunker S., and Kretzschmar H. A. (2001) Prion protein affects Ca²⁺-activated K⁺ currents in cerebellar purkinje cells. *Neurobiol Dis* **8**, 324-330.
- Hill A. F., Desbruslais M., Joiner S., Sidle K. C., Gowland I., Collinge J., Doey L. J., and Lantos P. (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**, 448-50, 526.
- Hocherman S. D., Werman R., and Yarom Y. (1992) An analysis of the long-lasting after-hyperpolarization of guinea-pig vagal motoneurons. *J Physiol* **456**, 325-349.
- Hogan R. N., Baringer J. R., and Prusiner S. B. (1987) Scrapie infection diminishes spines and increases varicosities of dendrites in hamsters: a quantitative Golgi analysis. *J Neuropathol Exp Neurol* **46**, 461-473.
- Holtmaat A., Wilbrecht L., Knott G. W., Welker E., and Svoboda K. (2006) Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature* **441**, 979-983.
- Holtmaat A. J., Trachtenberg J. T., Wilbrecht L., Shepherd G. M., Zhang X., Knott G. W., and Svoboda K. (2005) Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron* **45**, 279-291.
- Horiuchi M., Ishiguro N., Nagasawa H., Toyoda Y., and Shinagawa M. (1998) Genomic structure of the bovine PrP gene and complete nucleotide sequence of bovine PrP cDNA. *Anim Genet* **29**, 37-40.

Hornemann S. and Glockshuber R. (1996) Autonomous and reversible folding of a soluble amino-terminally truncated segment of the mouse prion protein. *J Mol Biol* **261**, 614-619.

Hornemann S., Korth C., Oesch B., Riek R., Wider G., Wuthrich K., and Glockshuber R. (1997) Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Lett* **413**, 277-281.

Hornemann S., Schorn C., and Wuthrich K. (2004) NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains. *EMBO Rep* **5**, 1159-1164.

Hörnlimann, B., Riesner, D., and Kretzschmar, H. Prionen und Prionerkrankungen. 2001. Berlin - New York, Walter de Gruyter.

Ref Type: Generic

Hornshaw M. P., McDermott J. R., and Candy J. M. (1995) Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* **207**, 621-629.

Hotson J. R. and Prince D. A. (1980) A calcium-activated hyperpolarization follows repetitive firing in hippocampal neurons. *J Neurophysiol* **43**, 409-419.

Houston F., Foster J. D., Chong A., Hunter N., and Bostock C. J. (2000) Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* **356**, 999-1000.

Huang Z., Gabriel J. M., Baldwin M. A., Fletterick R. J., Prusiner S. B., and Cohen F. E. (1994) Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 7139-7143.

Huang Z., Prusiner S. B., and Cohen F. E. (1995) Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Fold Des* **1**, 13-19.

Ironside J. W., Sutherland K., Bell J. E., McCardle L., Barrie C., Estebeiro K., Zeidler M., and Will R. G. (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease: neuropathological and clinical features. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **61**, 523-530.

- Ito M. (1984) The modifiable neuronal network of the cerebellum. *Jpn J Physiol* **34**, 781-792.
- Jakob A. M. (1921a) Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (Spastische Pseudosklerose - Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Dtsch Z Nervenheilk* **70**, 132-146.
- Jakob A. M. (1921b) Über eine der Multiplen Sklerose klinisch nahestehenden Erkrankung des Zentralnervensystems (Spastische Pseudosklerose) mit bemerkenswertem anatomischen Befunde. *Medizinische Klinik* **13**, 372.
- James T. L., Liu H., Ulyanov N. B., Farr-Jones S., Zhang H., Donne D. G., Kaneko K., Groth D., Mehlhorn I., Prusiner S. B., and Cohen F. E. (1997) Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 10086-10091.
- Jayaraman T., Ondrias K., Ondriasova E., and Marks A. R. (1996) Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. *Science* **272**, 1492-1494.
- Jefferys J. G. R., Empson R. M., Whittington M. A., and Prusiner S. B. (1994) Scrapie infection of transgenic mice leads to network and intrinsic dysfunction of cortical and hippocampal neurons. *Neurobiol Disease* **1**, 25-30.
- Jeffrey M., Goodsir C. M., Bruce M. E., McBride P. A., and Fraser J. R. (1997) *In vivo* toxicity of prion protein in murine scrapie: ultrastructural and immunogold studies. *Neuropathol Appl Neurobiol* **23**, 93-101.
- Jeffrey M., Halliday W. G., Bell J., Johnston A. R., MacLeod N. K., Ingham C., Sayers A. R., Brown D. A., and Fraser J. R. (2000) Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol* **26**, 41-54.
- Jeffrey M., Scott J. R., Williams A., and Fraser H. (1992) Ultrastructural features of spongiform encephalopathy transmitted to mice from three species of bovidae. *Acta Neuropathol* **84**, 559-569.

