

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Tierhygiene

**Untersuchungen der zellulären Mechanismen der
Prionstammreplikation**

Gloria Vanessa Ingrid Lutzny

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

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. J. Bauer
2. Prof. Dr. H. M. Schätzl
(University of Calgary/Kanada)

Die Dissertation wurde am 01.10.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 20.01.2014 angenommen.

Alles Wissen geht aus einem Zweifel hervor und endet in
einem Glauben.

M. v. Ebner-Eschenbach

Für mich und meine Familie

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	I-IV
1 Zusammenfassung	1
1.1 Deutsche Version	1
1.2 English version	3
2 Einleitung	6
2.1 Prionen und Prionerkrankungen	6
2.1.1 Das Prionprotein	7
2.1.2 Mechanismus der Prionprotein-Konversion	9
2.1.3 Ort der Konversion	11
2.1.4 Strukturelle und biochemische Eigenschaften von PrP ^C und PrP ^{Sc}	14
2.1.5 Zellbiologie des Prionproteins	18
2.1.6 Prionerkrankungen von Tieren	20
2.1.7 Prionerkrankungen von Menschen	22
2.1.8 Prionstämme und Speziesbarriere	26
2.1.9 Rolle von PrP in Prionerkrankungen	31
2.2 Typen und Mechanismen der Endozytose	34
2.2.1 Rezeptor-vermittelte Endozytose	36
2.2.2 Caveolae	38
2.2.3 Intrazelluläre Transportwege endozytierter Substanzen	39
2.3 Rabproteine	41
2.3.1 Lokalisation und Regulierung der Rabproteine	42
2.3.2 Funktionen der Rabproteine	44
2.4 Synthese und Endozytose des Prionproteins PrP ^C	46
2.7 Zielsetzung	52

3	<i>Material</i>	53
3.1	Geräte	53
3.2	Chemikalien	54
3.3	Inhibitorische Substanzen und siRNAs	56
3.4	Antikörper	57
3.5	Puffer und Medien	58
3.6	Zellmedien, Zusätze und Antibiotika	60
3.7	Murine Zelllinien	61
4	<i>Methoden</i>	62
4.1	Quantitative Proteinbestimmung (Bradford)	62
4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	62
	4.2.1 Gelelektrophorese	64
	4.2.2 Western Blot	64
	4.2.3 Proteindetektion	64
4.3	Dot Blot	65
4.4	Zellbiologische Methoden	66
	4.4.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen	66
	4.4.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	66
	4.4.3 Zellyse und Proteinase K-Behandlung	67
	4.4.4 Ultrazentrifugation	67
	4.4.5 Transiente Transfektion von siRNA in Säugerzellen	68
	4.4.6 Indirekte Immunfluoreszenz	69
	4.4.7 FACS Analyse	70
	4.4.8 Phosphoinositolphospholipase C (PIPL-C)-Verdau	71
	4.4.9 Gradientenzentrifugation	72
	4.4.10 Behandlung von Zellen mit chemischen Inhibitoren	72
	4.4.11 Infektion von Säugerzellen mit verschiedenen Maus-adaptierten Prionstämmen	73
4.5	Photodensitometrische Analyse und Statistik	74

4.6	Biologische Sicherheit	74
5	<i>Ergebnisse</i>	75
5.1	Identifizierung Zelltyp- und Prionstamm-spezifischer Charakteristika während der akuten und persistenten Prioninfektion von Säugierzellen	75
5.1.1	Charakterisierung der murinen Zelllinie L929	76
5.1.2	Veränderungen des Cholesterolmetabolismus beeinflussen die akute Infektion von verwendeten Säugierzellen	80
5.1.3	Einfluss der Inhibitoren auf die persistente Infektion	89
5.2	Charakterisierung endozytoseprotein-defizienter und rabprotein-defizienter L929 Zellen während der akuten Infektion mit verschiedenen Maus-adaptierten Prionstämmen	95
5.2.1	Wichtige Proteine der Internalisierungsprozesse und intrazellulären Transportwege	95
5.2.2	Transiente Transfektion von L929 Zellen mittels siRNA gegen diverse Endozytoseprotein- und Rabprotein-Gene	97
5.2.3	Akute Infektion der endozytoseprotein-defizienten und rabprotein-defizienten L929 Zellen mit drei verschiedenen Maus-adaptierten Prionstämmen	104
5.2.	Indirekte Immunfluoreszenz von PrP ^{Sc} unterschiedlicher Prionstämme während der akuten Infektion	117
6	<i>Diskussion</i>	126
6.1	Cholesterol und PrP-Metabolismus	126
6.2	Akute Infektion unterschiedlicher Zelllinien	127
6.3	Die Wirkung von Nystatin zeigt eine ausgeprägte Prionstammspezifität	130
6.4	Progesteron wirkt in Abhängigkeit von Zelltypen sowie von akuter und persistenter Infektion in L929 Zellen	132

6.5	Filipin inhibiert die PrP ^{Sc} Akkumulierung nur in persistent infizierten Zellen	133
6.6	Die Rolle der Rab-GTPasen in Bezug auf PrP ^{Sc} Akkumulierung	135
6.7	Führen unterschiedliche Transportwege zu einer stabilen Infektion verschiedener Prionstämme ?	142
7	<i>Literaturverzeichnis</i>	146
8	<i>Anhang</i>	181
	Abkürzungsverzeichnis	181
	Publikationen	185
	Danksagung	187
	Lebenslauf	188

1. Zusammenfassung

1.1 Deutsche Version

Prionerkrankungen sind tödlich verlaufende, neurodegenerative Erkrankungen, die bei Tieren und Menschen vorkommen können. Die charakteristische schwammartige (spongiforme) Degenerierung des zentralen Nervensystems (ZNS) wird durch Ablagerungen der fehlgefalteten pathologischen Isoform PrP^{Sc} des zellulären Prionproteins PrP^C verursacht. Dem weithin akzeptierten Konversionsmodell zufolge, ist ein direkter Kontakt von PrP^C und PrP^{Sc} und möglicherweise weitere zelluläre Kofaktoren für die Umfaltung notwendig. Bisherigen Erkenntnissen zufolge, findet die Vermehrung von PrP^{Sc} während dem endozytotischen Weg statt. Hierbei sind Endosomen, das endosomale Recyclingkompartiment, das endoplasmatische Retikulum und Lysosomen am Transport des Prionproteins durch die Zelle und an dessen Degradierung beteiligt. Die Identifizierung von Prionstämmen mit diversen biologischen Charakteristiken lässt vermuten, dass die Wirtszelle auf die Infektion mit verschiedenen Prionstämmen unterschiedlich reagieren könnte. Es stellt sich die Frage, wie sich die Prionstämme auf zellbiologischer Ebene etablieren können. Daher sind Kenntnisse über den Verlauf von persistenten und akuten Prioninfektionen in Zellen unterschiedlichen Ursprungs essentiell. Beispielsweise könnte das Wissen um Veränderungen zellulärer Mechanismen oder Stoffwechselwege behilflich sein, die Infektion mit einem bestimmten Prionstamm zu verhindern.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Wirkung verschiedener Substanzen, die in den Cholesterollowerstand eingreifen, in persistent infizierten Zellen und sowie während einer akuten Prioninfektion untersucht. Hierbei wurden besonders Unterschiede zwischen Neuroblastomzellen (N2a) und Fibroblasten (L929 Zellen) betrachtet, um die Wirkung dieser Substanzen auf verschiedene Prionstämme (Maus-adaptierte Prionstämme 22L, RML und ME7) zu vergleichen. Nystatin scheint spezifisch auf bestimmte Prionstämme zu wirken. Dagegen weist Filipin nur in persistent infizierten Zellen inhibierende Effekte bezüglich einer PrP^{Sc}-Akkumulierung auf. Filipin scheint daher nur bedingt prionstamm-spezifische Eigenschaften zu haben. Progesteron scheint zelltypabhängig zu wirken. Zudem

ZUSAMMENFASSUNG

zeigt Progesteron unterschiedliche Effekte auf die PrP^{Sc} Akkumulierung in akut und persistent infizierten L929 Zellen.

Bekannt ist, dass Rabproteine auf die sekretorischen Transportwege regulatorisch einwirken. Genauere Analysen der Rabprotein-vermittelten zellulären Transportprozesse in Zusammenhang mit dem Transport unterschiedlicher Prionstämme während der akuten Infektionen könnten zu neuen Strategien führen, Infektionen prionstamm-abhängig zu bekämpfen oder zu verhindern. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die akute Infektion mit drei verschiedenen, Maus-adaptierten Prionstämmen in L929 Zellen charakterisiert, die defizitär bezüglich diverser Rabproteine und Endozytoseproteine sind. Dies erfolgte mit dem Ziel, die Expression wichtiger Proteine der Internalisierungsprozesse, wie Caveolin und die schwere Kette (HC) von Clathrin, und Rab-GTPasen als Regulatoren der intrazellulären Transportwege zu inhibieren. Vor der akuten Infektion der Fibroblasten wurde die Expression dieser Proteine genetisch mittels siRNA reduziert. Unterschiede in der Aufnahme und Akkumulierung von PrP^{Sc} konnten durch die Blockierung verschiedener intrazellulärer Transportwege aufgezeigt werden. Durch das Ausschalten der Expression von Caveolae und durch die Beeinträchtigung des späten endosomalen Weges mittels Rab7-siRNA kommt es zu einer schwächeren PrP^{Sc} Akkumulierung von RML-Prionen. Anders als erwartet scheint ein Ausschalten der Clathrin-HC Expression die Akkumulierung des PrP^{Sc} des Prionstammes RML noch zu verstärken. Bei der Infektion mit 22L-Prionen konnte wiederum eine Reduzierung der PrP^{Sc} Anhäufung durch das Ausschalten von Clathrin-HC und des Rab7-Gens beobachtet werden. Die PrP^{Sc} Menge erhöht sich bei der 22L-Infektion in den Zellen durch eine Rab4- und Rab9-Defizienz. Eine verringerte ME7-PrP^{Sc} Menge tritt durch die Reduzierung der Clathrin-HC Expression auf. Im Gegensatz zu den Infektionen mit RML- und 22L-Prionen fällt bei der ME7-Infektion auf, dass die Blockierung des späten endosomalen Weges mittels Rab7-siRNA nur zu einer geringen Reduzierung der PrP^{Sc} Akkumulierung führt. ME7 zeigt als einziger getesteter Prionstamm eine verringerte PrP^{Sc} Menge durch die Beeinträchtigung des frühen endosomalen Recyclingsystems, das über Rab4 reguliert wird. Das Ausschalten der Rab9 und Rab11 Expression blockiert den Transportweg in den Trans-Golgi Apparat und das langsamere Recycling zur Zelloberfläche. Dies führt zu einer erhöhten PrP^{Sc} Akkumulierung nach der akuten ME7-Infektion.

ZUSAMMENFASSUNG

Die notwendige Unterscheidung von neu synthetisiertem PrP^{Sc} und dem im Inokulum enthaltenen PrP^{Sc} fand in dieser Arbeit indirekt über die Passagendauer statt. Der PrP^{Sc} Nachweis erfolgte in der ersten Passage nach der akuten Infektion. In eigenen Vorversuchen in der 3F4-transduzierten Zelllinie L929 konnte bestätigt werden (Daten werden nicht gezeigt), dass der Nachweis von *de novo* PrP^{Sc} erst nach 24 h möglich ist (Vorberg *et al.*, 2004b). Zudem wurde eine Infektionskinetik eines Zellklons neuronaler Zellen des Hippocampus, der stabil das 3F3-Epitop exprimiert (Hpl-3F4 K11), durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass bereits nach einer Inkubationszeit von 3 h, mit Hirnhomogenat des Prionstammes 22L, in der ersten Passage nach Infektion neu synthetisiertes PrP^{Sc} in den Zellen nachweisbar ist. Trotz der kurzen Inkubationszeit des Hirnhomogenats konnte eine persistente Infektion in diesen Zellen dokumentiert werden. Daher wurde in den akuten Infektionsversuchen dieser Arbeit das jeweilige Hirnhomogenat 4 h mit den Zellen inkubiert, um eine deutlich nachweisbare Infektion in den ersten Passagen nach der Infektion darstellen zu können.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit die Abhängigkeit der PrP^{Sc} Akkumulierung von Cholesterol und von verschiedenen Vesikeltransport- und Endozytosewegen dokumentieren. Dieser Zusammenhang konnte in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen während der persistenten und akuten Infektion mit unterschiedlichen Prionstämmen gezeigt werden. Diese Erkenntnisse könnten zu einem größeren Verständnis der Pathogenese von Prionerkrankungen beitragen.

1.2 English version

Prion diseases are fatal and neurodegenerative diseases of animals and humans. The characteristic spongiform degeneration in the central nervous system (CNS) results from deposits of the aberrantly folded pathological isoform PrP^{Sc} of the cellular prion protein PrP^C. According to the most common hypothesis a direct interaction of PrP^C and PrP^{Sc} and potentially further cellular co-factors are required for the conversion process. Prion propagation has been proposed to be involved in the endocytic pathway. Additionally, endosomes, the endosomal recycling compartment, the endoplasmic reticulum and lysosomes are implicated in trafficking and degradation. The discovery of multiple prion strains that differ in

ZUSAMMENFASSUNG

biological characteristics can lead to the assumption that the host cell response to infection with different prion strains could be altered. This leads to the question how different prion strains can be established on cellular level. Knowledge of cellular mechanisms or metabolic pathways concerning persistent and acute infections with a special prion strain might be essential to prevent infection of a certain prion strain.

In the first part of this study the effect of different cholesterol metabolism altering inhibitors was examined in persistently infected cells and during acute prion infections. Especially differences concerning neuroblastoma cells (N2a) and fibroblasts (L929) were assessed and the effect of the inhibitors on the different mouse adapted prion strains (22L, RML and ME7) was investigated. Nystatin might seem to act in a prion strain dependent manner, whereas filipin only exhibited an inhibitory effect on persistently infected cells. According to this, filipin seems to act in a prion strain dependent manner only partly. Progesterone was acting in a cell type dependent manner and showed different effects during acute and persistent infection in L929 cells.

Rab proteins are known regulators of the secretory pathway. Further analysis of the Rab protein dependent cellular trafficking combined with the transfer of different prion strains during acute infections, could lead to new strategies to prevent infection in a prion strain dependent manner. In the second part of this work the acute infection of three different mouse adapted prion strains in L929 cells, deficient for endocytosis and Rab proteins, were characterized. In order to inhibit the expression of essential internalization proteins, like the clathrin heavy chain and caveolin, and Rab GTPases, regulators of intracellular trafficking, the protein expression was genetically silenced using siRNA technique. The acute infection of the fibroblasts directly followed. After arresting distinct intracellular routes differences in uptake and accumulation of PrP^{Sc} could be observed. The PrP^{Sc} accumulation of RML appeared to be inhibited by the knockdown of caveolae, unlike the reduction of the clathrin-HC expression. The impairment of the transport to the late endosomes using Rab7-siRNA, also led to less PrP^{Sc} accumulation. In contrast, the PrP^{Sc} deposits of 22L prions appeared to be reduced by knocking down clathrin-HC and Rab7 expression. However, the amount of PrP^{Sc} was increased in cells deficient for Rab4 and Rab9. The reduction of ME7-PrP^{Sc} deposits could be detected in clathrin-HC deficient fibroblasts. In contrast to RML and 22L prion infections, there was only a small reduction of PrP^{Sc}

ZUSAMMENFASSUNG

accumulation during ME7 infection by knocking down Rab7 expression to block the late endosomal transport. ME7 was the only tested prion strain that showed minor PrP^{Sc} accumulation after inhibiting the early endosomal recycling system by using Rab4-siRNA. Silencing Rab9 and Rab11 blocked the trafficking to the trans-Golgi network and the slow recycling process towards the cell membrane. This led to an increasing PrP^{Sc} accumulation after acute ME7 infection.

The required discrimination between newly formed PrP^{Sc} and PrP^{Sc} present in the inoculum was performed indirectly in this study by the time of passaging the cells as PrP^{Sc} detection occurred in the first passage after acute infection. Furthermore, the detection of de novo produced PrP^{Sc} after 24h could be confirmed (Vorberg *et al.*, 2004b) in 3F4 transduced L929 cells (data not shown). During a previous infection kinetic in a neuronal hippocampal cell clone expressing 3F4 epitope (Hpl3F4 K11) it could be shown that newly formed PrP^{Sc} already can be detected after incubation of brain homogenate (22L prion strain) for 3 hours in the first passage after infection. Despite of the short incubation time of the brain homogenate a persistent infection could be demonstrated in these cells. Therefore, in this work respective cell were incubated with brain homogenates for 4 hours to show a clearly detectable infection in the first passage after infection.

Overall, these findings provide new insights into the connection to cholesterol and in dependence of variable vesicle transports and ways of endocytosis in persistently and acute infections of different prion strains in neuronal and non neuronal cells. These insights could probably lead to a further understanding of the pathogenesis of prion diseases.

2 Einleitung

2.1 Prionen und Prionerkrankungen

Prionerkrankungen oder transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSEs) sind neurodegenerative Erkrankungen, welche bereits viele Jahrzehnte bekannt sind. Jedoch erst seitdem gehäuft Fälle von Boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) aufgetreten sind, dem sogenannten „Rinderwahnsinn“, haben diese Erkrankungen allgemeines Interesse geweckt. Mehr als 180.000 bestätigte BSE-Fälle in Großbritannien sowie zahlreiche positiv getestete Rinder in weiteren europäischen Ländern, stellten eine ernstzunehmende Bedrohung für den Verbraucher durch in den Handel gelangtes kontaminiertes Fleisch dar (Aguzzi *et al.*, 2008). Daher wurde in den letzten Jahren intensiv an der Erforschung der Ursachen und Entstehung dieser Krankheiten gearbeitet.

TSEs sind stets letal verlaufende Neurodegenerationen des Zentralnervensystems (ZNS) mit einer langen Inkubationszeit, gefolgt von einer kurzen symptomatischen Phase, die sowohl bei Tieren (Tabelle 2) als auch beim Menschen (Tabelle 3) auftreten (Prusiner *et al.*, 1998b; Belay 1999; Collinge 2001). Diese können unter bestimmten Bedingungen durch Infektion innerhalb einer Art und begrenzt zwischen Arten weitergegeben werden (Weissmann *et al.*, 1996; Prusiner 1998a). TSEs werden offenbar nicht von Viren übertragen, sondern von Prionen verursacht. Neuropathologisch lässt sich ein massiver, schwammartiger (spongiformer) Zerfall des ZNS, der verschiedene Teile der Grauen Substanz des Gehirns betrifft, erkennen. Neben dem Verlust von Neuronen lässt sich außerdem die Proliferation von Astrozyten und die Akkumulierung von fehlgefaltetem Prionprotein-Ablagerungen beobachten (DeArmond & Prusiner 1995; Aguzzi & Polymenidou 2004; Weissmann 2004). Eine häufige Begleiterscheinung ist die Bildung amyloider Plaques (Glatzel & Aguzzi 2001).

2.1.1 Das Prionprotein

1936 konnte die experimentelle Übertragung von der Traberkrankheit auf gesunde Schafe und Ziegen durch infektiöses Schafhirnhomogenat gezeigt werden. Die Krankheit wurde aufgrund des charakteristischen extensiven Kratzens der betroffenen Tiere auch *Scrapie* (aus dem Englischen *scrape* = kratzen) genannt (2.1.4, Tabelle 3). Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Erreger um einen Virus handeln müsse. 1954 postulierte Sigurdson eine langsame Virus-Infektion (*slow virus infection*) mit Inkubationszeiten von etwa 20 Jahren (Sigurdson, 1954). Jedoch ließ sich weder ein Virus in den betroffenen Patienten nachweisen, noch eine durch Virusinfektion üblicherweise ausgelöste Immunantwort beobachten. Desweiteren widersprach die Resistenz der Erreger gegenüber massiver DNA- und RNA-schädigender UV-Strahlung dieser Hypothese (Alpers *et al.*, 1966). Die Infektiösität konnte nur durch die Behandlung mit Harnstoff oder Natriumhydroxid reduziert werden, wobei es sich um Chemikalien handelt, die Proteine hydrolysieren oder modifizieren (Alpers *et al.*, 1966; Alpers *et al.*, 1967). Griffith stellte 1976 die Vermutung auf, dass ein Protein für die Übertragung von *Scrapie* verantwortlich sein könnte (Griffith, 1976). Prusiner und seine Mitarbeiter isolierten 1982 ein protease-resistentes Glykoprotein. Dies stellt den Hauptbestandteil in infektiösen Fraktionen aus Hirnhomogenat infizierter Tiere dar. Dieses spezielle Protein konnte filamentöse Strukturen, so genannte scrapie-assoziierte Fibrillen (scrapie-associated fibrils, SAF) ausbilden (Hilmert & Diring, 1984; Lehmann & Harris, 1996; Prusiner *et al.*, 1981; Prusiner, 1982). So prägte S. Prusiner die Definition „Prion“ für „**proteinaceous infectious particle**“, als Bezeichnung für den neuen proteinbasierten Erreger ohne Nukleinsäure. Das aus Hirnhomogenatfraktionen von infizierten syrischen Hamstern isolierte Proteinase K (PK)-resistente Protein besitzt ein Molekulargewicht zwischen 27 und 30 kDa. Die PK-resistente Form wurde später als PrP^{Sc} (Sc = Scrapie) bezeichnet, um auf den infektiösen Charakter des Proteins hinzuweisen (Cohen *et al.*, 1994; Prusiner 1998a; Collinge 2001; Aguzzi & Polymenidou 2004; Weissmann 2004). Weissmann *et al.* gelang es durch Sequenzanalysen des Amino-Terminus von PrP^{Sc} mittels *Edman Degradierung* (Prusiner *et al.*, 1984) das Prionprotein (PrP)-Gen *PRNP* (Oesch *et al.*, 1985) zu identifizieren und in einen Expressionsvektor zu klonieren.