- Jeffrey M. and Wells G. A. (1988) Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angasi*). *Vet Pathol* **25**, 398-399.
- Jiang M. H., Lee C. L., Smith K. L., and Swann J. W. (1998) Spine loss and other persistent alterations of hippocampal pyramidal cell dendrites in a model of early-onset epilepsy. *J Neurosci* **18**, 8356-8368.
- Johnston A. R., Black C., Fraser J., and MacLeod N. (1997) Scrapie infection alters the membrane and synaptic properties of mouse hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J Physiol* **500**, 1-15.
- Johnston A. R., Fraser J. R., Jeffrey M., and MacLeod N. (1998a) Alterations in potassium currents may trigger neurodegeneration in murine scrapie. *Exp Neurol* **151**, 326-333.
- Johnston A. R., Fraser J. R., Jeffrey M., and MacLeod N. (1998b) Synaptic plasticity in the CA1 area of the hippocampus of scrapie-infected mice. *Neurobiol Dis* **5**, 188-195.
- Jones S. W. (1998) Overview of voltage-dependent calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* **30**, 299-312.
- Kandel E. R., Schwartz J. H., and Jessel T. M. (1995) *Essentials of neural science and behavior*, Appleton & Lange, Oxford.
- Kelley K. A., Friedrich V. L., Jr., Sonshine A., Hu Y., Lax J., Li J., Drinkwater D., Dressler H., and Herrup K. (1994) Expression of Thy-1/lacZ fusion genes in the CNS of transgenic mice. *Brain Res Mol Brain Res* **24**, 261-274.
- Kellings K., Meyer N., Mirenda C., Prusiner S. B., and Riesner D. (1992) Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. *J Gen Virol* **73**, 1025-1029.
- Kellings K., Meyer N., Mirenda C., Prusiner S. B., and Riesner D. (1993) Analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations. *Arch Virol Suppl* **7**, 215-225.

Keshet G. I., Bar-Peled O., Yaffe D., Nudel U., and Gabizon R. (2000) The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. *J Neurochem* **75**, 1889-1897.

Kitamoto T., Tateishi J., Tashima T., Takeshita I., Barry R. A., DeArmond S. J., and Prusiner S. B. (1986) Amyloid plaques in Creutzfeldt-Jakob disease stain with prion protein antibodies. *Ann Neurol* **20**, 204-208.

Klamt F., Dal Pizzol F., Conte da Frota ML JR, Walz R., Andrades M. E., da Silva E. G., Brentani R. R., Izquierdo I., and Fonseca Moreira J. C. (2001) Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic Biol Med* **30**, 1137-1144.

Klitzman R. (1999) Sorcery and science: responses to kuru and other epidemics. *West J Med* **171**, 204-206.

Knott G. W., Holtmaat A., Wilbrecht L., Welker E., and Svoboda K. (2006) Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat Neurosci*.

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**, 471-4.

Konnerth A., Llano I., and Armstrong C. M. (1990) Synaptic currents in cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2662-2665.

Korte S., Vassallo N., Kramer M. L., Kretschmar H. A., and Herms J. (2003) Modulation of L-type voltage-gated calcium channels by recombinant prion protein. *J Neurochem* **87**, 1037-1042.

Kostyuk P. G. (1989) Diversity of calcium ion channels in cellular membranes. *Neuroscience* **28**, 253-261.

Krause M., Offermanns S., Stocker M., and Pedarzani P. (2002) Functional specificity of G α q and G α 11 in the cholinergic and glutamatergic modulation of potassium currents and excitability in hippocampal neurons. *J Neurosci* **22**, 666-673.

Kretzschmar H. A., Prusiner S. B., Stowring L. E., and DeArmond S. J. (1986a) Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* **122**, 1-5.

Kretzschmar H. A., Stowring L. E., Westaway D., Stubblebine W. H., Prusiner S. B., and DeArmond S. J. (1986b) Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* **5**, 315-324.

Kretzschmar H. A., Tings T., Madlung A., Giese A., and Herms J. (2000) Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse. *Arch Virol Suppl* 239-249.

Kretzschmar H.A. (2003) Diagnosis of prion diseases. *Clin Lab Med* **23**, 109-28.

Kurschner C. and Morgan J. I. (1995) The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res Mol Brain Res* **30**, 165-168.

Kurschner C. and Morgan J. I. (1996) Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein. *Brain Res Mol Brain Res* **37**, 249-258.

Kyhse-Andersen J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-209.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Laiho L. H., Pelet S., Hancewicz T. M., Kaplan P. D., and So P. T. (2005) Two-photon 3-D mapping of ex vivo human skin endogenous fluorescence species based on fluorescence emission spectra. *J Biomed Opt* **10**, 024016.

Lancaster B. and Nicoll R. A. (1987) Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *J Physiol* **389**, 187-203.

Lancaster B. and Zucker R. S. (1994) Photolytic manipulation of Ca²⁺ and the time course of slow, Ca(2+)-activated K⁺ current in rat hippocampal neurones. *J Physiol* **475**, 229-239.