Erstaunlicherweise zeigten Untersuchungen, dass PrP-mRNAs in *Scrapie*-infizierten und uninfizierten Geweben identisch sind. Dieser Aspekt führte zur Isolierung einer nicht infektiösen, protease-sensitiven und detergenten-löslichen zellulären Isoform des Prionprotein, das als PrP^C (C= zellulär, engl. *cellular*) bezeichnet wurde. Dieses PK-sensitive Vorläuferprotein besitzt ein Molekulargewicht von 33 und 35 kDa. Beide Isoformen des Prionproteins verfügen über dieselbe Aminosäuresequenz, unterscheiden sich jedoch entscheidend in ihren strukturellen und biochemischen Eigenschaften (Prusiner, 1991). Zahlreiche Daten unterstützen heute die Hypothese, dass Prionen ausschließlich aus einer abnormen, missgefalteten Isoform des zellulären Prionproteins PrP^C bestehen (*protein-only* Hypothese). Legname *et al.* beschrieben, dass *in vitro* generierte PrP-Fibrillen, bestehend aus N-terminal verkürztem PrP (PrP89-231), in transgenen Mäusen (TG) Prionerkrankungen auslösen können. Die rekombinanten PrP-Fibrillen waren jedoch in Wildtyp (WT)-Mäusen nicht infektiös (Legname *et al.*, 2004). Der erste Nachweis der Infektiosität *in vitro* generierter PrP^{Sc} Moleküle, und somit das bisher stärkste Indiz der „nur-Protein Hypothese“ (*protein-only* Hypothese), konnte mit PrP^C aus Gehirnhomogenat über eine PMCA-Reaktion (*protein misfolding cyclic amplification reaction*, Abb. 1) in WT-Tieren nachgewiesen werden (Castilla *et al.*, 2005). Durch die Verwendung von Gehirnhomogenat als Ausgangsmatrize von PrP^{Sc} kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass zelluläre Kofaktoren für die *in vitro* Konversion notwendig sind. Diese könnten im verwendeten Gehirnhomogenat enthalten sein.

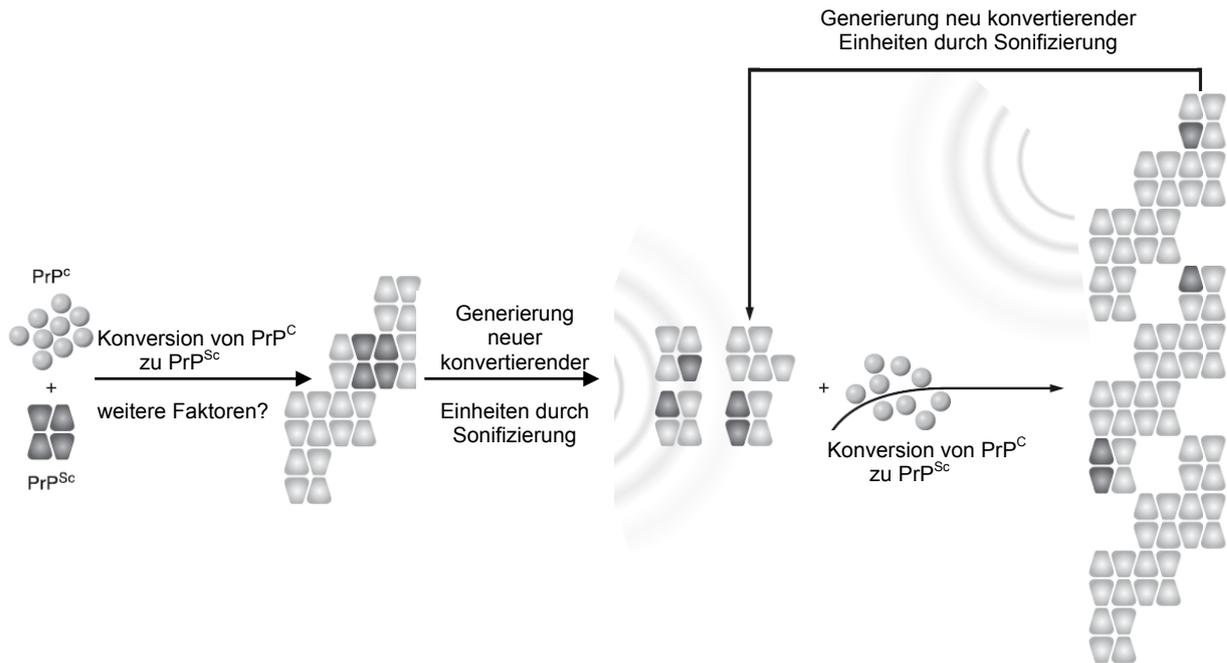


Abb. 1: Schematische Darstellung der PCMA-Reaktion. Kleine Mengen PrP^{Sc}-infiziertes Hirnhomogenat werden mit PrP^C aus nicht infektiösem Gehirnhomogenat inkubiert, um weitere PrP^{Sc} Moleküle durch autokatalytische Umfaltung zu generieren. Der amplifizierte PrP^{Sc} Kern wird durch Sonifizierung immer wieder aufgelöst, um PrP^{Sc} Einheiten für eine erneute Umfaltung von PrP^C zu erhalten. Diese Reaktion wird mehrere Male wiederholt. PrP^C Isomere sind als hellgraue Kugeln dargestellt. PrP^{Sc} stellt dunkelgraue Trapeze dar. Die originale PrP^{Sc} Matrize ist dunkelgrau, das neu synthetisierte PrP^{Sc} ist hellgrau eingefärbt (entnommen aus Aguzzi & Calzavara, 2009 und modifiziert).

2.1.2 Mechanismus der Prionprotein-Konversion

Nach der „nur-Protein-Hypothese“ vermutet man, dass das zelluläre PrP durch direkten Kontakt mit der pathogenen Isoform in PrP^{Sc} konvertiert wird. Der exakte Mechanismus der Konversion ist Gegenstand intensiver Forschung. Die Heterodimer-Hypothese (Abb. 2A) postuliert eine spontane Umfaltung von PrP^C zu PrP^{Sc}, die unter normalen Umständen durch eine hohe Energiebarriere verhindert wird. Durch die Interaktion zwischen endogenem PrP^C und exogen aufgenommenem PrP^{Sc} bildet sich ein Heterodimer, das die Struktur eines PrP^{Sc} Homodimers annimmt. Um die Energiebarriere zu überwinden, könnte der Prozess der Umfaltung von zellulären Faktoren - wie Chaperonen- abhängig sein. Die neu entstandenen Homodimere zerfallen in Monomere, die neue PrP^C Moleküle umfalten können (Prusiner *et al.*, 1990; Cohen *et al.*, 1994).

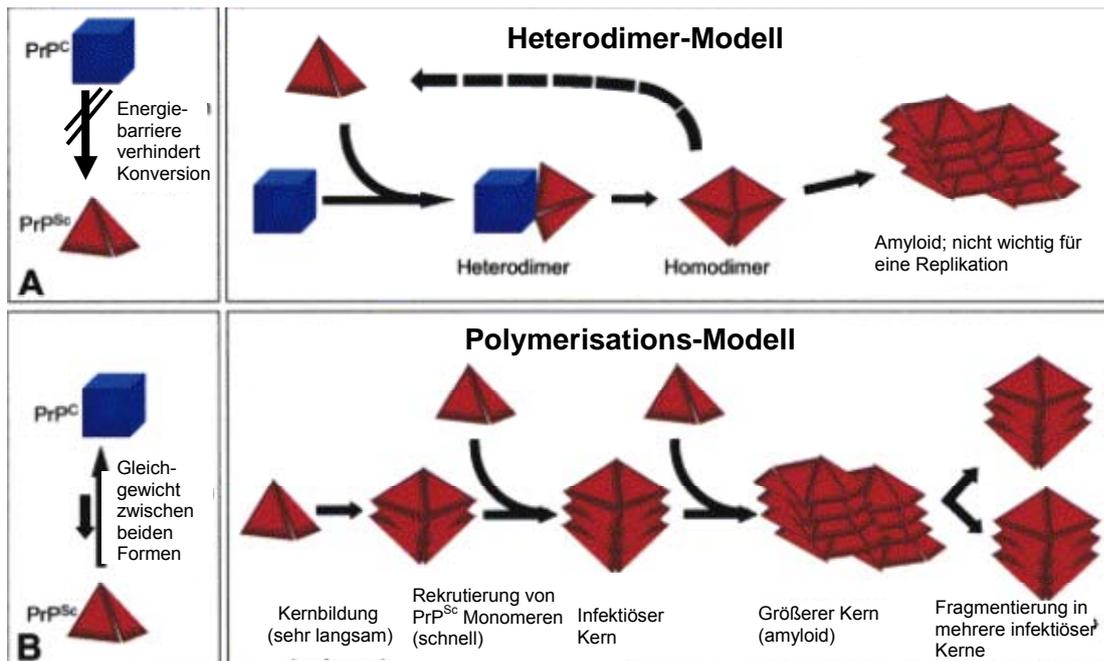


Abb. 2. Modellvorstellungen der Konversion und Replikation von Prionen (A) Heterodimer-Modell (B) Polymerisations-Modell (entnommen aus Aguzzi & Polymenidou, 2004 und bearbeitet).

Zahlreiche Hinweise sprechen mittlerweile jedoch für ein amyloides Modell, bei welchem PrP^{Sc} Aggregate während einem Kristallisationsprozess gebildet werden. Dieser Prozess ist auch als keimabhängige Polymerisation bekannt (Serio *et al.*, 2002; Caughey 2003; Soto *et al.*, 2006) (Abb. 2). Das Polymerisations-Modell (Abb. 2B) geht von einem möglichen reversiblen thermodynamischen Gleichgewicht zwischen PrP^C und PrP^{Sc} aus. Erst wenn mehrere PrP^{Sc} Moleküle in Kontakt kommen, stabilisiert sich die PrP^{Sc}-Struktur und einige PrP^{Sc} Monomere sind in der Lage einen „Keim“ zu bilden. Aufgrund der hohen Energiebarriere ist dieser Schritt sehr langsam, zudem das thermodynamische Gleichgewicht auf der Seite des PrP^C liegt. Durch diesen „Keim“ können weitere PrP^{Sc} Moleküle in die polymerisierenden Aggregate rekrutiert werden und der Prozess beschleunigt sich. Die Anzahl der neuen infektiösen „Keime“ erhöhen sich durch Fragmentierung der PrP^{Sc} Aggregate, wodurch sich die Bildung weiterer amyloider Aggregate exponentiell steigert (Jarrett & Lansbury, 1993; Gajdusek, 1994; Caughey *et al.*, 1995). Ob Kofaktoren in einzelnen Schritten der PrP^{Sc} Konversion benötigt werden, ist bislang unbekannt, kann aber nicht ausgeschlossen werden.

2.1.3 Ort der Konversion

Der Ort der Umfaltung in die pathogene Isoform PrP^{Sc} ist weitgehend unbekannt. Da der direkte Kontakt von PrP^{Sc} mit PrP^C unerlässlich ist, geht man davon, dass die Umfaltung von PrP^C in PrP^{Sc} in zellulären Kompartimenten stattfindet, in welchen auch PrP^C lokalisiert (Abb. 3, 4) (Borchelt *et al.*, 1990; Taraboulos *et al.*, 1990a; Caughey *et al.*, 1991b). Durch die Isolierung detergenten-unlöslicher Membrandomänen (DRMs), die mittels Triton-X von Zellen und infiziertem Gehirn isoliert wurden, konnte nachgewiesen werden, dass die zwei Isoformen in unterschiedlichen Kompartimenten der Zellmembran liegen und deren Interaktion verhindert (Morris *et al.*, 2006) (Abb. 3). Es wird vermutet, dass die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} entweder direkt an der Plasmamembran oder der nachfolgenden Endozytose, über CCPs, Rafts und Caveolae, oder in den frühen Kompartimenten des endozytotischen Weges stattfindet (Borchelt *et al.*, 1992; Naslavsky *et al.*, 1997). In einigen Versuchen wurden sterolbindende Antibiotika wie Amphothericin B, Lovastatin und Filipin, die *Lipid Rafts* zerstören, verwendet. Die Behandlung von *Scrapie*-infizierten Zellen mit diesen Substanzen führte zu einem Rückgang von PrP^{Sc} (Taraboulos *et al.*, 1995; Marella *et al.*, 2002; Hartsel & Weiland, 2003). Auch der Einsatz von Chlorpromazin, das die rezeptorvermittelte Endozytose verhindert, reduziert die Menge an gebildetem PrP^{Sc} (Korth *et al.*, 2001).

EINLEITUNG

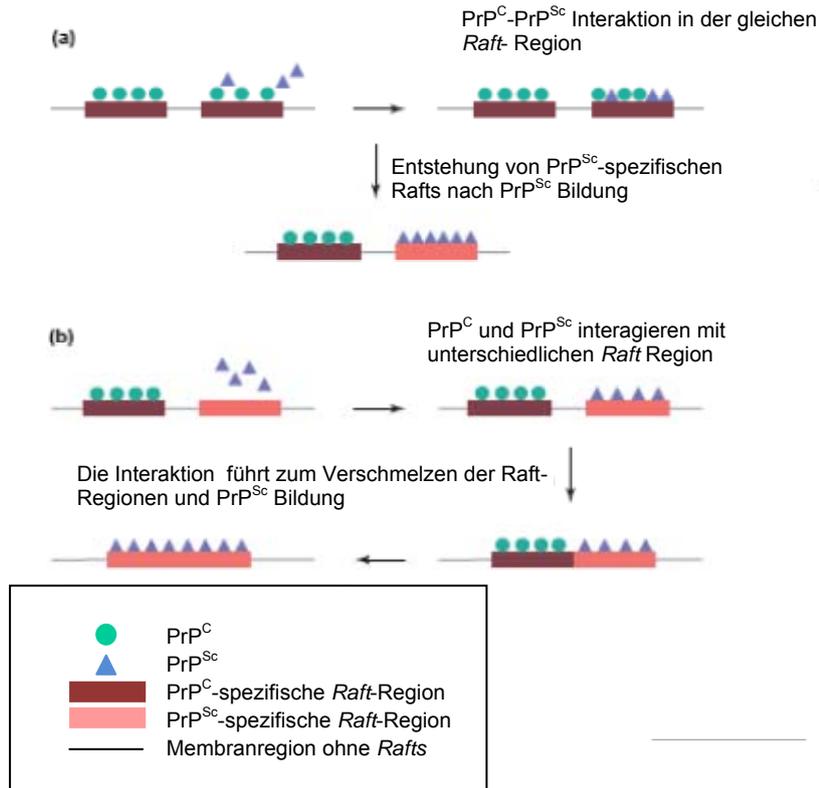


Abb. 3. Modelle der Assoziation von PrP^C and PrP^{Sc} in Rafts. Einige Daten verdeutlichen, dass PrP^C und PrP^{Sc} in unterschiedlichen Typen von Rafts lokalisieren. Diese Erkenntnisse können an diesen zwei spekulativen Modellen erklärt werden. **(A)** PrP^{Sc} interagiert mit PrP^C innerhalb der Rafts, in welchen PrP^C üblicherweise lokalisiert. Durch die Bindung an PrP^C kann PrP^{Sc} diese Membranregion destabilisieren und so die PrP^C-PrP^{Sc} Konversion und die Bildung von PrP^{Sc} spezifischen Rafts ermöglichen. **(B)** PrP^C und PrP^{Sc} sind mit unterschiedlichen Rafts assoziiert. Die Interaktion und Konformationsänderung zwischen PrP^C und PrP^{Sc} findet nach der Verschmelzung der Rafts statt. (entnommen aus Campana *et al.*, 2005 und bearbeitet)

Ebenso konnte beobachtet werden, dass der Transport von PrP^C an die Plasmamembran, und die Endozytose notwendig für die Konversion von PrP^C in PrP^{Sc} ist. Durch die Blockade eines dieser Wege mittels Suramin, Brefeldin A oder einer dominant-negativen Mutante von Dynamin kommt es zu einer Verminderung der PrP^{Sc} Akkumulation (Gilch *et al.*, 2001; Taraboulos *et al.*, 1992; Gorodinsky & Harris, 1995). Caughey *et al.* zeigten in früheren Studien, dass das PrP^C für die Konversion zuerst die Zellmembran passieren muss (Caughey *et al.*, 1991b). Daher wurde angenommen, dass der sekretorische Weg über das ER und den Golgi-Apparat keine Rolle bei der Konversion spielt (Caughey *et al.*, 1991b). Unterschiedliche Studien konnten mittlerweile zeigen, dass die notwendige

Oberflächenexpression von PrP^C für die Konversion, die Bildung von PrP^{Sc} in den Kompartimenten des sekretorischen Weges nicht ausschließt.

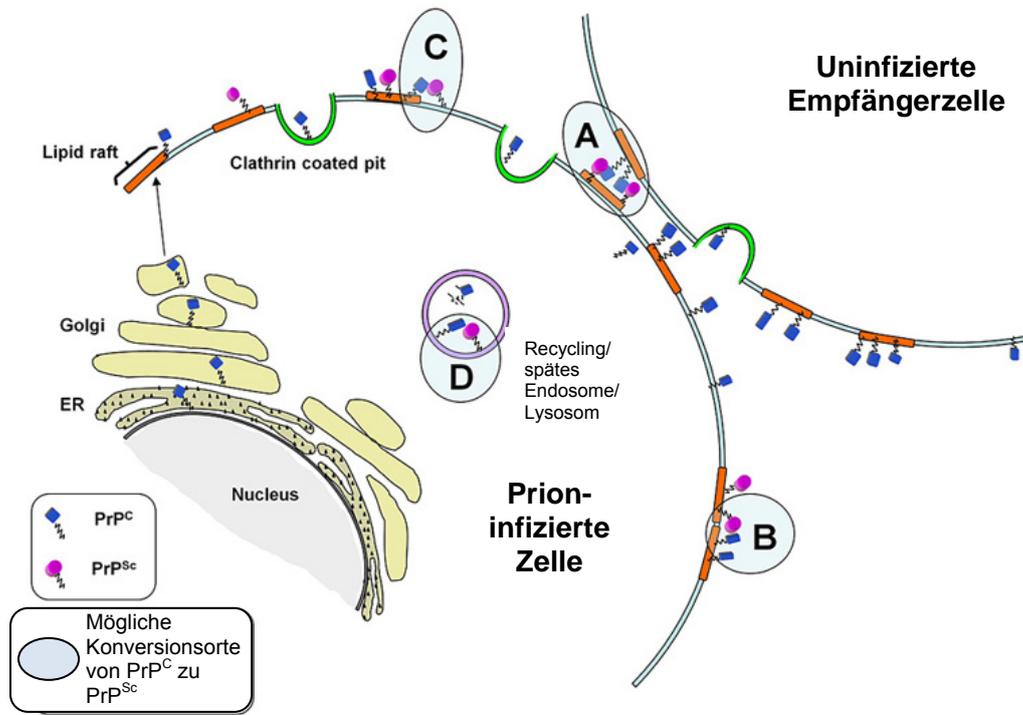


Abb. 4. Mögliche Konversionsorte in der Zelle. (A) Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} an der Zellmembran nach direktem Kontakt zwischen uninfizierten und infizierten Zellen. (B) Große Ansammlungen von Lipid Rafts ermöglichen die Interaktion von ansonsten getrennten PrP^C und PrP^{Sc} Proteinen. (C) In „Nicht-Raft“ Regionen gebundenes PrP^{Sc} fördert die Konversion von angrenzenden in Rafts lokalisierten PrP^C Proteinen. (D) Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} in endozytotischen Vesikeln. Im Falle von (A) kann das Prionprotein in Rafts lokalisiert sein. Ebenso kann in „Nicht-Raft“ Regionen assoziiertes Prionprotein in die Konversion involviert sein. Möglichkeit (B) zeigt die Konversion an der Zelloberfläche; diese kann jedoch auch in intrazellulären Vesikeln stattfinden (entnommen aus Lewis & Hooper, 2011 und bearbeitet).

In den neuronalen Maus Zellen N2a konnten nur geringe Mengen von PrP^{Sc} an oder nahe der Plasmamembran nachgewiesen werden (Borchelt *et al.*, 1990; Caughey & Raymond 1991; Vey *et al.*, 1996). Große Mengen PrP^{Sc} akkumulierten in sekundären Endosomen und Lysosomen, wo es nur langsam von der Zelle abgebaut werden kann (McKinley *et al.*, 1991; Arnold *et al.*, 1995; Mironov, Jr. *et al.*, 2003) (Abb.4). Experimente von Bèranger *et al.* deuten darauf hin, dass das endoplasmatische Retikulum in den Umfaltungprozess von PrP^C zu PrP^{Sc} involviert ist. (Bèranger *et al.*, 2002). Unter speziellen experimentellen Bedingungen, aggregiert ein kleiner Teil von PrP^{Sc} in zytosolischen Aggresomen (Kristiansen *et al.*, 2005). Hier kann es die

Funktion von Proteasomen vermindern (Kristiansen *et al.*, 2007). Kolokalisierungsstudien mit fluoreszenzmarkierten Markerproteinen spezifischer Zellorganelle konnten zeigen, dass das endosomale Recycling Kompartiment (endosomale recycling compartment, ERC) als Konversionsort möglich ist. In diesen Versuchen wurden in verschiedenen persistent infizierten Zelllinien mit dominant-negativen Rabproteinen und RNAi Technologie die Funktion unterschiedlicher Vesikel gestört und die PrP^{Sc} Menge innerhalb dieser Vesikel analysiert (Marijanovic *et al.*, 2006).

Die Verbreitung von PrP^{Sc} von einer infizierten zu einer uninfizierten Zelle kann wie bei PrP^C über Exosomen stattfinden (Fevrier *et al.*, 2004; Porto-Carriero *et al.*, 2005; Robertson *et al.*, 2006; Vella *et al.*, 2007). Dies könnte die Übertragung des Erregers durch konditioniertes Kulturmedium spezieller infizierter Zelllinien erklären (Schätzl *et al.*, 1997; Maas *et al.*, 2007). Als konditioniertes Medium diene in diesem Fall das Kulturmedium der infizierten Zelllinien, in dem daraufhin uninfizierte Zellen kultiviert wurden. Auch ein direkter Zell-Zell-Kontakt (Kanu *et al.*, 2002) ist möglich. Die Frage, wie der Erreger während einer akuten Infektion in Zelle gelangt, ist weitgehend unklar. Bereits gezeigt wurde, dass das transmembrane LRP/LR Protein, ein bekannter PrP^C-Rezeptor (2.4) die initiale Aufnahme von PrP^{Sc} in bestimmten Zelllinien begünstigt. Die direkte Interaktion von exogenem PrP^{Sc} mit LRP/LR konnte in Enterozyten und BHK (*baby hamster kidney*) Zellen beobachtet werden (Morel *et al.*, 2005; Gauczynski *et al.*, 2006). Glukosaminoglykane (GAG), wie Heparansulfat, sind u.a. Bestandteile der extrazellulären Matrix und können als Interaktionspartner von Prionen dienen. In Versuchen mit CHO, N2a und GT-1 Zellen werden GAGs für frühe Schritte der Endozytose von PrP^{Sc} benötigt (Hijazi *et al.*, 2005; Horonchik *et al.*, 2005). In neuronalen Septumzellen SN56 konnte die Aufnahme und Lokalisierung von fluoreszenz-markiertem PrP^{Sc} in Rab7-positiven, späten Endosomen und Lysosomen (Magalhaes *et al.*, 2005) dargestellt werden.

2.1.4 Strukturelle und biochemische Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc}

Trotz der bisherigen Lehrmeinung, dass eine Aminosäuresequenz nur für eine biologisch aktive Variante mit einer bestimmten Konformation kodieren kann, existiert

das Prionprotein trotz identischer Primärstruktur in mindestens zwei unterschiedlichen Sekundärstrukturen (Anfinsen, 1973; Pan *et al.*, 1993). Infrarot-Spektroskopie und Zirkulardichroismus-Spektroskopie (*circular dichroism*, CD) konnten zeigen, dass PrP^C zu etwa 42% aus α -Helices und zu 3% aus β -Faltblattstrukturen aufgebaut ist. Dagegen bildet PrP^{Sc} 30 % α -helikale Bereiche und 45 % β -Faltblattstrukturen aus (Caughey *et al.*, 1991a; Safar *et al.*, 1993; Gasset *et al.*, 1993; Pergami *et al.*, 1996; Stahl *et al.*, 1993). Kernmagnetische Resonanz-Analysen (*nuclear magnetic resonance*, NMR) von rekombinatem PrP₂₃₋₂₃₁ konnten zeigen, dass die aminoternale Domäne des PrP^C (23-120) flexibel ist und über keine definierte Struktur verfügt. Der Carboxyl (C)-Terminus (121-231) nimmt hingegen eine globuläre Form an, bestehend aus drei α -Helices und zwei kurzen antiparallelen β -Faltblättern (Riek *et al.*, 1997) (Abb. 5).

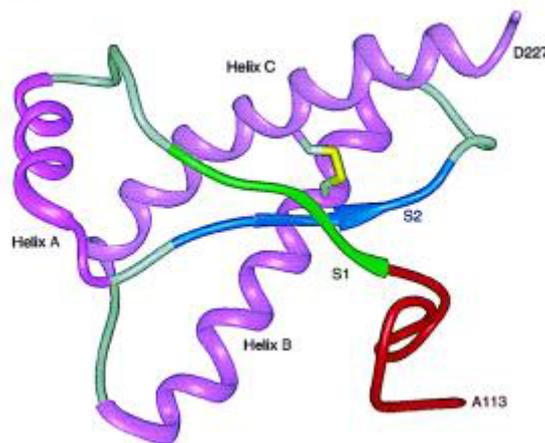


Abb. 5. NMR-Struktur des PrP^C (aa 90-231) eines syrischen Hamsters. Das PrP^C ist aus drei α -Helices (violett) und zwei β -Faltblättern (blau und grün) aufgebaut. Die intramolekulare Disulfidbrücke ist in gelb eingezeichnet. In rot eingefärbt ist der C-terminale Bereich des flexiblen Aminoterminus (90-120) (entnommen aus Prusiner, 1998a).

Der N-Terminus des PrP enthält eine sog. *Oktarepeat*-Region (engl. repeat = Wiederholung). Diese kann Metallionen oder andere Liganden binden. Demzufolge könnte der N-Terminus des PrP *in vivo* eine globuläre Struktur einnehmen (Gill *et al.*, 2000). Um Einblicke von der PrP^{Sc} Struktur zu erhalten wurden 2D-Kristalle in elektronenmikroskopischen Untersuchungen und mittels molekularer Modellierung (*molecular modeling*) analysiert (Wille *et al.*, 2002; Govaerts *et al.*, 2004, Colby &

Prusiner 2011). Demnach könnten PrP^{Sc} Aggregate aus Komponenten von Trimeren aus linksgängigen β -Helices, Disulfidbrücken und C-terminale α -Helices (Abb. 6) bestehen. Aufgrund der Unlöslichkeit des PrP^{Sc} ist eine NMR-Analyse nicht möglich.

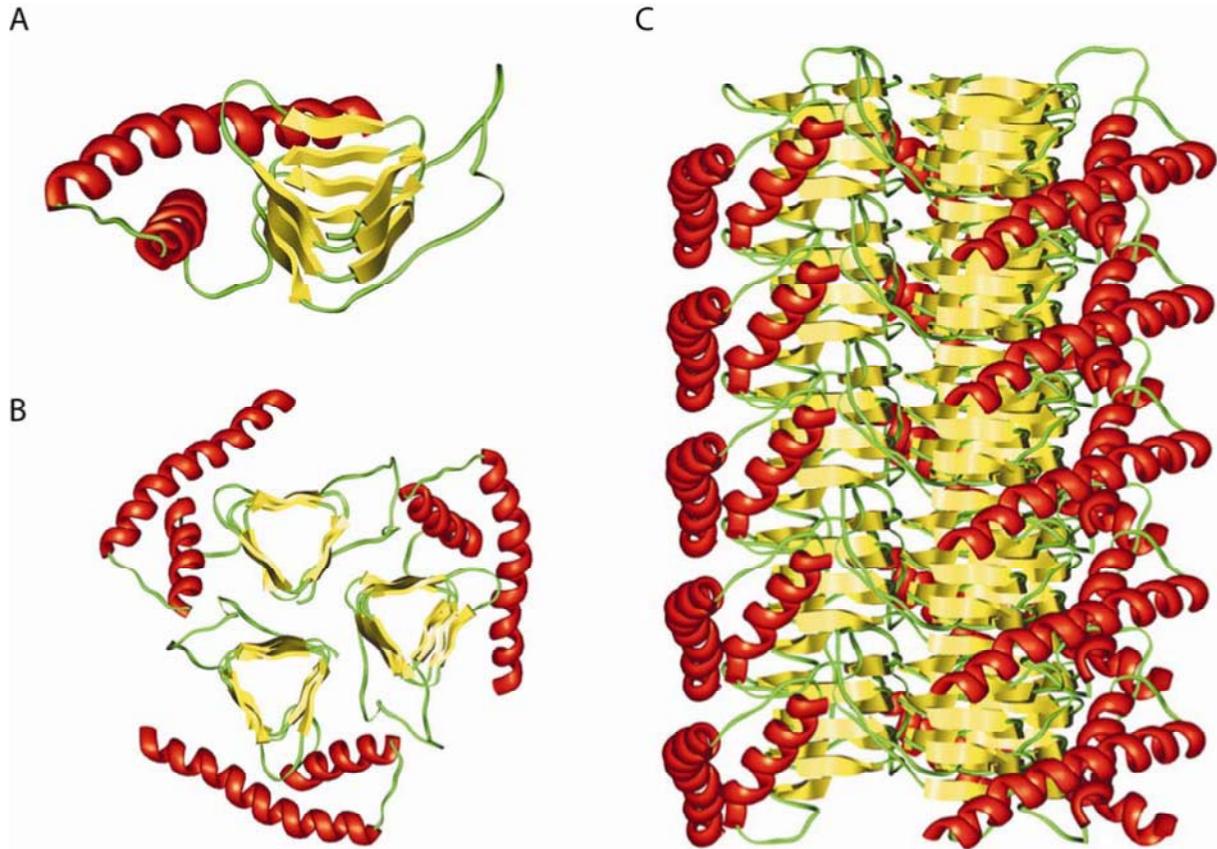


Abb. 6. Modell einer PrP^{Sc} Struktur und mögliche Bildung von Prionenfibrillen. (A) Modell einer möglichen PrP^{Sc} Konformation **(B)** Trimer-Modell mit drei PrP^{Sc} linksgängigen β -Faltblattstrukturen, welche den Kern bilden. **(C)** Modell einer Prionen-Fibrillenbildung basierend auf aufeinandergestapelten Trimeren (entnommen aus Govaerts *et al.*, 2004)

Mittels neuer Analysemethoden, der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (*electron paramagnetic resonance*, EPR), kombiniert mit dem SDSL-Verfahren (*side-directed spin labeling*), konnten Cobb *et al.* ein Modell der amyloiden Struktur des rekombinanten PrP (90-231) aufklären (Abb. 7). Während der Konversion von PrP^C wird hier ein Großteil der C-terminalen α -helikalen Region umgefaltet, wobei das Protein eine parallele, ineinander verzahnte β -Faltblattstruktur ausbildet.

EINLEITUNG

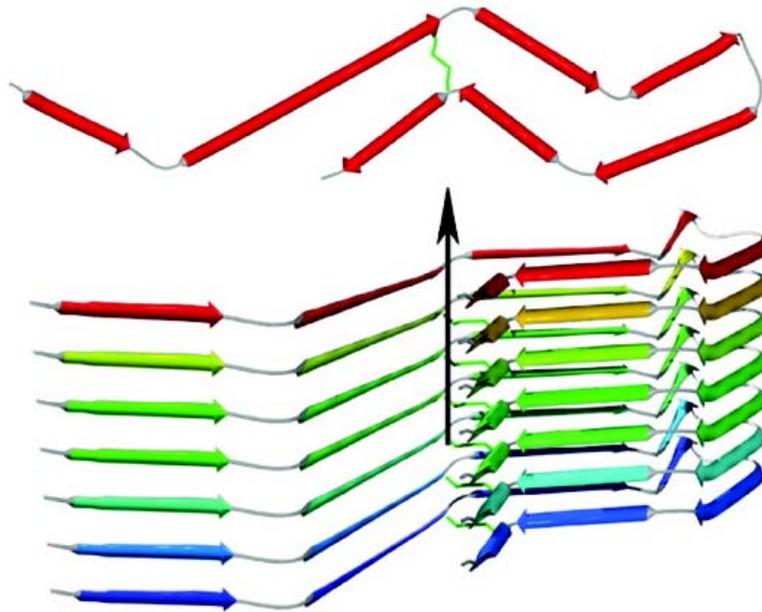


Abb. 7. PrP-Monomere. Einzelne, parallele Schichten von PrP-Monomeren, welche übereinander in β -Faltblattstrukturen und mittels Disulfidbrücken (grün eingezeichnet) fest verbunden sind (entnommen aus Cobb & Surewicz, 2009).

Beide PrP-Isoformen weisen neben den strukturellen Unterschieden auch verschiedene biochemische Charakteristika auf. Die biochemischen Eigenschaften beider Isoformen des Prionproteins sind in folgender Tabelle zusammengefasst (Tabelle 1).

Biochemische/ strukturelle Eigenschaften	PrP ^c	PrP ^{Sc}
Infektiosität	nicht infektiös	infektiös
Sekundärstruktur	hauptsächlich α -helikale Struktur	hauptsächlich β -Faltblatt Struktur
Halbwertszeit	2-6 h	≥ 24 h
Proteinase K-Resistenz	keine Resistenz	teilweise Resistenz (PrP ³³⁻³⁵ \rightarrow PrP ²⁷⁻³⁰)
Löslichkeit in Detergenzien	löslich	unlöslich

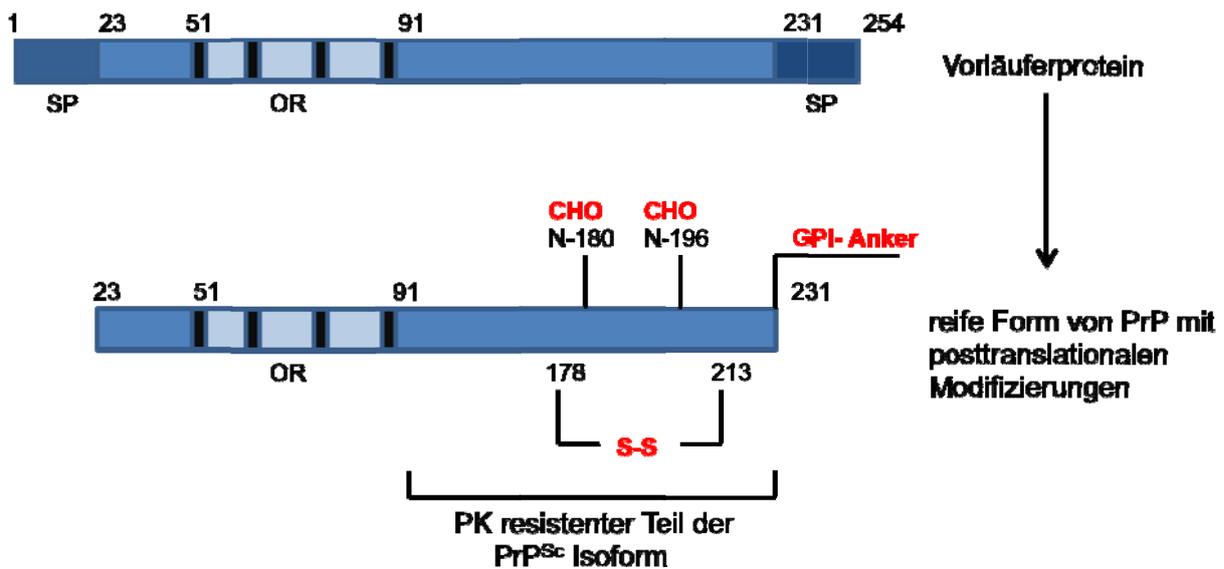
Tabelle 1. Vergleich der Eigenschaften des PrP^c und PrP^{Sc}

2.1.5 Zellbiologie des Prionproteins

Neben dem Prionprotein-Gen *PRNP* wurden noch zwei weitere PrP-ähnliche Gene gefunden. *PRND* kodiert für das Protein Doppel (Dpl), das im Gegensatz zu PrP nur in geringem Maße im Gehirn und hauptsächlich in den Hoden exprimiert wird. Das Ausschalten des Dpl-Gens in männlichen Mäusen führte zu Sterilität (Behrens *et al.*, 2002). Doppel war für die phänotypischen, neurodegenerativen Anomalitäten von PrP-*Knockout* Mäusen verantwortlich. Das Protein wurde nur zufällig in diesen Mäusen durch eine genauere Analyse einiger transgener Vektoren, in denen der *PRNP*-Lokus deletiert wurde, beschrieben (Moore *et al.*, 1999; Rossi *et al.*, 2001). Das *SPRN*-Gen kodiert für das Protein Shadoo (Sho) und wurde durch Datenbankanalysen über eine stark homologe DNA-Sequenz zu PrP entdeckt (Premzl *et al.*, 2003). Das Shadoo-Protein wird größtenteils im Gehirn exprimiert. Über die physiologische Funktion von Shadoo ist nur wenig bekannt. Eine neuroprotektive Rolle, ähnlich dem PrP, wird in Betracht gezogen (Watts *et al.*, 2007). Bisher wurden die Prionprotein-Gene von über 70 Spezies analysiert. Sie sind sowohl in Säugetieren als auch in Vögeln, Fischen und Beuteltieren evolutionär hoch konserviert (Schätzl *et al.*, 1995; Wopfner *et al.*, 1999; Harris *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 2002; Rivera-Milla *et al.*, 2003; Windl *et al.*, 1995). Das Gen des Prionproteins *PRNP* ist im Menschen auf Chromosom 20 und in der Maus auf Chromosom 2 lokalisiert (Robakis *et al.*, 1986; Sparkes *et al.*, 1986). Der gesamte offene Leserahmen (ORF) aller bekannten PrP-Gene, der für das 255 Aminosäuren (AS) umspannende Protein kodiert, befindet sich im dem größten Exon am 3'-Ende des Chromosoms (Hsiao *et al.*, 1989; Schätzl *et al.*, 1995). Desweiteren enthalten alle bekannten PrP-Gene ein kleines Exon (Menschen, Hamster) oder zwei kleine Exons am 5'-Ende (Mäuse, Rinder, Schafe). Da die komplette kodierende Region in einem Exon lokalisiert ist, bietet sich nicht die Möglichkeit unterschiedliche Proteinisoformen durch alternative Splicingvorgänge zu bilden (Basler *et al.*, 1986; Westaway *et al.*, 1994). Der *PRNP*-Promotor enthält keine TATA-Box und ist aus einzelnen, sich wiederholenden GC-reichen Abschnitten aufgebaut. Da an den *PRNP*-Promotor die Transkriptionsfaktoren SP1 (*specificity protein 1*) und AP1 (aktivierendes Protein 1) binden können, kann *PRNP* als ein Haushaltsgen (*house-keeping gene*) betrachtet werden (McKnight *et al.*, 1986). Bellingham konnte mit seinen Mitarbeitern

feststellen, dass die Transkriptionsfaktoren SP1 und MTF-1 (*metal transcription factor*) die humane PrP^C Expression regulieren und desweiteren die Funktion des Prionproteins in der Kupfer-Homöostase unterstützen (Bellingham *et al.*, 2009).

A



B

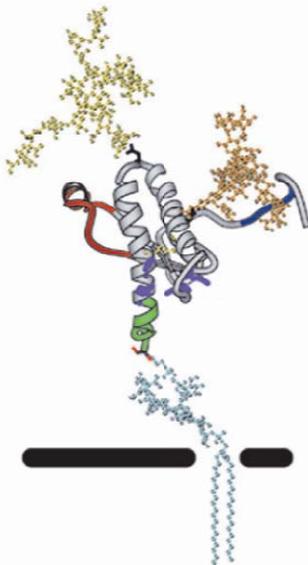


Abb. 8. (A) Schematische Darstellung des Vorläuferproteins und der reifen Form des murinen PrP^C. Die N-terminalen (AS 1-22) und C-terminalen (AS 232-254) Signalpeptide (SP) werden abgespalten und ein GPI-Anker (Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol) wird mit dem C-Terminus des Proteins an Serin 231 kovalent verknüpft. Es wird eine intramolekulare Disulfidbrücke (S-S) zwischen C178 und C213 ausgebildet. Das murine Protein kann an zwei N-Glykosylierungsstellen (CHO) an den Positionen N180 und N196 modifiziert werden. Der C-terminale Abschnitt (AS 91-231) stellt den PK-resistenten Anteil der PrP^{Sc} Isoform dar. OR steht für *Oktarepeat-Region* **(B) Lokalisierung von PrP^C auf der Zelloberfläche.** Modell der reifen Form von PrP^C, welches über den GPI-Anker in der äußeren Plasmamembran verankert ist. (Abb. 8B entnommen aus Peretz, 2001)

Die 22 Aminosäuren am Aminotermius stellen die ER-Signalsequenz des Vorläuferprotein für die Translokation der Polypeptidkette in das raue endoplasmatische Retikulum (ER) dar. Es wird während des kotranslationalen Transports abgespalten (Oesch *et al.*, 1985). In einem weiteren Reifungsprozess

können die beiden Asparaginreste N180 und N196 des murinen PrP^C glykosyliert werden (Bolton *et al.*, 1985). Hierdurch entsteht das typische Drei-Banden-Muster des einfach-, doppelt- und nicht glykosylierten PrP, das im Immunoblot-Verfahren nachgewiesen werden kann. Nach der vollständigen Translokation von PrP ins ER wird das C-terminalen Signalpeptid abgespalten und durch einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) ersetzt (Abb. 8). Er verankert das Prionprotein in der äußeren Plasmamembran (Stahl *et al.*, 1987). Durch die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den zwei Cysteinresten C178 und C213 wird die Konformation des PrP stabilisiert (Hope *et al.*, 1996).