- Landis D. M., Williams R. S., and Masters C. L. (1981) Golgi and electronmicroscopic studies of spongiform encephalopathy. *Neurology* **31**, 538-549.
- Lasmezas C. I., Deslys J. P., Demaimay R., Adjou K. T., Lamoury F., Dormont D., Robain O., Ironside J., and Hauw J. J. (1996) BSE transmission to macaques. *Nature* **381**, 743-744.
- Lasser-Ross N., Ross W. N., and Yarom Y. (1997) Activity-dependent $[Ca^{2+}]_i$ changes in guinea pig vagal motoneurons: relationship to the slow afterhyperpolarization. *J Neurophysiol* **78**, 825-834.
- Lee I. Y., Westaway D., Smit A. F., Wang K., Seto J., Chen L., Acharya C., Ankener M., Baskin D., Cooper C., Yao H., Prusiner S. B., and Hood L. E. (1998) Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res* **8**, 1022-1037.
- Leggett M. M., Dukes J., and Pirie H. M. (1990) A spongiform encephalopathy in a cat. *Vet Rec* **127**, 586-588.
- Legname G., Baskakov I. V., Nguyen H. O., Riesner D., Cohen F. E., DeArmond S. J., and Prusiner S. B. (2004) Synthetic mammalian prions. *Science* **305**, 673-676.
- Liu H., Farr-Jones S., Ulyanov N. B., Llinas M., Marqusee S., Groth D., Cohen F. E., Prusiner S. B., and James T. L. (1999) Solution structure of Syrian hamster prion protein rPrP(90-231). *Biochemistry* **38**, 5362-5377.
- Llano I., Marty A., Armstrong C. M., and Konnerth A. (1991) Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices. *J Physiol* **434**, 183-213.
- Llewelyn C. A., Hewitt P. E., Knight R. S., Amar K., Cousens S., Mackenzie J., and Will R. G. (2004) Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* **363**, 417-421.
- LLinas, R. R. Electrophysiology of the cerebellar networks. Handbook of physiology, Section1: The nervous system, Vol. II: Motor Control, Part2. Bethesda, MD.: American Physiological Society. 831-876. 1981. V.B. Brooks.

- Locht C., Chesebro B., Race R., and Keith J. M. (1986) Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 6372-6.
- Lopes M. H., Hajj G. N., Muras A. G., Mancini G. L., Castro R. M., Ribeiro K. C., Brentani R. R., Linden R., and Martins V. R. (2005) Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci* **25**, 11330-11339.
- Lopez Garcia F., Zahn R., Riek R., and Wuthrich K. (2000) NMR structure of the bovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8334-9.
- Lu K., Wang W., Xie Z., Wong B. S., Li R., Petersen R. B., Sy M. S., and Chen S. G. (2000) Expression and structural characterization of the recombinant human doppel protein. *Biochemistry* **39**, 13575-13583.
- Lugaresi E., Medori R., Montagna P., Baruzzi A., Cortelli P., Lugaresi A., Tinuper P., Zucconi M., and Gambetti P. (1986) Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* **315**, 997-1003.
- Lysek D. A., Schorn C., Nivon L. G., Esteve-Moya V., Christen B., Calzolari L., von Schroetter C., Fiorito F., Herrmann T., Guntert P., and Wuthrich K. (2005) Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 640-645.
- MacDonald J. F. and Wojtowicz J. M. (1980) Two conductance mechanisms activated by applications of L-glutamic, L-aspartic, DL-homocysteic, N-methyl-D-aspartic, and DL-kainic acids to cultured mammalian central neurones. *Can J Physiol Pharmacol* **58**, 1393-1397.
- Majewska A. K., Newton J. R., and Sur M. (2006) Remodeling of synaptic structure in sensory cortical areas in vivo. *J Neurosci* **26**, 3021-3029.
- Mallucci G. R., Rattie S., Asante E. A., Linehan J., Gowland I., Jefferys J. G., and Collinge J. (2002) Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J* **21**, 202-210.

Manson J., West J. D., Thomson V., McBride P., Kaufman M. H., and Hope J. (1992) The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* **115**, 117-122.

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.

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

Marrion N. V. and Lima P. A. (2005) Continued calcium entry underlies the time-course of the slow afterhyperpolarization in rat CA1 hippocampal pyramidal neurons. *Society for Neuroscience Abstract No 376 16*.

Marrion N. V. and Tavalin S. J. (1998) Selective activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by co-localized Ca²⁺ channels in hippocampal neurons. *Nature* **395**, 900-905.

Martins V. R., Graner E., Garcia-Abreu J., deSouza S. J., Mercadante A. F., Veiga S. S., Zanata S. M., Neto V. M., and Brentani R. R. (1998) Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nature Medicine* **3**, 1376-1382.

Martins V. R., Mercadante A. F., Cabral A. L., Freitas A. R., and Castro R. M. (2001) Insights into the physiological function of cellular prion protein. *Braz J Med Biol Res* **34**, 585-595.

McGowan J. P. (1922) Scrapie in Sheep. *Scottish J Agric* **5**, 365-375.

McKinley M. P., Bolton D. C., and Prusiner S. B. (1983) A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* **35**, 57-62.