2.1.6 Prionerkrankungen von Tieren

Die älteste, bereits 1732 beschriebene Prionerkrankung ist die Traberkrankheit bei Schafen und Ziegen (McGowan, 1914). Die Tiere zeigen die typische Pathogenese einer Prionerkrankung. Diese führt zu einer progressiven Gehirndegeneration und manifestiert sich in Verhaltensänderungen und motorischen Einschränkungen. *Scrapie* kann horizontal zwischen Herdentieren und vertikal von Mutter- zu Jungtier übertragen werden (Brotherston *et al.*, 1968; Dickinson *et al.*, 1974). 1936 konnte jedoch erstmals auch eine speziesübergreifende Übertragung von *Scrapie* auf Ziegen nachgewiesen werden (Cuillè & Chelle, 1939).

Krankheitsform	Wirt	Ursache	Quellen
Traberkrankheit (<i>Scrapie</i>)	Schafe/ Ziegen	vertikale und horizontale Übertragung; sporadisch; orale Transmission vermutlich über verseuchtes Weideland, Speichel	Leopoldt, 1759 McGowan, 1914
bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)	Rinder	Infektion durch Prion- verseuchtes Futter; sehr selten sporadisch	Wells <i>et al.</i> , 1987
transmissible Nerz Enzephalopathie (TME)	Nerze	Infektion über verseuchtes Fleisch von Schafen und/ oder Rindern	Burger & Hartsough, 1965
chronisch zehrende Hirschkrankheit (CWD)	Wapiti, Weißwedel- hirsch, Elch	horizontale und vertikale Übertragung; orale Transmission vermutlich über verseuchtes Weideland, Speichel	Williams & Young, 1980
feline spongiforme Enzephalopathie (FSE)	Katzen, Großkatzen	Infektion über verseuchtes Fleisch von Rindern	Wyatt <i>et al.</i> , 1991 Pearson <i>et al.</i> , 1993
exotische Huftier Enzephalopathie (EUE)	Huftiere	Infektion über verseuchtes Fleisch von Rindern	Kirkwood <i>et al.</i> , 1993 Sigurdson <i>et al.</i> , 2003

Tabelle 2. Prionerkrankungen von Tieren und deren Infektionswege

Die ersten Fälle der **bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE)** wurden 1986 in Großbritannien beschrieben (Wells *et al.*, 1987). Betroffene Rinder zeigten eine ähnliche Pathogenese wie *Scrapie*-infizierte Schafe. Die Tiere sind schreckhaft, verlieren an Gewicht und können ihre Bewegungen nicht mehr kontrollieren. Die Krankheit weitete sich sehr schnell zu einer BSE Epidemie aus, die 1992 ihren Höhepunkt erreichte (Hörnlimann *et al.*, 2001). In den 90er Jahren wurden einige BSE-Fälle in anderen Ländern wie der Schweiz, Irland und Portugal bekannt. Als Ursache wurde und wird immer noch meist *Scrapie* oder ein sporadisches Auftreten einer TSE in Rindern vermutet (Prusiner *et al.*, 1991; Fraser, 2000). Beide Theorien gehen jedoch davon aus, dass die Übertragung des infektiösen Agens und die damit verbundene Überschreitung der Speziesbarriere durch Verfütterung kontaminierten Fleisches oder Tiermehl stattgefunden hat (Neokannibalismus). Das 1988

eingeführte Verbot der Verfütterung von Tiermehl führte jedoch alsbald zu einem drastischen Rückgang der Krankheitsfälle. Das Auftreten von BSE bei deutschen Rindern führte zum Erlass der EU-Richtlinien von 2001, die eine systematische Untersuchung von Schlachtvieh auf BSE vorsah, welches älter als 30 Monate (EU) bzw. 24 Monate (Deutschland) ist. Während 406 BSE-Fälle in Deutschland bis 2009 verzeichnet wurden, konnten seit 2010 keine weiteren Krankheitsfälle festgestellt werden (www.bmelv.de). Auch weltweit verringerte sich die Zahl der BSE-Neuerkrankungen von 105 Fällen in 2008 auf 12 Krankheitsfälle in 2012 (www.oie.int).

Ein Grund für das Auftreten der **chronisch zehrenden Hirschkrankheit (CWD)** ist nicht bekannt. Die Erkrankung tritt endemisch in Nordamerika und Kanada auf und wurde sowohl bei freilebenden als auch bei in Gefangenschaft lebenden Tieren beobachtet (Williams *et al.*, 1980; Gilch *et al.*, 2011). Vermutlich handelt es sich um eine spontan auftretende Krankheit, die durch Infektion weitergegeben wird, vergleichbar mit *Scrapie* bei Schafen. Obwohl CWD intrazerebral auf Rinder, Schafe und Ziegen übertragen werden kann, konnte bisher keine orale Übertragbarkeit auf Rinder oder den Menschen nachgewiesen werden (Williams, 2005). CWD gilt als äußerst ansteckend, da im Gegensatz zu anderen TSEs, CWD-Erreger in der Umwelt eine höhere Stabilität aufweisen. Eine Ansteckung ist ebenso über den horizontalen Übertragungsweg mit Urin, Fäkalien und Speichel möglich (Williams & Miller, 2002; Tamgüney *et al.*, 2009; Gilch *et al.*, 2011). Weitere TSEs bei Tieren in Gefangenschaft sind die **transmissible Nerz Enzephalopathie (TME)**, die **feline spongiforme Enzephalopathie (FSE)** und die **exotische Huftier Enzephalopathie (EUE)**. Die Übertragung scheint durch Fütterung von Prion-kontaminiertem Fleisch verursacht worden zu sein (Burger & Hartsough, 1965; Wyatt *et al.*, 1991; Kirkwood *et al.*, 1993).

2.1.7 Prionerkrankungen von Menschen

Bei humanen spongiformen Enzephalopathien finden sich drei Krankheitsformen (Prusiner 1998b; Collinge 2001, Colby & Pruisiner 2011). So wurden genetisch bedingte, sporadische und durch Infektion erworbene Fälle beschrieben (Tabelle 3). Die Symptome können variieren, jedoch leiden die Betroffenen meist an

progressiver Demenz, Depression, Bewegungsstörungen, Muskelstarre, Persönlichkeitsstörungen und Schluckbeschwerden.

Manifestationsformen	Erkrankung	Ursache
genetisch-familiär	familiäre CJD (fCJD)	Keimbahnmutation des PrP-Gens <i>PRNP</i>
	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)	
	fatale familiäre Insomnie (FFI)	
sporadisch	sporadische CJD (sCJD)	spontane Konformationsänderung von PrP; somatische Mutation im PrP-Gen (?)
erworben	iatrogene CJD (iCJD)	Dura mater- und Hornhaut-Transplantationen; humane Wachstumshormone; infiziertes Operationsbesteck/ EEG-Elektroden
	neue Variante der CJD (vCJD)	Verzehr von BSE-kontaminierter Nahrung; Bluttransfusionen
	Kuru	ritueller Kannibalismus

Tabelle 3. Manifestationen menschlicher Prionerkrankungen und deren Infektionsweg.

Fast 90% der Creutzfeldt-Jakob Erkrankungen (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921) treten **sporadisch** (sCJD) mit einer Häufigkeit von 1:1.000.000 Fälle auf (Prince *et al.*, 2006). Insbesondere Menschen im Alter von 45-65 Jahren sind betroffen. sCJD kennzeichnet sich durch eine lange Inkubationszeit, an die sich eine kurze klinische Phase (Collins *et al.*, 2006) anschließt. Man vermutet eine somatische Mutation des Prionprotein-Gens (*PRNP*) oder eine spontane Konformationsänderung des Prionproteins (PrP). Die **genetisch-familiären** Formen, die etwa 10% der CJD-Erkrankungen ausmachen, werden autosomal-dominant vererbt (fCJD). Über 40 verschiedene pathogene Mutationen (Abb. 9) des *PRNP*-Gens konnten bisher identifiziert werden (Mead, 2006; Colby & Prusiner, 2011). Vermutlich haben diese

Mutationen eine Destabilisierung des Prionproteins zur Folge, wodurch es zu spontanen Konformationsänderungen kommen kann (Owen *et al.*, 1989). Weitere Beispiele genetisch vererbter transmissibler spongiformer Enzephalopathien sind das Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom (GSS) und die fatale familiäre Insomnie (FFI). Diese werden ebenfalls durch Mutationen im *PRNP*-Gen ausgelöst (Gerstmann *et al.*, 1936; Lugaresi *et al.*, 1986). Durchschnittlich bricht GSS mit 45 Jahren aus und wird derzeit mit sieben *PRNP*-Mutationen in Verbindung gebracht, wobei GSS hauptsächlich durch die Mutation P102L ausgelöst wird (Hsiao *et al.*, 1989). Neben der üblichen Symptomatik einer Prionerkrankung zeichnet sich FFI durch progressive Schlaflosigkeit sowie Störungen des vegetativen Nervensystems aus. Meist wird sie durch eine Mutation im Codon 178 (D178N) ausgelöst (Medori *et al.*, 1992).

Die sogenannten **erworbenen** Prionerkrankungen wie Kuru, die iatrogene CJD (iCJD) und die neue Variante von CJD (vCJD) stellen die infektiöse Formen der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien dar. Kuru wurde ausschließlich bei dem Eingeborenenstamm der Fore und in einzelnen Fällen bei dessen Nachbarstämmen in Papua Neuguinea festgestellt (Gajdusek 1977). Hadlow erkannte 1959 die Ähnlichkeit in Klinik und Neuropathologie zwischen *Scrapie* und Kuru (Hadlow, 1992). Bei rituellen Begräbnissen verzehrte dieses Volk Teile verstorbener Stammesmitglieder. Zum Ausbruch der erworbenen Prionerkrankung Kuru ist es höchstwahrscheinlich erstmalig gekommen, als ein Stammesangehöriger an sporadischer CJD erkrankte und nach seinem Ableben durch den Verzehr seiner Organe der Erreger auf seine Angehörigen übertragen wurde (Wadsworth *et al.*, 1999; Wadsworth *et al.* 2008). Mitte der 50er Jahre wurde der Kannibalismus in Papua Neuguinea verboten, was das Ende der Epidemie zur Folge hatte (Alpers, 1987). Über 50 Jahre später werden, aufgrund der langen Inkubationszeiten, immer noch vereinzelt Fälle von Kuru gemeldet (Collinge, 2001). Die iatrogene CJD (iCJD) ist selten und wird während medizinischer Eingriffe übertragen, wie z.B. bei der Transplantation infektiöser Hirnhaut oder Augenhornhaut. Kontaminierte EEG-Elektroden und unzureichend sterilisierte Operationsmaterialien führten ebenfalls zu Fällen von iCJD. Auch Hormonpräparate wie das humane Wachstumshormon, das aus Leichenhypophysen extrahiert wurde, führten in den 80er Jahren vermehrt zu iCJD Fällen. Weltweit wurden bisher über 300 iatrogene Fälle bekannt (Kondo &

Kuroiwa 1982; Davanipour *et al.*, 1984). Die neue Variante CJD (vCJD) trat zum ersten Mal 1995 in Großbritannien auf, später in weiteren europäischen Ländern (Collinge & Rossor, 1996; Anderson *et al.*, 1996; Bruce *et al.*, 1997; Spencer *et al.*, 2002; Will 2003). Bisher wurden mehr als 200 vCJD-Fälle in Großbritannien und einige wenige Fälle weltweit verzeichnet (www.eurocid.ed.ac.uk; www.prionforschung.de). vCJD tritt bei verhältnismäßig jungen Patienten mit einem Durchschnittsalter von 29 Jahren auf (Spencer *et al.*, 2002; Will 2003). Ein gravierender Unterschied zu anderen Prionerkrankungen ist, dass die pathogene Prionenisoform (2.1.1) in Tonsillen und lymphoretikulären Geweben nachgewiesen werden kann (Collinge, 1997; Hill *et al.*, 1999). Chronologische und geographische Übereinstimmungen von vCJD- und BSE-Fällen führten zu den ersten Vermutungen, dass es sich hier um dasselbe infektiöse Agens handeln könnte. In den folgenden Jahren bestätigte sich die Hypothese, dass Personen durch den Verzehr BSE kontaminierten Fleisches an vCJD erkranken konnten (Will *et al.*, 1996; Collinge & Rossor, 1996; Will, 1998). Experimentell gezeigte Übertragungen im Tierversuch sowie histopathologische und molekulare Analysen unterstützen die Richtigkeit dieser These (Bruce *et al.*, 1994; Lasmezas *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1997; Wadsworth *et al.*, 2007; Collinge *et al.*, 1996). Des Weiteren sind Fällen beschrieben, in welchen eine Übertragung von vCJD auf Patienten durch Bluttransfusionen nachgewiesen werden konnten. Deren Spender erkrankten kurze Zeit später an vCJD und verstarben (Llewelyn *et al.*, 2004; Peden *et al.*, 2004; Wroe *et al.*, 2006; Hewitt *et al.*, 2006). Die an vCJD erkrankten Personen zeigten einen homozygoten Genotyp am *PRNP*-Polymorphismus 129 (Met/Met) (Collinge *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1999), der eine Schlüsselposition in der genetischen Empfänglichkeit für erworbene und sporadische Prionerkrankungen darstellt (Collinge *et al.*, 1991; Palmer *et al.*, 1991; Windl *et al.*, 1995). Nur in vereinzelt Fällen wurden ebenfalls Personen infiziert, die einen heterozygoten Genotyp am Codon 129 aufwiesen. In einem dieser Fälle verstarb ein Patient, heterozygot am Codon 129, 5 Jahre nachdem ihm eine Bluttransfusion eines vCJD-Donors verabreicht wurde. Es konnten jedoch keine pathogenen Prionen (2.1.1) im Gehirn nachgewiesen werden. Die betroffenen Regionen waren Milz und Lymphknoten (Peden *et al.* 2004).

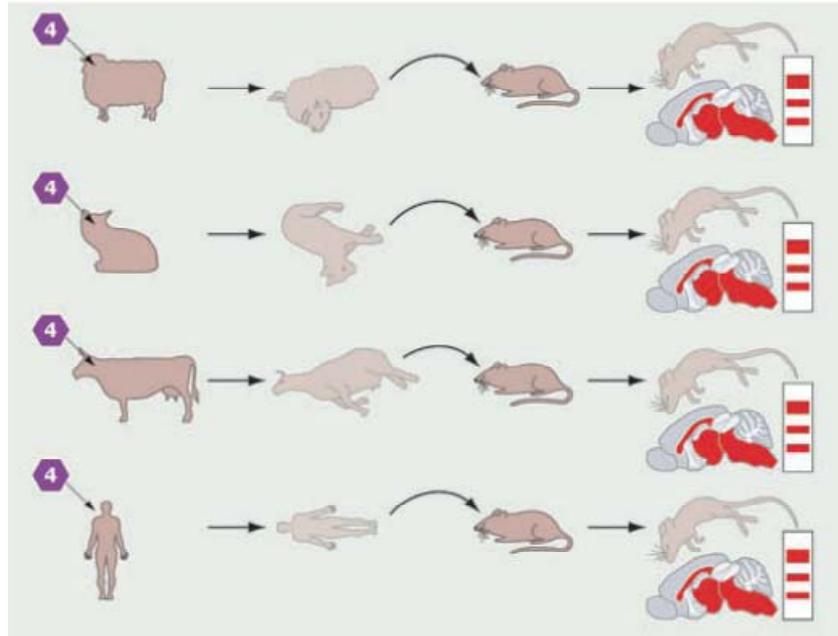


Abb. 10. Übertragung von Prionstämmen. Die Eigenschaften eines Prionstammes können nach Passagieren in verschiedenen Spezies mit unterschiedlichen PrP^C-Sequenzen beibehalten werden, wenn eine weitere Übertragung in den Ursprungswirt stattfindet (entnommen aus Collinge *et al.*, 2007).

In Experimenten wurden Prionerkrankungen von einer Spezies auf eine andere übertragen. Es konnte eine Verlängerung der Inkubationszeit beobachtet werden, die sich bei einer erneuten Übertragung innerhalb der Spezies wieder verkürzte (Abb. 13). Die Ursache dieser erschwerten Übertragbarkeit wurde als Speziesbarriere bezeichnet (Pattison & Jones, 1968) und konnte in anschließenden Experimenten bestätigt werden. Die Übertragung von infektiösem Material aus Kühen, Schafen und Ziegen auf Mäuse mit einem PrP-Polymorphismus an den AS-Positionen 108 und 189 zeigte eine große Diversität der Prionstämme auf (Carp *et al.*, 1987). Des Weiteren konnte durch die Übertragung zweier humaner TSE-Erkrankungen auf Mäuse, die ein chimeres Hu/Mo PrP-Transgen exprimierten, gezeigt werden, dass die stammspezifische Information in der Struktur des PrP^{Sc} verankert ist (Telling *et al.*, 1996). Verschiedene humane Prionstämme konnten zudem isoliert werden (Abb. 12). Werden Hirnhomogenate dieser humanen Prionstämme in TG-Mäusen inkubiert, zeigen die Prionstämme noch immer dieselben biologischen und biochemischen Charakteristika (Monari *et al.*, 1994; Parchi *et al.*, 1996). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass PrP^{Sc} als Matrize für die Konversion von PrP^C in neugebildetes PrP^{Sc} dient (Abb.12).

EINLEITUNG

Versuche mit chimären Prionproteinen in TG-Mäusen konnten bestätigen, dass eine Speziesbarriere geringer ausgeprägt ist, sobald die Prionproteine zweier Arten in kritischen Bereichen des Proteins sehr ähnlich sind (Schaf und Rind) (Scott *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 1993; Telling *et al.*, 1995). Der Phänotyp eines einzelnen Prionenstammes kann durch Unterschiede im Genotyp des Wirt-PrP beeinflusst werden. Die charakteristischen *in vivo* Merkmale und die biochemischen Eigenschaften des PrP^{Sc} können differenziert werden. Das Glykosylierungsmuster und die Größe des Proteinase K verdauten PrP^{Sc} stellt einen biochemischen Indikator der TSE-Stämme dar. So zeigt das Glykosylierungsprofil der Proteinase K behandelten humanen Gehirnhomogenate, dass die Fragmentgröße und das Verhältnis der drei Glykosylierungsformen (di-, mono- und unglykosyliert) der Stämme variieren (Abb. 11).

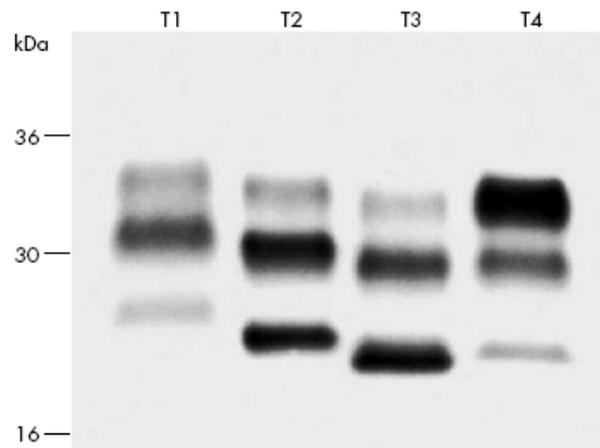


Abb. 11: Typisierung humaner Prionstämme. Western Blots von Hirnhomogenaten nach Proteinase K-Behandlung. Die Stämme unterscheiden sich in ihrer molekularen Masse und dem Verhältnis der Glykoformen. Proben T1-3 stammen von Patienten mit sporadischer oder iatrogener CJD, T4 von einem Patienten mit vCJD (entnommen aus Collinge, 2005).

Weitere Gesichtspunkte wie die Proteaseresistenz, die Sedimentierung, die Resistenz gegenüber Denaturierung durch chaotrope Reagenzien und die Bindungsaffinität zu Kupfer sind allgemeine Methoden bzw. Eigenschaften um Prionstämme zu unterscheiden (Morales *et al.*, 2007). Die wichtigsten Eigenschaften der Prionstämme *in vivo* sind die Inkubationszeit nach der Inokkulation, die klinischen Symptome, das Läsionsprofil im Gehirn und die Lokalisation von PrP^{Sc} in speziellen Gehirnbereichen (Bessen & Marsh 1992; Bruce 1993; Peretz *et al.*, 2002; Safar *et al.*, 1998) (Abb. 13).

EINLEITUNG

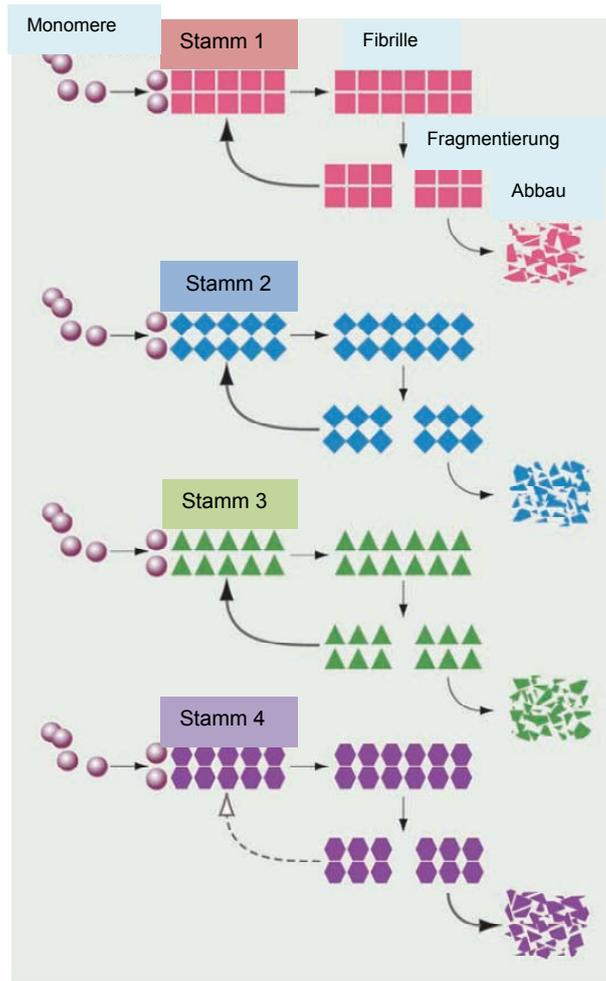


Abb. 12. Modell der Prionstamm-Generierung. Die Vermehrung von Prionen findet statt, indem PrP-Monomere an eine bereits vorhandene PrP-Polymer Matrize binden. Anschließend findet eine Spaltung statt um neue Matrizen zu generieren. Unterschiedliche PrP-Polymer Typen können sich vermehren, welche nachweislich unterschiedliche Prionstämme darstellen (entnommen aus Collinge *et al.*, 2007 und bearbeitet).

Mittels dieser Unterscheidungsmerkmale können beispielsweise die Maus-adaptierten Stämme ME7 und 79A differenziert werden, obwohl beide ähnliche Inkubationszeiten aufweisen (Fraser 1973). Prionstämme befallen vor allem das ZNS, weniger das Lymphsystem. Einige sogenannte lymphoide Stämme weisen zusätzlich eine hohe Prioninfektivität im Lymphsystem auf. Zu diesen Stämmen zählen vCJD, CWD und zahlreiche *Scrapie*-Stämme (Aguzzi & Sigurdson 2004).

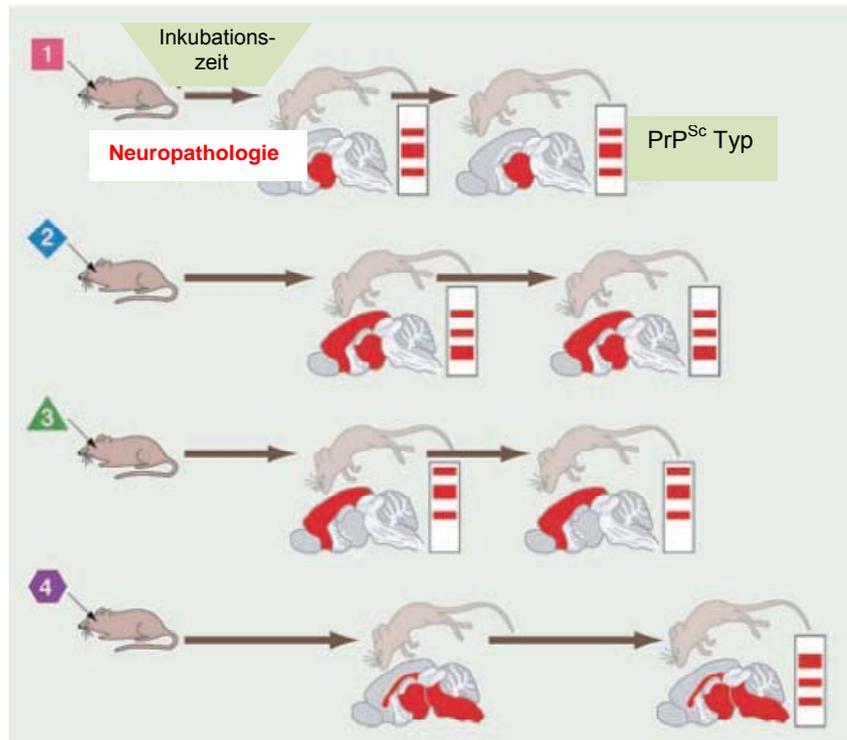


Abb. 13. Differenzierungsmöglichkeiten verschiedener Prionstämme. Prionstämme können mittels Inkubationszeiten (Länge der Pfeile) und durch neuropathologische Untersuchungen (rot markierte Gehirnareale) differenziert werden. Stammspezifische PrP^{Sc} Profile sind in schematischen Western Blot Diagrammen dargestellt. Sowohl biologische als auch biochemische Charakteristika der Prionstämme werden in folgenden Passagen im gleichen Wirt, welcher das gleiche PrP^C exprimiert, beibehalten (entnommen aus Collinge *et al.*, 2007 und bearbeitet).

Um das Phänomen der Prionstämme zu erforschen eignet sich das experimentelle Mausmodell (Abb. 13). Durch die Übertragung infektiösen Materials anderer Arten konnten bisher mehr als 20 Stämme isoliert werden (Bruce 1993). Viele dieser Stämme wurden durch Übertragungen aus unterschiedlichem Material von sCJD- und GSS-Patienten (Muramoto *et al.*, 1992; Manuelidis *et al.*, 1978), aus *Scrapie*-Material von Schafen und Ziegen und aus BSE-infizierten Kühen generiert (Lasmézas *et al.*, 1996; Lasmézas *et al.*, 1997; Bruce *et al.*, 2002).

Die Variationen von Prionstämmen zeigen sich durch die Isolierung verschiedener Prionstämme aus demselben Wirt, nach Übertragung von PrP^{Sc} einer einzigen Spezies. In diesem Experiment wurden von Bessen und Marsh zwei Stämme nach der Übertragung von TME in syrische Hamster identifiziert, welche aufgrund ihrer jeweiligen klinischen Symptome „aufgedreht“ (engl. *hyper*, HY) und „schläfrig“ (engl. *drowsy*, DY) genannt wurden. Die Pathogenese der Hamster wies Unterschiede

bezüglich der Inkubationszeit, klinischen Symptomen, Gehirnläsionen und der Endpunkttiter im Gehirn auf (Bessen & Marsh 1992; Bessen & Marsh 1994). Das PrP^{Sc} des DY-Stammes zeigte eine Veränderung in der elektrophoretischen Auftrennung nach Proteinase K-Verdau. Des Weiteren ist es sensitiver gegenüber des PK-Verdau als HY-Prionen. Dies ist einer der deutlichsten Hinweise, dass verschiedene Stämme unterschiedliche PrP^{Sc} Konformere produzieren können (Prusiner 1991). Strukturelle Unterschiede zwischen beiden hamster-adaptierten TME-Stämmen, die durch das Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer (*Fourier transform infrared spectroscopy*, FTIR) identifiziert wurden, untermauern diese Hypothese (Caughey *et al.*, 1998). Mittels einer zellunabhängigen Konversion (*cell-free conversion*) fand man Hinweise, dass sich die beiden Stamm-assoziierten Hamster PrP^{Sc} Konformere mit demselben Hamster-PrP^C durch direkte PrP^C-PrP^{Sc} Interaktionen *in vitro* und *in vivo* weitervermehren können (Bessen *et al.*, 1995). Der Zusammenhang zwischen BSE in Kühen und vCJD in Menschen wurde durch solche Analysemethoden festgestellt (Parchi *et al.*, 1997). Zusätzlich stützen Studien in Hefen die Feststellungen, dass Stammspezifität mit der Änderung von Proteinkonformationen in Zusammenhang steht (Tanaka *et al.*, 2004; King 2004). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass eine Diversität der PrP^{Sc} Konformere existiert und dass die Selbstvermehrung des PrP^{Sc} eine Rolle in der Variation der TSE-Stämme spielt.

2.1.9 Rolle von PrP in Prionerkrankungen

Obwohl PrP^C insbesondere in Neuronen in synaptischen oder präsynaptischen Bereichen konzentriert ist, kann es auch in den meisten anderen, nicht-neuronalen Geweben und in Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden (Kretzschmar *et al.*, 1986; Fournier *et al.*, 1995; Herms *et al.*, 1999; Ford *et al.*, 2002; Dodelet & Cashman, 1998). Die exakte physiologische Funktion von PrP ist bislang weitgehend unbekannt.

PrP-defiziente Mäuse (Prnp^{0/0})

Aufgrund der evolutionären Konservierung des Prionproteins (2.1.5) versprach man sich durch die Generierung von PrP-defizienten Mäusen Hinweise auf die Funktion des Prionproteins. PrP-*Knockout* Mäuse, die das zelluläre Prionprotein nicht

exprimieren, zeigen keine phänotypischen Anomalitäten, sind resistent gegenüber Prioninfektionen und können Prionen nicht replizieren (Bueler *et al.*, 1992). Es konnten lediglich geringe Abweichungen der synaptischen Übertragung nach repetitiver Stimulation (Collinge *et al.*, 1994) und Unterschiede im zirkadianen Schlaf-Wach-Rhythmus (Tobler *et al.*, 1996) nachgewiesen werden. Vermutlich ist die verminderte Leitfähigkeit kalziumabhängiger Kaliumkanäle die Ursache dieser Symptome (Colling *et al.*, 1996). Weitere Studien von Lobao-Soares und Mitarbeitern konnten ein leicht erhöhtes Angstverhalten und eine minimal verringerte Mobilität bei PrP-*Knockout* Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen feststellen (Lobao-Soares *et al.*, 2007; 2008). Im konditionierten Mausmodell, in welchem die PrP Expression postnatal in den Mäusen ausgeschaltet werden kann, um mögliche Kompensationsmechanismen im Embryonalstadium auszuschließen, verhielten sich die adulten Mäuse normal. Phänotypisch konnte nur eine Verringerung der Nachhyperpolarisationsströme in Zellen des Hippocampus gefunden werden, was auf eine potentielle Funktion von PrP in der Regulation von Signalübertragungen in Neuronen hinweisen könnte (Mallucci *et al.*, 2002).

Neuroprotektivität des Prionproteins

Da PrP^{0/0} Mäuse unter normalen Bedingungen keine deutlichen Symptomatiken aufwiesen, wurden die Mäuse unter Stress gesetzt. Nach ischämischen Gehirnschädigungen ist eine erhöhte Menge an PrP^C detektierbar, die geschädigten Gehirnareale sind größer und das Infarktrisiko ist in PrP-defizienten Mäusen drastisch erhöht (McLennan *et al.*, 2004; Weise *et al.*, 2004; Spudich *et al.*, 2005). Durch eine Überexpression von PrP konnte die Infarktausbreitung reduziert werden (Shyu *et al.*, 2005). Da Neuronen der PrP^{0/0} Mäuse eine gesteigerte Sensitivität gegenüber oxidativen Stress zeigten, ist es auch möglich, dass PrP antioxidativ wirken könnte (Brown *et al.*, 1997; Brown & Besinger, 1998; Dupiereux *et al.*, 2008). Diese Hinweise sprechen für eine neuroprotektive Funktion des PrP^C (Kuwahara *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2006b). Des Weiteren kann PrP^C gegen verschiedene proapoptotische Einflüsse schützen (Kuwahara *et al.*, 1999; Chiarini *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006a). Interessanterweise scheint sich die protektive Aktivität des PrP^C zu erhöhen, sobald PrP^{Sc} Isomere vorhanden sind (Rambold *et al.*, 2008).

Interaktionspartner des Prionproteins

Um weitere Einblicke in mögliche PrP^C Funktionen zu erhalten, wurden in zahlreichen Studien Interaktionspartner des Prionproteins gesucht (zusammenfassende Tabellen in Fasano *et al.*, 2006 und Westergard *et al.*, 2007). Einige dieser Bindungspartner sind in die Signaltransduktion der Zelle involviert (Mouillet-Richard *et al.*, 2000). Rezeptoren für Signaltransduktionskaskaden befinden sich überwiegend in speziellen cholesterol- und sphingolipidreichen Membranregionen, die Caveolae oder *Rafts* genannt werden (Schroeder *et al.*, 1998). Diese Membranbereiche sind kleine (10-200 nm) heterogene, dynamische Domänen, welche teilweise stabilisierend durch Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen stabilisierend wirken (Pike, 2006; Taylor & Hooper, 2006). *Rafts* spielen eine Rolle bei der Invasion von Pathogenen, der Regulation von Protein- und Lipidverteilung und den zellulären Signalwegen (Brown & London, 1998; Van der Goot & Harder, 2001; Schuck & Simons 2004; Pelkmans, 2005; Murphy *et al.*, 2006). Da das Prionprotein, wie auch andere GPI-verankerte Proteine, in *Rafts* lokalisiert sind (Taraboulos *et al.*, 1995; Vey *et al.*, 1996) und diese GPI-verankerten Proteine wichtige Funktionen bei der Signaltransduktion übernehmen, ist eine Rolle des PrP^C in der Signalübertragung wahrscheinlich. Einige Experimente bringen PrP^C in Zusammenhang mit der Fyn-Tyrosin-Kinase. Mouillet-Richard *et al.* zeigten, dass durch die Quervernetzung von PrP^C über Antikörper eine Dephosphorylierung und Aktivierung der Fyn-Kinase in differenzierten neuronalen Zellen der Maus ausgelöst wird. Diese Reaktion wies eine Abhängigkeit von Caveolin-1 auf, welches ebenfalls in *Rafts* und Caveolae lokalisiert ist (Mouillet-Richard *et al.*, 2000). Zudem ist Caveolin-1 als PrP-Interaktionspartner bekannt (Harmey *et al.*, 1995). Des Weiteren konnte eine Interaktion von PrP^C mit Grb2 und Synapsin Ib, welche an der Internalisierung und Signalübertragung beteiligt sind, nachgewiesen werden (Spielhauer & Schätzl, 2001). Eine neuroprotektive Funktion übt PrP^C durch die Veränderung des Glutamaterezeptor NMDA (N-methyl-D-Aspartat) aus (Villmann & Becker, 2007). Dies konnte durch die Verwendung von NMDA-Inhibitoren bestätigt werden (Rangel *et al.*, 2007). Das *stress-inducible protein 1* (STI1) konnte ebenfalls als PrP^C-Interaktionspartner in Zusammenhang mit Neuroprotektion identifiziert werden. Da STI1 verschiedene Chaperone der Hitzeschockproteine (*heat shock protein*, HSP) Familie 70 und 90 komplexieren kann, wurde vermutet, dass es bei der Konversion

von PrP^C beteiligt sein könnte (Blatch *et al.*, 1997; Lassle *et al.*, 1997). Ein weiteres Chaperon der HSP Familie, HSP 60, konnte bereits als essentielles Prion-Chaperon identifiziert werden (Edenhofer *et al.*, 1996). Interessanterweise bindet das Prionprotein im ER an weitere ER-Chaperone (Sarnataro *et al.*, 2004). Dies könnte ein Hinweis für die Beteiligung an der Faltung von PrP^C oder der Erkennung von fehlgefalteten Formen sein. Zu den Proteinen, welche an der Zelloberfläche mit PrP interagieren, gehören NCAM (neural cell-adhesion molecule; Schmitt-Ulms *et al.*, 2001), der Lamininrezeptor Präkursor (Rieger *et al.*, 1997; Gauczynski *et al.*, 2001; Leucht *et al.*, 2003), Glykosaminoglykane (Priola & Caughey, 1994), Glypican-1 (Hooper NM, 2011) und der LRP1-Rezeptor (Taylor & Hooper, 2007; Parkyn *et al.*, 2008). Weitere potentielle Bindungspartner von PrP sind das antiapoptotische Protein Bcl-2 (Kürschner & Morgan, 1996) und GFAP (glial fibrillary acidic protein; Oesch *et al.*, 1990), deren physiologische Relevanz in Zukunft noch untersucht werden muss.

2.2 Typen & Mechanismen der Endozytose

Die Aufnahme des GPI-verankerten Prionproteins (2.1.5) in die Zelle stellt einen essentiellen Schritt in der Biogenese des Prionproteins dar. Durch die Aufklärung der Aufnahme bzw. den weiteren Transports des Prionproteins in der Zelle könnten mögliche potentielle Kofaktoren, die essentiell für die Umfaltung von PrP^C in die fehlgefaltete Isoform sind, in Vesikeln des Endozytoseweges identifiziert werden. Die Verteilung der *Rafts* variiert innerhalb der unterschiedlichen Zelltypen. In Neuronen und polarisierten Epithelzellen findet man *Rafts* besonders an der apikalen und axonalen Plasmamembran, dagegen sind *Rafts* in Fibroblasten und Lymphozyten über die gesamte Zelloberfläche verteilt. Neben der Funktion der *Rafts*, Proteine in Richtung des Trans-Golgi Apparats zu sortieren, insbesondere in polarisierten Epithelzellen und Neuronen, sind *Rafts* auch für die eigentliche Endozytose notwendig (Brown *et al.*, 1998; Benting *et al.*, 1999; Mukherjee *et al.*, 1999). Kleine Moleküle wie Glukose oder Aminosäuren können die Plasmamembran über Membrankanäle oder Pumpen passieren. Größere Partikel oder Flüssigkeiten werden durch Membraneinstülpungen aufgenommen und in membrangebundenen Vesikeln in das Zellinnere transportiert. Der jeweilige Endozytoseweg hängt von den

zu transportierenden Proteinen und deren Zielmembranen ab. Es können zwei endozytische Prozesse unterschieden werden: Phagozytose und Pinozytose (Abb. 14).

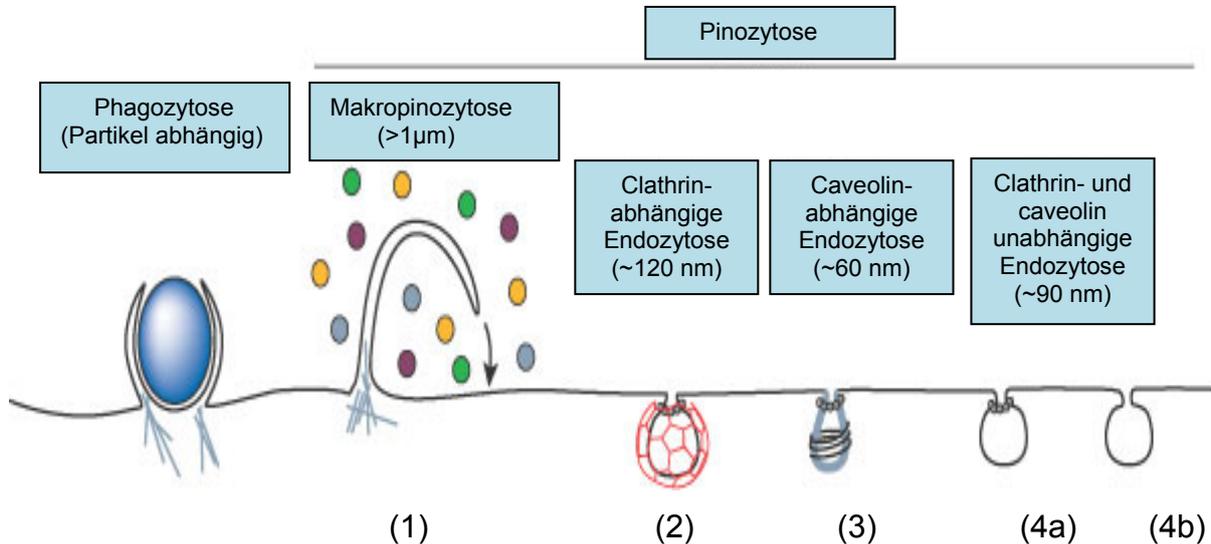


Abb. 14: Mechanismen der Endozytose. Die Aktin-abhängige Aufnahme größerer Partikel durch spezialisierte Säugerzellen wird als Phagozytose bezeichnet. Die Pinozytose kann in vier Mechanismen unterteilt werden: 1) Makropinozytose, wobei Aktin-abhängige Auswüchse entstehen und mit der Plasmamembran verschmelzen, um große Volumen des extrazellulären Milieus mit aufzunehmen. 2) Clathrin-abhängige Endozytose, bei der grundlegend oder aufgrund bestimmter Stimuli rezeptorgebundene Liganden aufgenommen und innerhalb der Zelle verteilt werden. 3) Caveolae-abhängige Endozytose, die in Rafts stattfindet und bei der es zur Bildung von Vesikeln kommt, welche durch Caveolin-1 stabilisiert sind und Dynamin-abhängig abgelöst werden. 4a, b) Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose, die entweder dynamin-abhängig (4a) oder dynamin-unabhängig (b) erfolgt (Abbildung entnommen aus Conner & Schmid, 2003 und bearbeitet).