- Mehlhorn I., Groth D., Stockel J., Moffat B., Reilly D., Yansura D., Willett W. S., Baldwin M., Fletterick R., Cohen F. E., Vandlen R., Henner D., and Prusiner S. B. (1996) High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochemistry* **35**, 5528-5537.
- Merz P. A., Somerville R. A., Wisniewski H. M., and Iqbal K. (1981) Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol* **54**, 63-74.
- Merz P. A., Somerville R. A., Wisniewski H. M., Manuelidis L., and Manuelidis E. E. (1983) Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* **306**, 474-476.
- Meyer N., Rosenbaum V., Schmidt B., Gilles K., Mirenda C., Groth D., Prusiner S. B., and Riesner D. (1991) Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids. *J Gen Virol* **72**, 37-49.
- Miller M. W. and Williams E. S. (2003) Prion disease: horizontal prion transmission in mule deer. *Nature* **425**, 35-36.
- Mintz I. M., Adams M. E., and Bean B. P. (1992) P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* **9**, 85-95.
- Mo H., Moore R. C., Cohen F. E., Westaway D., Prusiner S. B., Wright P. E., and Dyson H. J. (2001) Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 2352-2357.
- Molitoris B. A. and Sandoval R. M. (2005) Intravital multiphoton microscopy of dynamic renal processes. *Am J Physiol Renal Physiol* **288**, F1084-F1089.
- Mollemann A. (2003) *Patch Clamping - An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England.
- Moore K. A., Cohen A. S., Kao J. P., and Weinreich D. (1998) Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mediates a slow post-spike hyperpolarization in rabbit vagal afferent neurons. *J Neurophysiol* **79**, 688-694.

Moore R. C., Lee I. Y., Silverman G. L., Harrison P. M., Strome R., Heinrich C., Karunaratne A., Pasternak S. H., Chishti M. A., Liang Y., Mastrangelo P., Wang K., Smit A. F., Katamine S., Carlson G. A., Cohen F. E., Prusiner S. B., Melton D. W., Tremblay P., Hood L. E., and Westaway D. (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol* **292**, 797-817.

Moosmang S., Schulla V., Welling A., Feil R., Feil S., Wegener J. W., Hofmann F., and Klugbauer N. (2003) Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *EMBO J* **22**, 6027-6034.

Morante S., Gonzalez-Iglesias R., Potrich C., Meneghini C., Meyer-Klaucke W., Menestrina G., and Gasset M. (2004) Inter- and intra-octarepeat Cu(II) site geometries in the prion protein: implications in Cu(II) binding cooperativity and Cu(II)-mediated assemblies. *J Biol Chem* **279**, 11753-11759.

Mori Y., Mikala G., Varadi G., Kobayashi T., Koch S., Wakamori M., and Schwartz A. (1996) Molecular pharmacology of voltage-dependent calcium channels. *Jpn J Pharmacol* **72**, 83-109.

Morris R. (1992) Thy-1, the enigmatic extrovert on the neuronal surface. *Bioessays* **14**, 715-722.

Moser M., Colello R. J., Pott U., and Oesch B. (1995) Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* **14**, 509-517.

Mouillet-Richard S., Ermonval M., Chebassier C., Laplanche J. L., Lehmann S., Launay J. M., and Kellermann O. (2000) Signal transduction through prion protein. *Science* **289**, 1925-1928.

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.

Nathanson N. (1980) Slow viruses and chronic disease: the contribution of epidemiology. *Public Health Rep* **95**, 436-443.

Neher E. and Sakmann B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802.

Newcomb R., Szoke B., Palma A., Wang G., Chen X., Hopkins W., Cong R., Miller J., Urge L., Tarczy-Hornoch K., Loo J. A., Dooley D. J., Nadasdi L., Tsien R. W., Lemos J., and Miljanich G. (1998) Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* **37**, 15353-15362.

Nicoll R. A. (1988) The coupling of neurotransmitter receptors to ion channels in the brain. *Science* **241**, 545-551.

Nicoll R. A., Malenka R. C., and Kauer J. A. (1990) Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol Rev* **70**, 513-565.

Nishida N., Tremblay P., Sugimoto T., Shigematsu K., Shirabe S., Petromilli C., Erpel S. P., Nakaoka R., Atarashi R., Houtani T., Torchia M., Sakaguchi S., DeArmond S. J., Prusiner S. B., and Katamine S. (1999) A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest* **79**, 689-697.

Nowak L., Bregestovski P., Ascher P., Herbet A., and Prochiantz A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**, 462-465.

Oesch B., Teplow T. B., Stahl N., Serban D., Hood L. E., and Prusiner S. B. (1990) Identification of cellular proteins binding to the scrapie prion protein. *Biochemistry* **29**, 5848-5855.

Oesch B., Westaway D., Walchli M., McKinley M. P., Kent S. B., Aebersold R., Barry R. A., Tempst P., Teplow D. B., Hood L. E., and al. e. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**, 735-46.

Okamoto K., Nagai T., Miyawaki A., and Hayashi Y. (2004) Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci* **7**, 1104-1112.

Ormo M., Cubitt A. B., Kallio K., Gross L. A., Tsien R. Y., and Remington S. J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392-1395.

Owen F., Poulter M., Shah T., Collinge J., Lofthouse R., Baker H., Ridley R., McVey J., and Crow T. J. (1990) An in-frame insertion in the prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res Mol Brain Res* **7**, 273-276.