Werden Flüssigkeiten, gelöste Substanzen oder max. 150 nm große Vesikel aufgenommen, spricht man von Pinozytose. Diese Art der Aufnahme kommt in allen Zellarten vor und kann in vier Untergruppen unterteilt werden (Conner & Schmid, 2003):

1. Makropinozytose
2. Clathrin-vermittelte Endozytose (CME)
3. Caveolae-vermittelte Endozytose
4. Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose

Spezialisierte Säugerzellen nehmen größere Partikel mittels Phagozytose auf. Phagozytoserezeptoren erkennen Liganden auf Partikeln, aktivieren die Polymerisation und Umordnung von f-Aktin und koordinieren die Internalisierung.

2.2.1 Rezeptor-vermittelte Endozytose

Zur Aufnahme extrazellulärer Makromoleküle besitzen Zellen verschiedene Mechanismen der Endozytose. Moleküle, beispielsweise Rezeptor-Ligand-Komplexe, die nicht über Ionenkanäle oder Diffusion in das Zellinnere gelangen können, werden mittels der Endozytose aufgenommen. Zu solchen Liganden gehören Transportproteine des Plasmas, wie z.B. die Low-Density-Lipoproteine (LDL) (Anderson *et al.*, 1982), Transferrin, sowie lysosomale Enzyme (Bonifacino & Lippincott-Schwartz, 2003). Auch Viren und Toxine gelangen über die rezeptor-vermittelte Endozytose in das Zellinnere. Die Bindung der Liganden erfolgt in spezialisierten Bereichen der Zellmembran, den sogenannten *coated-pits*. *Coated-pits* sind ca. 150 nm große Einstülpungen der Zellmembran (Willingham *et al.*, 1981) (Abb. 15). Anderson *et al.* zeigten, dass in humanen Fibroblasten ca. 2% der Zelloberfläche aus *coated-pits* (Anderson *et al.*, 1977) bestehen. Ein Bestandteil der *coated-pits* ist u.a. das sogenannte Clathrin, welches eine Dreibein-ähnliche Struktur ausbildet. Diese setzt sich aus drei leichten Ketten (35 kD) und drei schweren Ketten (180kD) zusammen. Die Bindung des Clathrins an *coated-pits* der Plasmamembran wird durch das Adaptorprotein 2 (AP2) vermittelt (Ahle *et al.*, 1988).

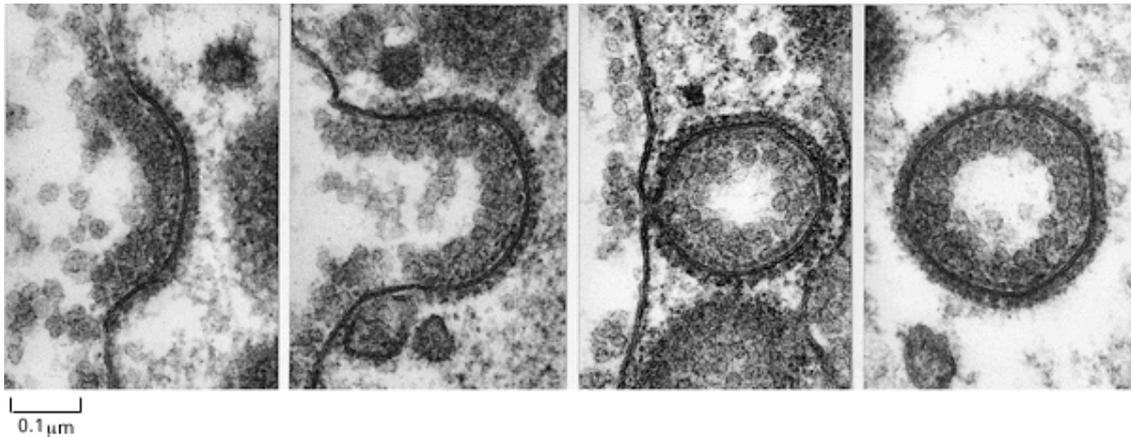


Abb. 15: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Clathrin-Vesikels, das sich an der Plasmamembran bildet. Sehr dichtes Material ist an den Rezeptoren gebunden, mit deren Hilfe es durch die Plasmamembran in die Zelle transportiert werden soll. Die Clathrin-Proteine formen ein Vesikel im Cytosol (aus www.zoology.ubc.ca/.../proteinprocessingoh.htm).

Das erhöhte Vorkommen vieler Rezeptoren in den *coated-pits* ergibt sich offenbar aus Reaktionen zwischen den Internalisierungssignalen der Rezeptoren und den Adaptorproteinen (Kirchhausen, 1993). Jing *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass eine tyrosinhaltige Tetrapeptidsequenz (YXRF) des Transferrin-Rezeptors für die Konzentration in den *coated-pits* erforderlich ist (Jing *et al.*, 1990). Die Abschnürung der *coated-pits* ist ein ATP-abhängiger Prozess. So konnten Schmid *et al.* in ATP-depletierten Zellen zwar eine Invagination, jedoch keine Abschnürung (*budding*) der *coated-pits* beobachten (Schmid & Carter, 1990). Neben ATP spielen Calcium und die GTPase Dynamamin eine Rolle. Dynamamin legt sich um den unteren Teil der eingestülpten Plasmamembran (Takei *et al.*, 1995) und ermöglicht so das Abschnüren eines clathrinumhüllten Vesikels (*clathrin-coated vesicle*) (Hinshaw & Schmid 1995). Die Rolle des Dynamamins konnte mit K44A-Mutanten bestätigt werden, welche einen Defekt in der GTP-Bindung und Hydrolyse aufwiesen. Eine Überexpression des K44A-Dynamamins führte zu einer Inhibierung der Clathrin-abhängigen und Caveolae-abhängigen Endozytose. Neben zytosolischen Faktoren scheint auch das Zytoskelett an der Bildung der *coated vesicles* beteiligt zu sein. Die Ausschaltung einzelner Proteine dieses Systems verhindert die Endozytose unterschiedlicher Moleküle (Byers & Branton 1985; Urrutia *et al.*, 1997).

2.2.2 Caveolae

Caveolae konnten erstmalig 1955 in Endothelzellen detektiert werden (Yamada, 1955). Die Einstülpungen der Plasmamembran von ca. 50-150 nm zeichnen sich durch das Protein Caveolin-1 aus, welches an Cholesterol bindet. Caveolae sind dicht gepackte, cholesterol- und glycosphingolipidreiche Abschnitte der Membran, die oft nur einige hundert Nanometer in das Zellinnere hineinreichen. Sie stellen eine Untergruppe der *Rafts* dar (Rothberg *et al.*, 1992; Taylor & Hooper, 2006), da diese ebenfalls ungewöhnlich resistent gegenüber einer Extraktion mittels Detergenzien sind. Die Expression von Caveolin-1 induziert die Bildung caveolae-artiger Strukturen (Abb. 16) und ist für die Biogenese der Caveolae ausschlaggebend (Fujimoto *et al.*, 2000). Daher weisen beispielsweise *Caveolin-Knockout* Mäuse keinerlei Caveolae auf (Drab *et al.*, 2001). Ebenso wie der Abschnürungsvorgang der *clathrin-coated pits* ist auch die Knospung der Caveolae von der GTPase Dynamamin abhängig (Abb. 14) (Henley *et al.*, 1998).

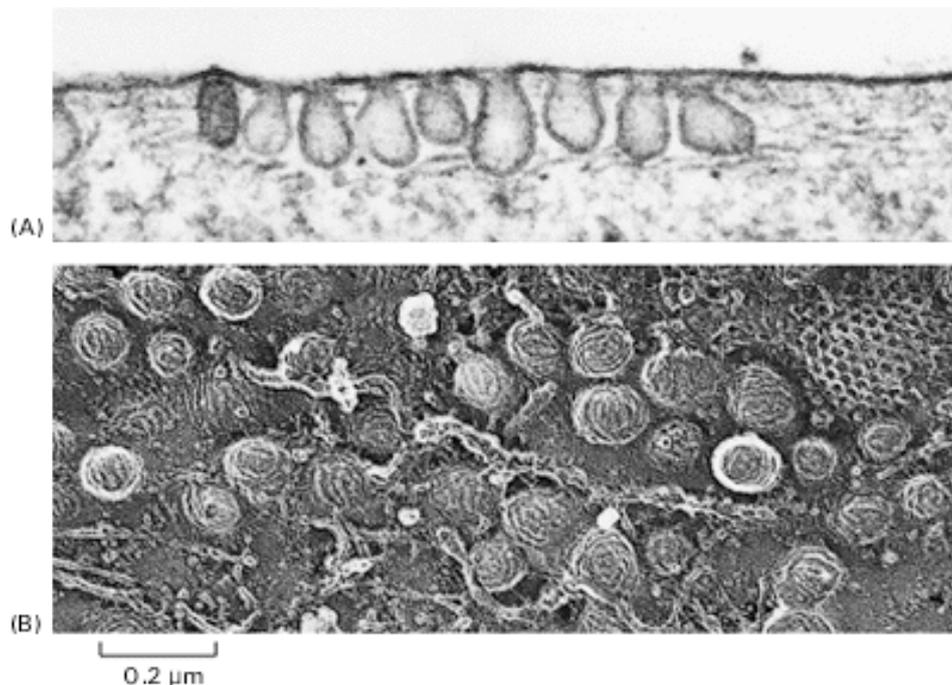


Abb. 16: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Caveolin auf Caveolae. A) Caveolaebildung an der Plasmamembran vor der Abschnürung der Vesikel. B) Caveolae sind kleiner als *clathrin-coated pits* und machen mehr als 10 % der Membranoberfläche von Endothelzellen aus. Die spiralförmige Struktur der Caveolae entsteht durch Zusammenlagerung des Membranproteins Caveolin. (entnommen aus Alberts *et al.*, Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, N.Y. 1989).

Aoki *et al.* zeigten, dass es in Endothelzellen, welche aus den Lymphknoten der Maus stammten, zu einer Kollokalisierung von internalisierten Caveolae mit Markern des frühen endosomalen Systems, Rab4, Rab5 und Rab11 kommt (Aoki *et al.*, 2007). Nach der Endozytose werden Caveolin-positive Vesikel von der Plasmamembran zum Golgi-Apparat transportiert. Möglicherweise stehen die morphologisch an ein glattes endoplasmatisches Retikulum erinnernden Caveolae mit Zisternen des Golgi-Apparates in Verbindung. Es wird vermutet, dass Caveolae auch beim Transport zwischen dem Golgi-Apparat und dem ER eine Rolle spielen. Caveolae werden mehrere Funktionen nachgesagt, u.a. bei der Regulation von Signalkaskaden, der Cholesterolhomöostase, sowie der Internalisierung von Membranbestandteilen, bakteriellen Toxinen, extrazellulären Liganden und unterschiedlichen Viren (Anderson, 1998; Thomas & Smart, 2008; Parton, 1996; Pelkmans & Helenius, 2002). Insbesondere wurde diese Art der Endozytose für GPI-verankerte Proteine und das Choleratoxin (CTxB) postuliert (Simons & Ikonen, 1997). Die Endozytose des Choleratoxins über Caveolae benötigt mehr Zeit (10-20 h) als die Clathrin-vermittelte Endozytose, so beispielsweise das Transferrin. Es kann bereits nach 15 min internalisiert werden. Caveolae sind nicht in allen Zelltypen vorhanden, wie z.B. den Lymphozyten oder neuronalen N2a Zellen der Maus. In diesen Zellen kann jedoch trotzdem eine Endozytose über Rafts stattfinden. Diese Tatsache führte zu der Erkenntnis, dass Zellen mehrere Möglichkeiten der Endozytose haben, um Proteine zu internalisieren und zu modifizieren. Hierbei spielen sicherlich auch die caveolin- und clathrin-unabhängigen Endozytosewege, welche kein Dynamin zur Abschnürung benötigen, eine Rolle (Abb. 14: 4a, b).

2.2.3 Intrazelluläre Transportwege endozytierter Substanzen

Im Zellinneren entfernt ein ATP-abhängiges Enzym (*uncoating enzyme*) die Clathrinhülle der Vesikel (Rothman & Schmid 1986) und die Moleküle werden je nach deren Funktionen den möglichen Transportwegen zugeführt. Dieser Schritt ist bei der Caveolae-vermittelten Endozytose nicht notwendig. Caveolae können direkt abgeschnürt und in das Zellinnere abgegeben werden. Einige Liganden bleiben mit ihren Rezeptoren assoziiert und werden wieder zur Zelloberfläche zurücktransportiert

(Recycling), wie im Falle des Transferrins (Dautry-Varsat *et al.*, 1983). Dagegen trennt sich z.B. der LDL-Rezeptor von seinem Liganden und wird wieder zur Zelloberfläche transportiert. Der Ligand wird über unterschiedliche endosomale Kompartimente zu den Lysosomen transportiert und dort enzymatisch abgebaut. Endosomale Kompartimente lassen sich in frühe (EE) und späte Endosomen (LE) unterteilen (Abb. 17). Frühe Endosomen können Bestandteil des *Sorting*- und des Recycling-Kompartiments sein. Diese Art der Endosomen lassen sich zudem aufgrund ihres pH-Wertes voneinander unterscheiden. In CHO Zellen (*chinese hamster ovary*) besitzen *Sorting*-Endosomen einen pH-Wert von 5,9-6,0, während der pH-Wert der Recycling-Endosomen (RE) bei 6,4- 6,5 liegt (Presley *et al.*, 1993).

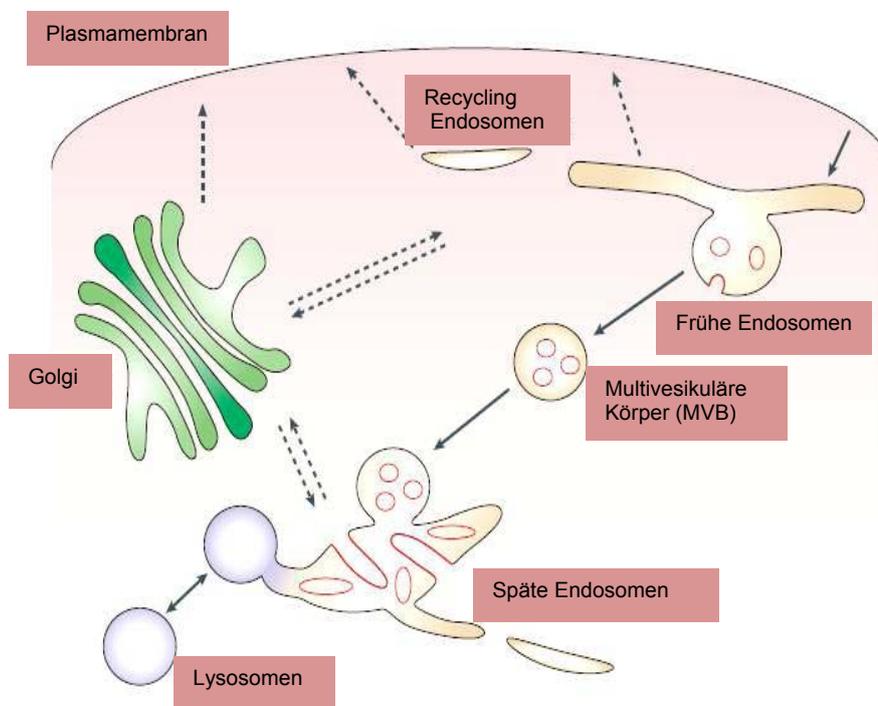


Abb. 17: Endosomales Kompartiment. Die Internalisierungsprozesse über frühe Endosomen bestehend aus *Sorting*-Endosomen und dem endozytischem Recycling Kompartiment (ERC), ebenso wie die unterschiedlichen Etappen des Abbauweges hin zu den Lysosomen werden aufgezeigt (durchgezogenen Pfeile). Das aufgenommene Material wird über multivesikuläre Körper (MVB) weiter zu den späten Endosomen bis hin zu den Lysosomen transportiert, wo sie verdaut werden. Ein Recycling zurück zur Zellmembran kann zum einen indirekt über Recycling-Endosomen oder zum anderen direkt von den frühen Endosomen zurück zur Zellmembran stattfinden. Diese Transportwege verbinden ebenfalls den Golgi-Apparat mit dem endosomalen System und der Plasmamembran (unterbrochene Pfeile) (entommen aus Gruenberg & Stenmark, 2004 und bearbeitet).

Späte Endosomen gewährleisten den Abbau von Molekülen. Deren Oberfläche weisen Einstülpungen der Membran auf, was ihnen eine multivesikuläre Struktur verleiht (Van Deurs *et al.*, 1993). Aus diesem Grund werden späte Endosomen auch als multivesikuläre Körper (*multivesicular bodies*, MVBs) bezeichnet. In CHO Zellen liegt deren pH-Wert unter 6,0 (Yamashiro & Maxfield, 1987). Der weitere Abbau findet in Lysosomen statt, welche saure (pH-Wert 5,0- 5,5) und hydrolasereiche Partikel darstellen. Charakteristische Markerproteine von Lysosomen sind Lysosomen-assoziierte Membranproteine (LAMPs).

Neben dem lysosomalen Abbau können Proteine in einem Recyclingprozess zurück zur Zelloberfläche transportiert werden. Während des schnellen Recyclings werden Proteine direkt von den EEs zur Plasmamembran zurückgeschickt (Hao & Maxfield, 2000). Dagegen ist der Rücktransport über die RE wesentlich langsamer (Mayor *et al.*, 1993). REs beinhalten tubuläre Membranstrukturen, die wahrscheinlich mit Mikrotubuli in Verbindung stehen (Hopkins, 1983). Sie sind an einigen weiteren Transportwegen beteiligt, beispielsweise werden transmembrane Transportproteine wie TGN38 oder das Shigatoxin (Mallard *et al.*, 1998; Gosh *et al.*, 1998) von REs zum TGN transportiert. Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass REs ein wichtiger Bestandteil der zellulären Verteilung und Entsorgung in polarisierten Epithelzellen und dem sekretorischen Transport einiger Proteinen zur Plasmamembran sind (Ang *et al.*, 2004; Perret *et al.*, 2005). Dies zeigt sich z.B. im Fall des basolateralen Transports des Zelladhäsionsmoleküls E-cadherin, welches über Rab11-regulierte REs vom TGN zur Plasmamembran geleitet wird (Lock & Stow, 2005).

2.3 Rabproteine

Die Regulation zellulärer Prozesse, wie z.B. im Falle des E-cadherins, wird u.a. durch kleine GTP-bindende Proteine ermöglicht (Lock & Stow, 2005). Gemeinsam mit vier weiteren Gruppen gehören die kleinen GTP bindenden Proteine zu den G-Nukleotid bindenden Proteinen, die regulatorische Funktionen ausüben. Über 100 verschiedene dieser 20-40 kDa großen Proteine wurden bisher identifiziert (Matozaki *et al.*, 2000; Takai *et al.*, 2001).

Der Transport zwischen bestimmten Zellorganellen ist streng reguliert. Um die Integrität der Zellorganellen im Vesikeltransport aufrecht zu erhalten, benötigt jede

Zelle ein System, das Transportvesikel steuert. Hierbei spielen Rab-GTPasen (*Ras-related in brain*) eine große Rolle, da sie u.a. die Interaktion von Membranbestandteilen verschiedener Kompartimente steuern (Touchot *et al.*, 1987).