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

Park J. S., Bateman M. C., and Goldberg M. P. (1996) Rapid alterations in dendrite morphology during sublethal hypoxia or glutamate receptor activation. *Neurobiol Disease* **3**, 215-227.

Patt S., Gertz H. J., Gerhard L., and Cervosnavarro J. (1991) Pathological-Changes in Dendrites of Substantia-Nigra Neurons in Parkinsons-Disease - A Golgi-Study. *Histology and Histopathology* **6**, 373-380.

Pattison I. H., Hoare M. N., Jebbett J. N., and Watson W. A. (1972) Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Vet Rec* **90**, 465-468.

Pattison I. H., Hoare M. N., Jebbett J. N., and Watson W. A. (1974) Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Br Vet J* **130**, 15-17.

Pauly P. C. and Harris D. A. (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* **273**, 33107-33110.

Peden A. H., Head M. W., Ritchie D. L., Bell J. E., and Ironside J. W. (2004) Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* **364**, 527-529.

Perutz M. F., Finch J. T., Berriman J., and Lesk A. (2002) Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 5591-5595.

Plummer M. R., Logothetis D. E., and Hess P. (1989) Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron* **2**, 1453-1463.

Priola S. A. (1996) Similar protein signatures for BSE and vCJD. *Nat Med* **2**, 1303-1304.

Prusiner S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-144.

Prusiner S. B. (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**, 1515-1522.

Prusiner S. B., Bolton D. C., Groth D. F., Bowman K. A., Cochran S. P., and McKinley M. P. (1982) Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* **21**, 6942-6950.

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 USA* **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., McKinley M. P., Bowman K. A., Bolton D. C., Bendheim P. E., Groth D. F., and Glenner G. G. (1983) Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* **35**, 349-358.

Puckett C., Concannon P., Casey C., and Hood L. (1991) Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet* **49**, 320-9.

Ridley R. M. and Baker H. F. (1996) Variation on a theme of Creutzfeldt-Jakob disease: implications of new cases with a young age at onset. *J Gen Virol* **77**, 2895-2904.

Rieger R., Edenhofer F., Lasmezas C. I., and Weiss S. (1997) The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med* **3**, 1383-1388.

Riek R., Hornemann S., Wider G., Billeter M., Glockshuber R., and Wuthrich K. (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* **382**, 180-182.

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.

Riek R., Wider G., Billeter M., Hornemann S., Glockshuber R., and Wuthrich K. (1998) Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 11667-11672.

Riesner D., Kellings K., Post K., Wille H., Serban H., Groth D., Baldwin M. A., and Prusiner S. B. (1996) Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity. *J Virol* **70**, 1714-1722.

Riesner D., Kellings K., Wiese U., Wulfert M., Mirinda C., and Prusiner S. B. (1993) Prions and nucleic acids: search for "residual" nucleic acids and screening for mutations in the PrP-gene. *Dev Biol Stand* **80**, 173-181.

Roucou X. and Leblanc A. C. (2005) Cellular prion protein neuroprotective function: implications in prion diseases. *J Mol Med* **83**, 3-11.

Rubart M. (2004) Two-photon microscopy of cells and tissue. *Circ Res* **95**, 1154-1166.

Rudd P. M., Endo T., Colominas C., Groth D., Wheeler S. F., Harvey D. J., Wormald M. R., Serban H., Prusiner S. B., Kobata A., and Dwek R. A. (1999) Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 13044-13049.

Rudd P. M., Wormald M. R., Wing D. R., Prusiner S. B., and Dwek R. A. (2001) Prion glycoprotein: structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry* **40**, 3759-66.

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.

Sah P. (1996) Ca(2+)-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* **19**, 150-154.

Sah P. and Clements J. D. (1999) Photolytic manipulation of [Ca²⁺]_i reveals slow kinetics of potassium channels underlying the afterhyperpolarization in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* **19**, 3657-3664.

Sah P. and McLachlan E. M. (1991) Ca(2+)-activated K⁺ currents underlying the afterhyperpolarization in guinea pig vagal neurons: a role for Ca(2+)-activated Ca²⁺ release. *Neuron* **7**, 257-264.

Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., and Erlich H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Sakaguchi S., Katamine S., Nishida N., Moriuchi R., Shigematsu K., Sugimoto T., Nakatani A., Kataoka Y., Houtani T., Shirabe S., Okada H., Hasegawa S., Miyamoto T., and Noda T. (1996) Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* **380**, 528-531.

Sandberg M. K., Wallen P., Wikstrom M. A., and Kristensson K. (2004) Scrapie-infected GT1-1 cells show impaired function of voltage-gated N-type calcium channels (Ca_v 2.2) which is ameliorated by quinacrine treatment. *Neurobiol Dis* **15**, 143-151.

Santuccione A., Sytnyk V., Leshchyn'ska I., and Schachner M. (2005) Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59^{fyn} and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol* **169**, 341-354.

Schätzl H. M., Da Costa M., Taylor L., Cohen F. E., and Prusiner S. B. (1995) Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol* **245**, 362-374.

Schwartzkroin P. A. and Stafstrom C. E. (1980) Effects of EGTA on the calcium-activated afterhyperpolarization in hippocampal CA3 pyramidal cells. *Science* **210**, 1125-1126.