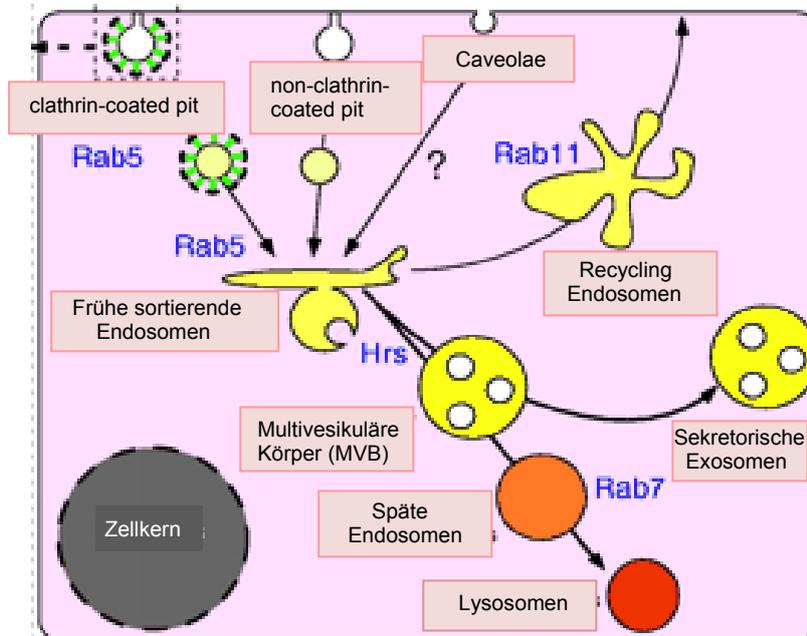


Abb. 18: Endosomen-Sortierung. Die grundlegenden Endozytosemechanismen können clathrin-vermittelt oder clathrin-unabhängig sein (Chen & De Camilli, 2005; Sigismund *et al.*, 2005). Nach der Internalisierung der *clathrin-coated pits* wird die Clathrinhülle entfernt und recycled, wobei der Weitertransport Rab5-vermittelt ist. Die clathrin-unabhängigen Vesikel fusionieren mit dem frühen endosomalen Kompartiment (Maxfield & McGraw, 2004). Viele endozytierte Liganden werden in späten, Rab7 positiven, Endosomen oder in Lysosomen abgebaut. MVB (*Multivesicular bodies*) stellen intermediäre Organelle zwischen *Sorting-* und späten Endosomen dar (entnommen aus Le Borgne *et al.*, 2005 und bearbeitet).

Mit über 50 Vertretern in Säugetieren ist die Rab-Familie die größte Gruppe kleiner GTPasen (Novick & Zerial, 1997, Olkkonen & Stenmark, 1997). Neben essentiellen Transportprozessen, wie Endozytose, Exozytose und dem Recycling zwischen verschiedenen Membrankompartimenten (Abb. 18), sind Rabproteine ebenfalls bei der Prozessierung von Phagosomen beteiligt.

2.3.1 Lokalisierung und Regulierung der Rabproteine

Innerhalb des Cytosols sind die Rabproteine in spezifischen intrazellulären Membranen lokalisiert. Aufgrund des hypervariablen carboxyterminalen

Cysteinmotivs der Rabproteine kann die korrekte Lokalisierung an spezifischen Zielmembranen gewährleistet werden (Chavrier *et al.* 1991). Durch posttranslationale Lipidmodifizierung (Geranylgeranyl-Gruppen) erhält diese Region einen hydrophoben Charakter. Dadurch ermöglichen Rabproteine, neben einer reversiblen Bindung an Plasma- und Vesikelmembranen, auch die Assoziation zusätzlicher Regulatorproteine wie GDIs (Ullrich *et al.*, 1993). Verschiedene Gruppen der Rab-spezifischen Regulatorproteine koordinieren diese Vorgänge (Abb. 19). Das Rab-Begleiter Protein (*Rab escort protein*, REP) präsentiert das Rabprotein der Geranylgeranyl-Transferase. REP übernimmt die Funktion eines Chaperons, indem es das hydrophobe geranylgeranyl-gebundene Rabprotein in einem löslichen Zustand hält und so zur vorgesehenen Zielmembran transportiert (Alexandrov *et al.*, 1994). Der Transport wird begleitet vom Austausch von GDP mit GTP, welcher durch den G-Nukleotid-Austauschfaktor (*GDP/GTP exchange factor*, GEF) katalysiert wird. Mit der GTP-Hydrolyse spaltet sich das Rabprotein von der Membran ab, wobei das GTPase aktivierendes Protein (*GTPase-activating protein*, GAP) als Katalysator wirkt. Dieser Vorgang wird von dem G-Nukleotid-Dissoziationsinhibitoren (*GDP-dissociation inhibitor*, GDI) vermittelt, der das GDP-gebundene Rabprotein an den intrazellulären Membranen binden kann. GDI weist daher Ähnlichkeit mit REP auf, da beide geranylgeranylierte GDP-gebundene Rabproteine spezifischen Membranen präsentieren können (Ullrich *et al.*, 1993; 1994). Da GDI in der Zelle zahlreicher vorhanden ist als REP, dient er als Recyclingfaktor, wodurch mehrere Zyklen von Membranassoziiierung und Abspaltung der Rabproteine möglich sind.

kontrollieren (Echard *et al.*, 1998; White *et al.*, 1999). Rab-GTPasen garantieren einen effizienten Membrantransport entlang der endozytotischen Route (Oikkonen & Stenmark 1997; Novick & Zerial 1997; Pfeffer 1999). Internalisierte Komplexe werden zu frühen Endosomen transportiert. Diese EEs entscheiden über die Degradierung sowie über das Recycling der Moleküle. Die Moleküle können direkt zurück zur Plasmamembran oder indirekt via perinuklären Recycling-Kompartiment (RC) transportiert werden (Ghosh & Maxfield 1995).

Rab4, 5 und 11 sind in EEs lokalisiert und haben unterschiedliche Funktionen. Rab4 reguliert das Recycling, ausgehend von den EEs zum RC, oder direkt zur Plasmamembran (van der Sluijs *et al.*, 1991). Daher stellt es ein wichtiges Protein dar, das die frühen Phasen der Proteinverteilung während der Endozytose steuert (Zerial & McBride, 2001). Es gibt Hinweise darauf, dass Rab5 den Transport zum EE-Kompartiment reguliert und zudem bei der Abschnürung der Vesikel von der Plasmamembran eine Rolle spielt. Rab5 reguliert sowohl die Fusion primärer *clathrin-coated* Vesikel mit bereits vorhandenen EEs, als auch die homotypische Fusion der frühen Endosomen (Zerial & McBride, 2001). Rab5 Effektorproteine sind beispielsweise EEA1 (*early endosomal antigen 1*) und Kinesin KIF16B (*kinesin superfamily 16B*) (Hoepfner *et al.*, 2005). Obwohl beide Rabproteine im endosomalen Kompartiment lokalisiert sind, scheinen sie eigenständige Aufgaben zu haben. Da eine erhöhte Expression von Rab5 zu einer verstärkten Fluidität der Plasmamembran und Rezeptor-vermittelten Endozytose führt, vermutet man, dass Rab5 den Prozess der Clathrin-vermittelten Endozytose und den Transport in die EEs reguliert (Gorvel *et al.*, 1991; Stenmark *et al.*, 1994). Eine Rab4 Überexpression dagegen zeigt eine verringerte Fluidität und eine Anhäufung des Endozytosemarkers Transferrin (TfR) an der Oberfläche. Rab11 reguliert den Vesikeltransport zwischen TGN und REs und kontrolliert das endosomale Recycling von internalisierten Transportproteinen und Rezeptoren, sowie die Phagozytose und die Translokation sekretorischer Vesikel (Urbe *et al.*, 1993; Ullrich *et al.*, 1996; Cox *et al.*, 2000; de Graaf *et al.*, 2004). Des Weiteren ist Rab11 im Recyclingprozess von TfR (Ren *et al.*, 1998) und AMPA (a-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid)-Glutamat Rezeptoren involviert. Im späten endosomalen Kompartiment konnten Rab7 und Rab9 als Regulatoren identifiziert werden (Zerial & McBride, 2001; Miaczynska & Zerial, 2002). Rab7 ist verantwortlich für den Transport von EEs über LEs zu Lysosomen und Rab9

kontrolliert den Weg zwischen LE und dem TGN von MPRs (Mannose6-Phosphat-Rezeptoren). Offensichtlich stehen Rabproteine in einem ständigen dynamischen Austausch zwischen den verschiedenen Formen von Endosomen und den einzelnen Membranregionen (Miaczynska & Zerial, 2002). Dies könnte die Basis für die Entstehung und Spezialisierung der Endosomen darstellen.

2.4 Synthese und Endozytose des Prionproteins PrP^C

Es ist bekannt, dass das Prionprotein über den sekretorischen Rabprotein-vermittelten Transportweg vom ER über den Golgi-Apparat und weiteren Vesikeln zur Zellmembran transportiert wird. Es ist mit dem GPI-Anker in cholesterol- und glykosphingolipidreichen *Lipid Rafts* lokalisiert (Caughey & Raymond, 1991; Borchelt *et al.*, 1992; Madore *et al.*, 1999). PrP^C kann des Weiteren zurück an die Plasmamembran transportiert werden (Parkin *et al.*, 2004; Heiseke *et al.*, 2008). Dieser Prozess wird von Exosomen vermittelt (Fevrier *et al.*, 2004; Vella *et al.*, 2007). Es konnte zudem gezeigt werden, dass PrP^C im ER in drei Konformationen synthetisiert werden kann. Neben der sekretierten Form, kann PrP^C die COOH- und NH₂-terminalen Transmembranformen (^{Ctm}PrP, ^{Ntm}PrP) annehmen. Der Großteil der GPI-verankerten Form wird von der sekretierten Form abgeleitet, die komplett ins ER transportiert wird (Hegde *et al.*, 1998). Eine physiologische Rolle der transmembranen Formen des PrP^C ist nicht bekannt. Dennoch konnten bei transgenen Mäusen, welche das ^{Ctm}PrP exprimieren, neuronaler Zelltod und neurologische Erkrankungen nachgewiesen werden, welche der Pathogenese von Prionenerkrankungen ähneln (Stewart *et al.*, 2005). Da ^{Ctm}PrP in diesen Mäusen im Golgi-Apparat akkumuliert, könnte eine mögliche Golgi-Fehlfunktion die neuropathologischen Symptome der Mäuse erklären (Stewart & Harris, 2005). Der GPI-Anker wird nach dem Abspalten des C-terminalen Signalpeptids im endoplasmatischen Retikulum am Serin 231 (Nummerierung des Maus-PrP) platziert. Durch den Abbau von Cholesterol in der Zellmembran konnte gezeigt werden, dass eine *Raft*-Assoziation für eine korrekte Faltung des PrP^C unerlässlich ist (Sarnataro *et al.*, 2004). Dies gilt ebenso für den Export des Proteins zum Golgi-Apparat und für eine exakte Glykosylierung des Proteins (Sarnataro *et al.*, 2004; Campana *et al.*, 2005). Das Glykosylierungsmuster des PrP^C scheint den Proteintransport und die biophysikalischen Eigenschaften zu beeinflussen. In Neuronen aus Mäusen, welche

unglykosyliertes PrP^C exprimieren, konnte eine veränderte Lokalisierung des Proteins und eine Akkumulierung im Golgi-Apparat des Proteins gezeigt werden (Cancellotti *et al.*, 2005; Wiseman *et al.*, 2005). Interessanterweise konnte kein offenkundiger Phänotyp, neurologische Symptome oder Neurogeneration in diesen Mäusen beschrieben werden. Eine Anhäufung von unglykosylierten PrP^C im Golgi-Apparat muss daher nicht unbedingt schädlich sein.

Es werden zwei Wege der Internalisierung von PrP^C diskutiert. Zum einen ist die Aufnahme über CCPs (*clathrin-coated pits*) möglich, zum anderen ist die Internalisierung über *Rafts* oder über caveolae-ähnliche Domänen denkbar. Durch die Assoziierung von PrP^C an den *Rafts* wird dessen Verteilung kontrolliert, denn durch den Abbau von Cholesterol oder Sphingolipiden kommt es zu einer Umverteilung des PrP^C an der Oberfläche von Neuronen (Galvan *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PrP^C und PrP^{Sc} in *Rafts* lokalisiert sind, was eine Beteiligung von *clathrin-coated* Vesikeln an der PrP^C Internalisierung eigentlich nicht wahrscheinlich macht (Vey *et al.*, 1996; Kaneko *et al.*, 1997). In Neuroblastomazellen konnte PrP^C mit GM1, einem typischen Membranmarker der *Rafts*, koimmunopräzipitiert werden (Mattei *et al.*, 2002). Doch wird sowohl die Beschaffenheit der PrP^C-haltigen *Rafts* als auch die Verteilung des PrP^C zwischen *Rafts* und „Nicht-Raft“ Regionen (*non-Raft*) kontrovers diskutiert. Aufgrund der Tatsache, dass GPI-verankerte Proteine einen *Lipid Raft* Internalisierungsmechanismus verwenden, obwohl ihnen eine Transmembrandomäne zur Interaktion mit Clathrinproteinen fehlt, wird die Rolle von clathrin- und nicht-clathrin-Vesikeln während der Internalisierung von PrP^C diskutiert (Kaneko *et al.*, 1997). Hinweise für die Internalisierung von PrP^C über nicht-clathrin-Vesikeln (*non-clathrin-coated pits*) wurden in nicht neuronalen Zellen und Gliazellen gezeigt (Marella *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2003). Trotz der GPI-abhängigen Assoziierung mit *Raft*-Regionen der Membran ist PrP^C in nichtionischen Detergenzien löslich. Dies ist charakteristisch für die Lokalisierung eines Proteins außerhalb der *Lipid Rafts*. Der erste Hinweis darauf, dass PrP^C *Raft*-Regionen verlässt um endozytiert zu werden, stammt aus elektronenmikroskopischen (EM) Analysen immunogold-markierter Zellen. In diesen konnte die PrP^C Internalisierung in einer Zeitkinetik dargestellt werden. Zusätzlich konnte hier beobachtet werden, dass PrP^C oft in unmittelbarer Nähe zu einem „Nicht-

Raft“ Protein, dem Transferrin Rezeptor, endozytiert wurde (Morris *et al.*, 2006) (Abb. 20).

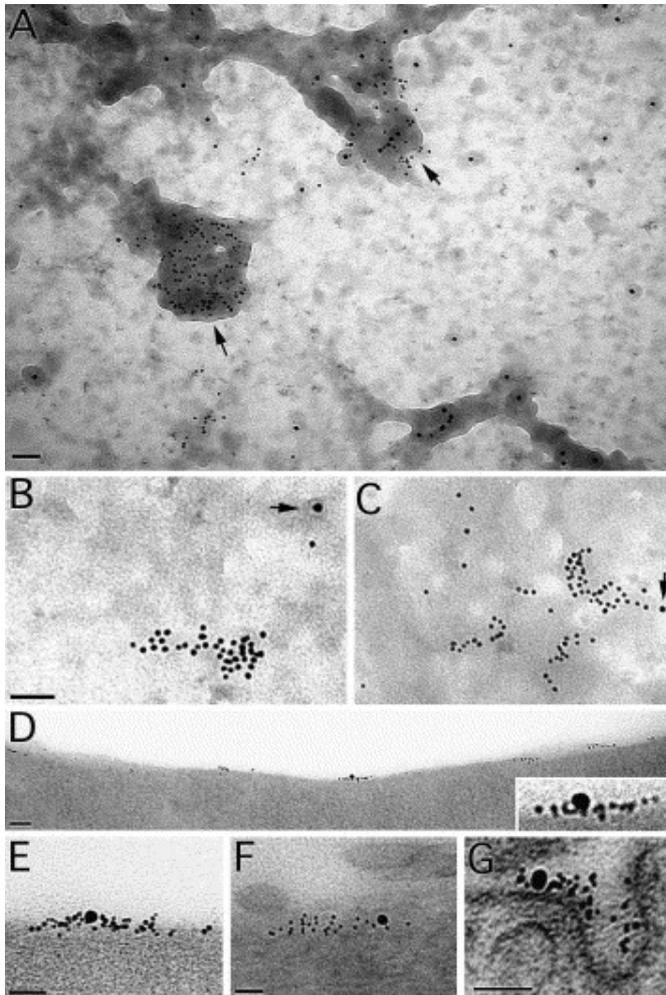


Abb. 20. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von PrP^C (durchgehend mit kleineren 5 nm Goldpartikeln markiert) während der Endozytose. (A) Markierung von PrP^C mit 5 nm Goldpartikeln in Neuronen und Verwendung von 10 nm Goldpartikeln, welche das endozytotische Adaptorprotein AP2 binden. Die gebildeten *coated pits* erscheinen als kleine Anhöhen, welche AP2-gebundene Partikel enthalten. In diesen Bereichen findet man hauptsächlich PrP^C-markierte Partikel. **(B, C)** Beispiele von PrP^C Immunofärbung zum Zeitpunkt 0. Hier ist eine große Menge des PrP^C nicht in der Nähe der CCPs zu finden (Pfeile zeigen auf das am nächsten gelegene AP2-Protein in der Umgebung) und liegt vermutlich in *Rafts* lokalisiert. **(D)–(G)** Elektronenmikroskopische Bereiche zeigen Anhäufungen von PrP mit Transferrin (10 nm Markierung). In (D) ist Transferrin in der Mitte einer Anhäufung von PrP zu erkennen. Weitere Beispiele sind in Abb. (E) und (F) dargestellt. (G) PrP^C und Transferrin gelangen gemeinsam in ein CCP (entnommen aus Morris *et al.*, 2006).

Hohe extrazelluläre Cu²⁺-Konzentrationen verstärken die PrP^C Aufnahme in die intrazelluläre Organelle und den Golgi-Apparat (Pauli & Harris, 1998; Lee *et al.*,

2001; Perera & Hooper, 2001; Brown & Harris, 2003) (Abb. 21). Diese Cu^{2+} -induzierte Endozytose soll in Neuroblastomzellen die Wanderung des PrP^{C} von *Rafts* in „Nicht-*Raft*“ Regionen der Membran bewirken. Es wurden jedoch auch Vermutungen angestellt, dass Cu^{2+} eine mögliche PrP^{C} -*Raft* Interaktion destabilisieren kann und so eine Interaktion mit „Nicht-*Raft*“ Regionen ermöglicht wird (Taylor *et al.*, 2005).

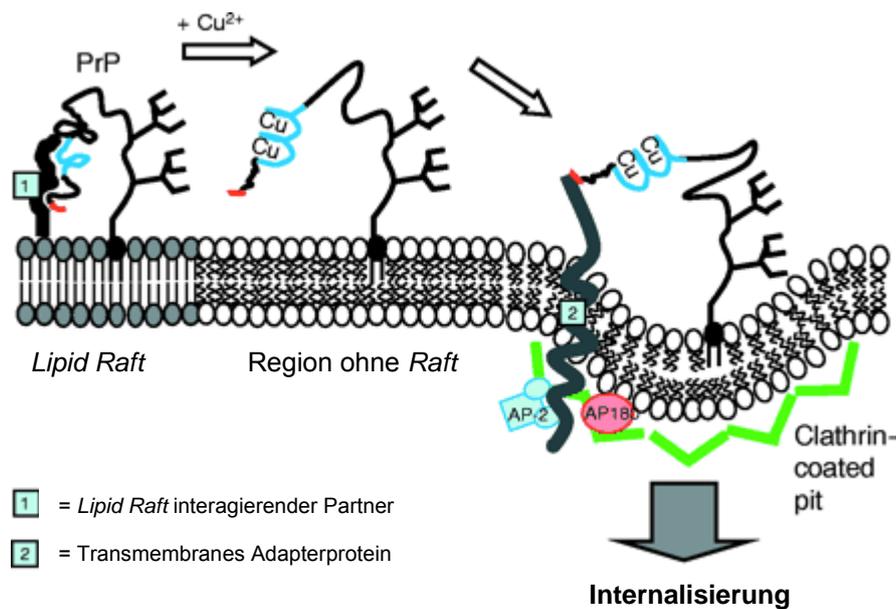


Abb. 21. Das Schema zeigt den Mechanismus der PrP^{C} Internalisierung. PrP^{C} ist im exoplasmatischen Bereich der Plasmamembran mittels GPI-Anker verankert und mittels Interaktion zwischen der N-terminalen Region (AS 23- 90, rot markiert (Walmsley *et al.*, 2003)) und eines *Raft*-lokalisierten Proteins oder Lipids in den *Rafts* gebunden. Durch die Bindung von Cu^{2+} an die *Oktarepeat*-Region (blau) kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch sich das Protein aus den *Rafts* löst und sich lateral zu Bereichen ohne *Rafts* der Membran bewegt. Die N-terminale Region interagiert mit der Ektodomäne eines Transmembranproteins, welches mit seiner cytoplasmatischen Domäne in Kontakt mit dem Adaptorprotein AP2 und den CCPs steht (entnommen aus Taylor *et al.*, 2005 und bearbeitet).