Schwindt P. C., Spain W. J., and Crill W. E. (1992) Calcium-dependent potassium currents in neurons from cat sensorimotor cortex. *J Neurophysiol* **67**, 216-226.

Scott M. R., Will R., Ironside J., Nguyen H. O., Tremblay P., DeArmond S. J., and Prusiner S. B. (1999) Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 15137-15142.

Selvaggini C., Degioia L., Cantu L., Ghibaudi E., Diomede L., Passerini F., Forloni G., Bugiani O., Tagliavini F., and Salmona M. (1993) Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues-106-126 of the prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* **194**, 1380-1386.

Shyng S. L., Huber M. T., and Harris D. A. (1993) A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **268**, 15922-15928.

Sigurdson C. J. and Miller M. W. (2003) Other animal prion diseases. *Br Med Bull* **66**, 199-212.

Silei V., Fabrizi C., Venturini G., Salmona M., Bugiani O., Tagliavini F., and Lauro G. M. (1999) Activation of microglial cells by PrP and beta-amyloid fragments raises intracellular calcium through L-type voltage sensitive calcium channels. *Brain Res* **818**, 168-170.

Silverman G. L., Qin K., Moore R. C., Yang Y., Mastrangelo P., Tremblay P., Prusiner S. B., Cohen F. E., and Westaway D. (2000) Doppel is an N-glycosylated, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. Expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp(0/0) mice predisposed to Purkinje cell loss. *J Biol Chem* **275**, 26834-26841.

Simonin T., Duga S., Strumbo B., Asselta R., Cecilian F., and Ronchi S. (2000) cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Lett* **469**, 33-38.

Slesinger P. A. and Lansman J. B. (1991) Inactivation of calcium currents in granule cells cultured from mouse cerebellum. *J Physiol* **435**, 101-121.

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., Masliah E., Gilden D., Oldstone M. B., Conti B., and Williamson R. A. (2004) Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science* **303**, 1514-1516.

Spires T. L., Meyer-Luehmann M., Stern E. A., McLean P. J., Skoch J., Nguyen P. T., Bacskai B. J., and Hyman B. T. (2005) Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci* **25**, 7278-7287.

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.

Stimson E., Hope J., Chong A., and Burlingame A. L. (1999) Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry* **38**, 4885-95.

Stocker M. (2004) Ca²⁺-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci* **5**, 758-770.

Stocker M., Hirzel K., D'hoedt D., and Pedarzani P. (2004) Matching molecules to function: neuronal Ca²⁺-activated K⁺ channels and afterhyperpolarizations. *Toxicon* **43**, 933-949.

Stockmann S. (1913) Scrapie: an obscure disease of sheep. *J Comp Path Ther* 317.

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

Strumbo B., Ronchi S., Bolis L. C., and Simonic T. (2001) Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett* **508**, 170-174.

Sunde M., Serpell L. C., Bartlam M., Fraser P. E., Pepys M. B., and Blake C. C. (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol* **273**, 729-739.

Suzuki T., Kurokawa T., Hashimoto H., and Sugiyama M. (2002) cDNA sequence and tissue expression of Fugu rubripes prion protein-like: a candidate for the teleost orthologue of tetrapod PrPs. *Biochem Biophys Res Commun* **294**, 912-917.

Tada T. and Sheng M. (2006) Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 95-101.

Tagliavini F., Prelli F., Verga L., Giaccone G., Sarma R., Gorevic P., Ghetti B., Passerini F., Ghibaudi E., Forloni G., Salmona M., Bugiani O., and Frangione B. (1993) Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils invitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 9678-9716.

Takechi H., Eilers J., and Konnerth A. (1998) A new class of synaptic response involving calcium release in dendritic spines. *Nature* **396**, 757-760.

Tanabe M., Gahwiler B. H., and Gerber U. (1998) L-Type Ca^{2+} channels mediate the slow Ca^{2+} -dependent afterhyperpolarization current in rat CA3 pyramidal cells in vitro. *J Neurophysiol* **80**, 2268-2273.

Teramoto T., Kuwada M., Niidome T., Sawada K., Nishizawa Y., and Katayama K. (1993) A novel peptide from funnel web spider venom, omega-Aga-TK, selectively blocks, P-type calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun* **196**, 134-140.

Theer P., Hasan M. T., and Denk W. (2003) Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier. *Opt Lett* **28**, 1022-1024.

Thellung S., Florio T., Corsaro A., Arena S., Merlino M., Salmona M., Tagliavini F., Bugiani O., Forloni G., and Schettini G. (2000a) Intracellular mechanisms mediating the neuronal death and astrogliosis induced by the prion protein fragment 106-126. *Int J Dev Neurosci* **18**, 481-492.

Thellung S., Florio T., Villa V., Corsaro A., Arena S., Amico C., Robello M., Salmona M., Forloni G., Bugiani O., Tagliavini F., and Schettini G. (2000b) Apoptotic cell death and impairment of L-type voltage-sensitive calcium channel activity in rat cerebellar granule cells treated with the prion protein fragment 106-126. *Neurobiol Dis* **7**, 299-309.

Thompson R. F. (1985) *The brain*, W.H. Freeman & Company, New York and Oxford.

Thomzig A., Kratzel C., Lenz G., Kruger D., and Beekes M. (2003) Widespread PrP^{Sc} accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie. *EMBO Rep* **4**, 530-533.

Thomzig A., Schulz-Schaeffer W., Kratzel C., Mai J., and Beekes M. (2004) Preclinical deposition of pathological prion protein PrP^{Sc} in muscles of hamsters orally exposed to scrapie. *J Clin Invest* **113**, 1465-1472.

Thormar H. (1971) Slow infections of the central nervous system. II. *Z Neurol* **199**, 151-166.

Tobler I., Deboer T., and Fischer M. (1997) Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *J Neurosci* **17**, 1869-1879.

Tobler I., Gaus S. E., Deboer T., Achermann P., Fischer M., Rulicke T., Moser M., Oesch B., McBride P. A., and Manson J. C. (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**, 639-642.

Towbin H., Staehelin T., and Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350-4354.

- Trachtenberg J. T., Chen B. E., Knott G. W., Feng G., Sanes J. R., Welker E., and Svoboda K. (2002) Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* **420**, 788-794.
- Tsai J., Grutzendler J., Duff K., and Gan W. B. (2004) Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nat Neurosci* **7**, 1181-1183.
- Turk E., Teplow D. B., Hood L. E., and Prusiner S. B. (1988) Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur J Biochem* **176**, 21-30.
- 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.
- Vassallo N., Herms J., Behrens C., Krebs B., Saeki K., Onodera T., Windl O., and Kretzschmar H. A. (2005) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by cellular prion protein and its role in cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* **332**, 75-82.
- Viard P., Butcher A. J., Halet G., Davies A., Nurnberg B., Heblich F., and Dolphin A. C. (2004) PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nature Neuroscience* **7**, 939-946.
- Vidal M., Morris R., Grosveld F., and Spanopoulou E. (1990) Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene. *EMBO J* **9**, 833-840.
- Viles J. H., Cohen F. E., Prusiner S. B., Goodin D. B., Wright P. E., and Dyson H. J. (1999) Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 2042-2047.
- Vincent P., Armstrong C. M., and Marty A. (1992) Inhibitory synaptic currents in rat cerebellar Purkinje cells: modulation by postsynaptic depolarization. *J Physiol* **456**, 453-471.
- Weise J., Sandau R., Schwarting S., Crome O., Wrede A., Schulz-Schaeffer W., Zerr I., and Bahr M. (2006) Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* **37**, 1296-1300.

Wells G. A., Hawkins S. A., Green R. B., Austin A. R., Dexter I., Spencer Y. I., Chaplin M. J., Stack M. J., and Dawson M. (1998) Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet Rec* **142**, 103-106.

Wells G. A., Scott A. C., Johnson C. T., Gunning R. F., Hancock R. D., Jeffrey M., Dawson M., and Bradley R. (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* **121**, 419-420.

Westaway D., Cooper C., Turner S., Da Costa M., Carlson G. A., and Prusiner S. B. (1994a) Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 6418-22.

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**, 651-62.

Westaway D., Zuliani V., Cooper C. M., Da Costa M., Neuman S., Jenny A. L., Detwiler L., and Prusiner S. B. (1994b) Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. *Genes Dev* **8**, 959-969.

Westenbroek R. E., Ahlijanian M. K., and Catterall W. A. (1990) Clustering of L-type Ca²⁺ channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons. *Nature* **347**, 281-284.

Whatley S. A., Powell J. F., Politopoulou G., Campbell I. C., Brammer M. J., and Percy N. S. (1995) Regulation of intracellular free calcium levels by the cellular prion protein. *Neuroreport* **6**, 2333-2337.

Wilesmith J. W., Ryan J. B., and Atkinson M. J. (1991) Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec* **128**, 199-203.

Wilesmith J. W., Wells G. A., Cranwell M. P., and Ryan J. B. (1988) Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec* **123**, 638-644.

Will R. G., Ironside J. W., Zeidler M., Cousens S. N., Estibeiro K., Alperovitch A., Poser S., Pocchiari M., Hofman A., and Smith P. G. (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**, 921-925.

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 USA* **99**, 3563-3568.

Williams E. S. and Young S. (1980) Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis* **16**, 89-98.

Wopfner F., Weidenhofer G., Schneider R., von Brunn A., Gilch S., Schwarz T. F., Werner T., and Schätzl H. M. (1999) Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol* **289**, 1163-1178.

Wyatt J. M., Pearson G. R., Smerdon T. N., Gruffydd-Jones T. J., Wells G. A., and Wilesmith J. W. (1991) Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Vet Rec* **129**, 233-236.

Yehiely F., Bamborough P., DaCosta M., Perry B. J., Thinakaran G., Cohen F. E., Carlson G. A., and Prusiner S. B. (1997) Identification of candidate proteins binding to prion protein. *Neurobiol Disease* **3**, 339-355.

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 USA* **97**, 145-50.

Zhang C. C., Steele A. D., Lindquist S., and Lodish H. F. (2006) Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2184-2189.

Zhang J. F., Randall A. D., Ellinor P. T., Horne W. A., Sather W. A., Tanabe T., Schwarz T. L., and Tsien R. W. (1993) Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* **32**, 1075-1088.

Zhang L. and McBain C. J. (1995) Potassium conductances underlying repolarization and after-hyperpolarization in rat CA1 hippocampal interneurons. *J Physiol* **488** (Pt 3), 661-672.

Zhang S., Boyd J., Delaney K., and Murphy T. H. (2005) Rapid reversible changes in dendritic spine structure in vivo gated by the degree of ischemia. *J Neurosci* **25**, 5333-5338.

Zigas V. and Gajdusek D. C. (1957) Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea. *Med J Aust* **44**, 745-754.

Zuo Y., Lin A., Chang P., and Gan W. B. (2005) Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron* **46**, 181-189.

7. Eigene Veröffentlichungen

Herms J., Anliker B., Heber S., Ring S., Fuhrmann M., Kretzschmar H., Sisodia S., Muller U. (2004) Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J* 23, 4106-4115.

Fuhrmann M., Bittner T., Mitteregger G., Haider N., Moosmang S., Kretzschmar H., Herms J. (2006) Loss of the cellular prion protein affects the Ca²⁺ homeostasis in hippocampal CA1 neurons. *J Neurochem* 98 (6), 1876-1885

Fuhrmann M., Mitteregger G., Kretzschmar H., Herms J. (2007) Long-term kinetics of spines and dendritic varicosities during prion disease *in vivo*. (*Neuron* submitted)

Fuhrmann M., Cernoch K., Fischer R., Pace C., Kretzschmar H., Herms J.

Structural Plasticity of cerebellar presynaptic boutons during prion disease *in vivo* (manuscript in preparation)

Zeiss Broschüre:

LSM 510 NLO – Neurons at Work – Multiphoton Microscopy; <http://www.zeiss.de/lsm>

Gebrauchsmusteranmeldung beim Deutschen Patentamt: Intravitalmikroskopie-Tisch

8. Anhang

8.1. Danksagung

Herzlichen Dank Prof. Dr. Jochen Herms, für das Thema, die Betreuung, die Diskussionen, die Rückendeckung und das Vertrauen, das mir von Anfang an entgegengebracht wurde.

Vielen Dank an Prof. Dr. Bertold Hock für die unkomplizierte und sehr entgegenkommende Art der Betreuung.

Danke auch an Prof. Dr. Hans Kretzschmar für die Bereitstellung von Räumen und Mitteln ohne die die Projekte nicht durchführbar gewesen wären.

Vielen Dank Prof. Dr. Fridjof Helmchen für die eindrucksvolle Demonstration der 2-Photonen *in vivo* Mikroskopie.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie und Prionforschung, insbesondere Stefan Korte für die Einführung in die Geheimnisse der Elektrophysiologie, Gerda Mitteregger und Claudia Pace für die Organisation der Tierzucht und die Scrapie-Infektion der Mäuse, Tobias Bittner für das Durchführen der Lightcycler-Läufe und natürlich den „Jungs“ für anregende Arbeitsbesprechungen.

Vielen Dank auch an Nicole Haider und Dr. Sven Moosmang, die die Westernblots für die Bestimmung der Proteinexpression der $\alpha 1C$ - und $\beta 2$ -Untereinheiten durchgeführt haben.

Außerdem möchte ich allen Korrekturlesern danken: Andreas Fuhrmann, Christine Fuhrmann, Jens Wagner und Jochen Herms.

Ein besonderer Dank geht an meine Frau Christine, für ihre Liebe, ihr Verständnis und ihre Unterstützung in schwierigen Momenten, für ein immer offenes Ohr und für viele wertvolle wissenschaftliche Diskussionen.

8.2. Lebenslauf

Name: Martin Fuhrmann
Geburtsdatum: 05.05.1977
Geburtsort: Hamm
Familienstand: verheiratet mit Christine Fuhrmann, geb. Nachtsheim

Schulbildung:

1983 - 1987 Walburgis-Grundschule Werl
1987 - 1996 Marien-Gymnasium Werl
13.06.1996 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst:

08.1996 - 07.1997 Zivildienst Mariannen-Hospital Werl

Studium:

WS 97/98 – SS 99 Grundstudium Technische Biologie, Universität Stuttgart
08.07.1999 Vordiplom Technische Biologie
WS 99/00 Studienarbeit bei Hoffmann-La Roche, Basel
SS00 – WS02/03 Hauptstudium Technische Biologie, Universität Stuttgart
03.09.2002 Diplom Biologe technisch orientiert

Promotion:

10.2002 – 10.2006 Technische Universität München (Prof. Dr. B. Hock)
Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
Ludwig-Maximilians-Universität München (Prof. Dr. J. Herms)

Auszeichnungen:

Poster Preis bei "Prion 2005: Between fundamentals and society's needs"

Bestes Poster der Sektion Pathogenese

"*In vivo* Two-Photon-Analysis of Spine Pathology in Prion Disease"

Martin Fuhrmann, Gerda Mitteregger, Hans Kretzschmar and Jochen Herms