Aufgrund dieser Tatsachen scheint sich das PrP^{C} zu „Nicht-*Raft*“ Regionen der Membran zu bewegen, um dort internalisiert zu werden (Sunyach *et al.*, 2003). Obwohl dem PrP^{C} das erwartete intrazelluläre Internalisierungssignal fehlt, häufen sich die Erkenntnisse, dass *clathrin-coated pits* (CCP) eine große Rolle in der Endozytose des PrP^{C} spielen (Abb. 22). Erste Versuche mit Hühner- PrP^{C} in Säugerzellen konnte schließlich die Internalisierung des PrP^{C} mittels CCPs zeigen

(Shyng *et al.*, 1994). Taylor und Hooper konnten schließlich eine CCP-abhängige Internalisierung auch für Säuger-PrP^C feststellen (Taylor *et al.*, 2005; Sunyach *et al.*, 2003; Taylor & Hooper, 2007). Die NH₂-terminale Region des PrP^C soll während der Endozytose und des zellulären Transports eine wichtige Rolle spielen (Shyng *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2001; Nunziante *et al.*, 2003). Diese Region des Proteins wurde bereits zuvor bezüglich der Bindung negativ geladener Proteoglykane untersucht (Caughey & Baron, 2006). LRP1 (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) scheint durch die Interaktion mit der N-terminalen Domäne an der clathrin-vermittelten Internalisierung beteiligt zu sein, da die Reduzierung der LRP1 Expression die PrP^C Internalisierung verringert (Morris *et al.*, 2006; Taylor & Hooper, 2007). Sowohl der Einsatz von Antikörpern gegen LRP1 in verschiedenen Zelllinien als auch die Transfektion von Deletionsmutanten zeigen, dass LRP1 und/ oder der Lamininrezeptor von Bedeutung für den zellulären Transportweges des PrP^C ist (Gauczynski *et al.*, 2001; Gauczynski *et al.*, 2006). Durch Oberflächenbiotinylierung, Mikroskopie lebender Zellen (*live cell*), Versuche mit GFP-markiertem PrP und Elektronenmikroskopie konnte abschließend bestätigt werden, dass CCPs und klassische endosomale Organelle an der PrP^C Endozytose beteiligt sind (Brown & Harris, 2003; Magalhaes *et al.*, 2002; Shyng *et al.*, 1994; Sunyach *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2005). Morris und Mitarbeiter konnten zeigen, dass das PrP^C in Neuronen sehr schnell aus den *Lipid Rafts* über CCPs endozytiert wird, bevor ein Recycling zur Zelloberfläche stattfindet (Morris *et al.*, 2006). Zusätzlich deuten siRNA-Ansätze auf eine Rolle von Dynamin und Clathrin in der Internalisierung von PrP^C in unterschiedlichen Zelllinien hin (Taylor *et al.*, 2005) (Abb. 22).

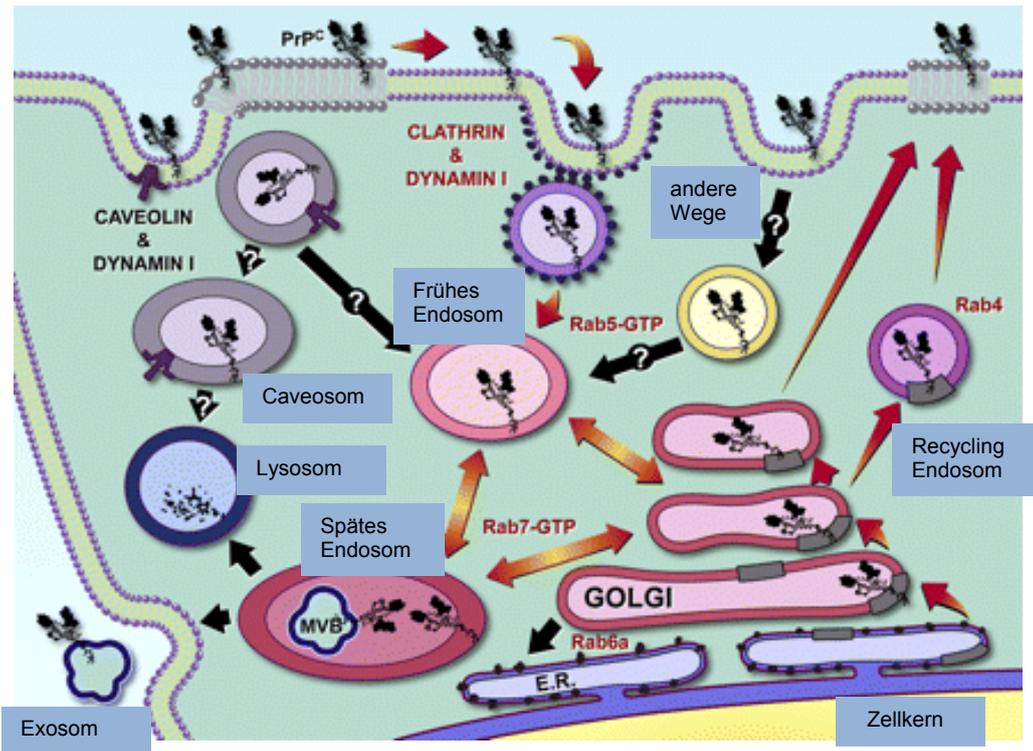


Abb. 22. Zellulärer Transport von PrP^C. Die Plasmamembran ist als Lipid-Bilayer dargestellt, wobei *Lipid Rafts* als grau eingefärbte, dickere Membranbereiche eingezeichnet wurden. Die wichtigsten Vesikel und Organelle, welche in der Synthese (unten rechts), dem endozytotischen Kreislauf von PrP^C und die Freisetzung von PrP^C-haltigen Exosomen (unten links) involviert sind, sind in schwarz beschriftet. Moleküle, welche im clathrin-abhängigen Endozytoseweg involviert sind, sind in rot beschriftet. Die Pfeile zeigen den Transport, wobei die roten Pfeile die wahrscheinlichsten Transportwege, basierend auf aktuellen Erkenntnissen, markieren. Clathrin ist mit dunkelblauen Punkten eingezeichnet, Caveolin ist in lila eingefärbt. PrP^C ist bereits sehr früh im sekretorischen Transportweg innerhalb der *Rafts* lokalisiert. PrP^C verlässt die *Raft*-Region um über Clathrin internalisiert zu werden (entnommen aus Linden *et al.*, 2008 und bearbeitet).

Eine geringe Menge des endozytierten PrP^C wird in Lysosomen degradiert, wobei der Großteil der Endosomen an die Zelloberfläche zurückkehrt (Vey *et al.*, 1996). Ein Teil des regenerierten PrP^C kann in das extrazelluläre Medium mittels Exosomen sezerniert werden (Fevrier *et al.*, 2004; Porto-Carreiro *et al.*, 2005; Robertson *et al.*, 2006). Diese membrangebundenen Strukturen bilden sich aus multivesikulären Vesikeln (MVB), welche im endosomalen System gebildet werden, und stehen in Verbindung mit dem Transport von Molekülen zwischen z. B. Immunzellen (Porto-Carreiro *et al.*, 2005) (Abb. 22).

2.5 Zielsetzung

Diese Arbeit soll zum allgemeinen Verständnis der zellulären Endozytosewege und Vesikeltransporte während einer akuten Infektion mit Prionerregern verschiedener Prionenstämme beitragen. Trotz verschiedener proteinbiochemischer Charakteristika der unterschiedlichen Prionstämme *in vitro* und deren phänotypische Unterscheidungsmerkmale *in vivo*, ist die Frage, wie sich die einzelnen Stämme auf zellbiologischer Ebene etablieren, nicht hinreichend geklärt. Da eine Beteiligung von *Lipid Rafts* an der PrP^{Sc} Konversion wahrscheinlich ist, kann eine Extraktion von Cholesterin an der Plasmamembran die PrP^{Sc} Bildung unterbinden. In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst durch die (1) Untersuchung mit cholesterolinteragierenden Inhibitoren geklärt werden, ob es prionstamm-spezifische Unterschiede in persistent infizierten nicht-neuronalen L929 bzw. neuronalen ScMHM2 Zellen bezüglich der PrP^{Sc} Akkumulierung gibt. Anschließend sollten (2) diese Untersuchungen während akuter Infektion der L929 und MHM2 Zellen durchgeführt werden, um mögliche Unterschiede zwischen den Zelltypen und Prionstämmen bezüglich der PrP^{Sc} Akkumulierung zu charakterisieren. Da Rabproteine mit speziellen Vesikeln des endozytotischen Prozesses assoziiert sind, ist es wahrscheinlich, dass Teile des intrazellulären Transports des Prionproteins von bestimmten Rabproteinen vermittelt werden. Daher sollte (3) durch genetische Manipulierung (siRNA) spezifischer Endozytosemoleküle und Rabproteine eine mögliche Abhängigkeit der PrP^{Sc} Akkumulierung von entsprechenden Transportwegen während der akuten Infektion mit unterschiedlichen Prionstämmen untersucht werden.

3 *Material*

3.1 *Geräte*

Autoklav V95	Systec, Wetttenberg
Axiovert 200M Mikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen
CO ₂ -Inkubator	W.C. Heraeus GmbH, Hanau
ELISA Reader Sunrise	Tecan Germany GmbH, Crailsheim
Epifluoreszenz-Mikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen
FACS EPICS XL	Becton Dickinson, Heidelberg
Fuchs- Rosenthal Zählkammer	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Frigomix U-1	B. Braun GmbH, Melsungen
Gradientenzentrifuge Beckman SW50 Rotor	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
LSM 510 Konfokales Laserscanning Mikroskop	Karl Zeiss Jena GmbH, Göttingen
Minicell® Primo EC320	Thermo Electron Cooperation, Erlangen
Minitron-Schüttler	Infors AG, Bottmingen
Perfect Blue Doppelgelsystem	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power Supply	GE Healthcare, Freiburg
Thermomixer 5436	Eppendorf- Netheler- Hinz GmbH, Köln
Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
TE77 ECL semi-Dry Transfer Unit	GE Healthcare, Freiburg
Ultrazentrifuge TL-100	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Wasserbad	GFL, Burgewede
Zentrifuge 5415C	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln
Zentrifuge Sigma 4K15	Sigma Laboratory centrifuges, Osterode am Harz

3.2 Chemikalien

Ammoniumchlorid	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bacillol Plus	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Biotin Sulfo- NHS LC	Pierce Bioscience, Rockaway NY, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Dextranblau	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (Minimum 99,5% GC)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D-PBS	Invitrogen (Gibco), Paisley, Scotland, UK
ECL plus Western blotting Detection System	GE Healthcare, Freiburg
Ethanol 99,8%	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol 96%	Apotheke des Klinikum rechts der Isar, München
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Gelatine	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glukose	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glycin	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Guanidiniumhydrochlorid	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
HCl 37% (w/w)	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Hoechst 33342	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Magermilch	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth GmbH & Co, Karlsruhe

METHODEN

Natriumdeoxycholat (DOC)	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
N-Lauroyl-Sarcosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N,N,N',N'-tetramethylenediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pefabloc SC	Roche, Mannheim
Permafluor	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C (PIPL-C)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteinase K	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Roti®-Histofix (4% Formaldehydlösung)	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Saponin	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
SDS-Protogel ultra pure	Biozym, Hess. Oldendorf
Tris-Hydroxy-methyl-aminomethan (TRIS)	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin-EDTA	Invitrogen (Gibco), Paisley, Scotland, UK
Tween 20	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
X-ray Filme Kodak Biomax MS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)	Becton Dickinson, Heidelberg

3.3 Inhibitorische Substanzen und siRNAs

Substanz	Stocklösungen	Vertreiber
Progesteron	10µg/ml in Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nystatin	25µg/ml in H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Filipin	5µg/ml in DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 4. Chemische Inhibitoren

siRNA gegen	Zelluläre Lokalisation des Proteins
Rab4 (SI02662786)	Endozytotisches Recycling
Rab7 (SI02710288)	Vesikeltransport zu späten Endosomen und der späten Endosomen zu Lysosomen
Rab9 (SI00215229)	Transport zwischen späten Endosomen und Trans-Golgi-Netzwerk
Rab11 (SI01394463)	Endozytotisches Recycling über Recycling Endosomen und Trans-Golgi-Netzwerk
Caveolin1 (SI00942207)	Subkompartimente der Plasmamembran, welche mit dem Transport und der Aufnahme unterschiedlicher Moleküle, insbesondere Signalproteine, in Verbindung gebracht werden.
Clathrin HC (SI00953603)	Clathrin ist ein zytosolisches Hüllprotein in sog. <i>clathrin coated pits</i> der Plasmamembran. Die schwere Kette des Clathrins (heavy chain: HC) ist essentiell für die Bildung der spezifischen Triskelion-Struktur des Proteins.
AllStars Negativkontroll-siRNA (1027280)	---

Vertreiber: Quiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 5. siRNAs gegen spezielle mRNAs sowie zelluläre Lokalisation der Proteine

3.4 Antikörper

Folgende Antikörper wurden entweder für die Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen (WB), in der Durchflusszytometrie (FACS) oder in der Immunfluoreszenz (IF) verwendet.

Primäre Antikörper	Eigenschaften	Spezifität	Vertreiber und Referenz
4H11	Monoklonaler Maus-Antikörper WB 1:1000 FACS 1:10 IF 1:10	PrP unterschiedlicher Spezies, u.a. Maus und Hamster	Ertmer <i>et al.</i> , 2004
3F4	Monoklonaler Maus-Antikörper WB 1:5000 FACS 1:100 IF: 1:100	Epitop in syrischem Hamster PrP und humanem PrP; Mutation 109-112 (MKHM)	Kascsak <i>et al.</i> , 1987 Rogers <i>et al.</i> , 1991
MAB374	Monoklonaler Maus-Antikörper WB 1:10000	GAPDH unterschiedlicher Spezies u.a. Maus	Millipore AG, Hampshire, UK
Rab4A (D-20) sc-312	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper WB 1:2500	Rab4 verschiedener Spezies u.a. Maus	Santa Cruz Biotechnologie Inc., Californien, USA
Rab7 (H- 50) sc-10767	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper WB 1:2500	Rab7 verschiedener Spezies u.a. Maus	Santa Cruz Biotechnologie Inc., Californien, USA
Rab9 (FL-201) sc-28573	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper WB 1:2500	Rab9A und Rab9B verschiedener Spezies u.a. Maus	Santa Cruz Biotechnologie Inc., Californien, USA
Rab11 (H-87) sc-9020	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper WB 1:2500	Rab11A und Rab11B verschiedener Spezies u.a. Maus	Santa Cruz Biotechnologie Inc., Californien, USA
Caveolin1 (N-20) sc-894	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper WB 1:3000	α - Caveolin1 unterschiedlicher Spezies u.a. Maus	Santa Cruz Biotechnologie Inc., Californien, USA
Clathrin HC AB21679	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper WB 1:3000	Schwere Kette (HC) des Clathrin verschiedener Spezies u.a. Maus	Abcam, Cambridge, UK

Sekundäre Antikörper	Eigenschaften	Spezifität	Vertreiber und Referenz
HRP-konj. anti-IgG	Antikörper aus dem Schaf WB 1:7500	Maus IgG	GE Healthcare, Freiburg
HRP-konj. anti-IgG	Antikörper aus dem Affen WB 1:7500	Kaninchen IgG	GE Healthcare, Freiburg
Cy3-konj. anti-IgG	Antikörper aus dem Affen IF 1:400	Maus IgG	Dianova, Hamburg
Cy2-konj. anti-IgG	Antikörper aus dem Affen IF 1:100 FACS 1:100	Maus IgG	Dianova, Hamburg
Cy3-konj. anti-IgG	Antikörper aus dem Affen IF 1:400	Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg

Tabelle 6. Antikörper und deren Spezifitäten

3.5 Puffer und Medien

FACS-Puffer

2,5 % (v/v) fötales Kälberserum (FKS)

0,05 % (w/v) Natriumazid

in 1x PBS

Auftragspuffer (3 x SEB)

Tris/HCl pH 6,8	90 mM
SDS v/v	7%
Glycerin v/v	30%
β-Mercaptoethanol v/v	20%
Bromphenolblau v/v	0,01%
H ₂ O _{bidest}	ad 100 ml

Block-Lösung

Magermilchpulver	5%
1 x TBST	ad 100 ml

METHODEN

Transferpuffer

Tris/HCl pH 8,5	25 mM
Glycin v/v	40 mM
Methanol v/v	20%
H ₂ O _{bidest}	ad 1 l

Einfriermedium

FKS	90%
DMSO	10%

10 x Elektrophoresepuffer

Tris/HCl pH 8,2	25 mM
Glycin v/v	250 mM
SDS	0,1%
H ₂ O _{bidest}	ad 1 l

Lysepuffer

Tris/HCl pH 7,5	10 mM
NaCl	100 mM
EDTA	10 mM
Triton X-100 v/v	0,5%
DOC w/v	0,5%
H ₂ O _{bidest}	ad 100 ml

Quenching-Lösung

NH ₄ Cl	50 mM
Glycin	20 mM
in PBS	

Sammelgel-Lösung pH 6,8

Tris/HCl pH 6,8	0,5 M
SDS w/v	0,4%
H ₂ O _{bidest}	ad 1l

METHODEN

Saponin-Puffer

Saponin 0,1%
in FACS-Puffer

10 x TBST

Tris/HCl pH 8,0 100 mM
NaCl 1,5 M
Tween 20 0,5%
H₂O_{bidest} ad 1l

TNE-Puffer

NaCl 150 mM
Tris/HCl pH 7,5 50 mM
EDTA 5 mM
H₂O_{bidest} ad 250 ml

Trenngel-Lösung pH 8,8

Tris/HCl pH 8,8 1,5 M
SDS w/v 0,4%
H₂O_{bidest} ad 1l

3.6 Zellmedien, Zusätze und Antibiotika

Für die Herstellung der Zellkulturmedien wurde das fötale Kälberserum vor der Verwendung 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert.

OptiMEM + GlutaMAX	Invitrogen (Gibco), Paisley, Scotland, UK
DMEM + GlutaMAX	Invitrogen (Gibco), Paisley, Scotland, UK
Penicillin-Streptomycin (10 mg/ml)	PAA, Pasching, Österreich
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, Pasching, Österreich

3.7 Murine Zelllinien

Murine Zelllinie	Eigenschaften	Referenz	Medium
N2a	Neuroblastomzellen	Klebe und Ruddle, 1969 Butler et al., 1988	OptiMEM, + 1% PenStrep, + 10% FKS
Hpl3F4	PrP ^{0/0} Zellen aus dem Hippocampus, stabile Expression des 3F4-Epitops	Kuwahara et al., 1999 Maas et al., 2007	DMEM, + 1% PenStrep, + 10% FKS
K21 (Klon21)	PrP ^{Sc} -empfindlicher N2a Klon (Prion-infizierte ScMHM2 Zellen wurden durch Pentosanpoly-sulfat geheilt, subkloniert und auf PrP ^{Sc} Empfänglichkeit getestet)	eigene Vorarbeiten (Diplomarbeit)	OptiMEM, + 1% PenStrep, + 10% FKS
ScMHM2	Persistent infizierte Neuroblastomzellen (Maus-adaptierter Scrapiestamm RML), stabile Expression von 3F4-Epitop-markierten Maus-PrP)	Scott <i>et al.</i> , 1992 Gilch <i>et al.</i> , 2001	OptiMEM, + 1% PenStrep, + 10% FKS
L929	Fibroblastenzellen	Vorberg <i>et al.</i> , 2004a ATCC CCL-1	DMEM, + 1% PenStrep, + 10% FKS
L929 /SK15.9	Zellklon der L929 Zellen (L929 Zellen wurden subkloniert und auf die Empfänglichkeit der Prionstämme 22L, RML und ME7 getestet)	Romina Bester (Institut für Virologie, München)	DMEM, + 1% PenStrep, + 10% FKS
L929-3F4	Fibroblastenzellen, die stabil 3F4-Epitop-markiertes Maus-PrP exprimieren	Vorberg <i>et al.</i> , 2004a	DMEM, + 1% PenStrep, + 10% FKS

Tabelle 7. Murine Zelllinien und deren Herkunft

4 Methoden

4.1 Quantitative Proteinbestimmung (Bradford)

Die Konzentrationsmessung von Proteinen in Lösung wurde photometrisch nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Bei diesem Test bindet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 die positiv geladenen Aminogruppen der zu messenden Proteine. Durch diese Interaktion verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von $\lambda = 465 \text{ nm}$ zu $\lambda = 595 \text{ nm}$. Diese Zunahme der Absorption stellt ein Maß für die Proteinkonzentration dar. Durch die Verdünnung einer BSA-Stammlösung in H_2O (0; 50; 75; 150; 250; 500; 1000; 1500 mg/ml) wurde eine Standardverdünnungsreihe erstellt. Die Proteinlysate wurden 1:10 in H_2O verdünnt und 5 μl der Verdünnungen und der Standarts mit 250 μl Coomassie Brilliant Blue G-250 in einer Mikrotiterplatte photometrisch bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ bestimmt. Mittels der gemessenen Extinktionen, welche in einem linearen Verhältnis zur Proteinkonzentration stehen, konnte nach Auswertung der Proteinstandartkurve die Proteinkonzentration der Lysate errechnet werden. Ausgehend von der niedrigsten Konzentration wurden die übrigen Lysate mit Lysepuffer verdünnt, um eine einheitliche Proteinmenge mit Proteinase K zu behandeln (siehe 4.4.3) und mittels SDS-PAGE (siehe 4.2) zu analysieren.

4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Molekülmasse verwendet. Durch Hitzedenaturierung bei 95°C und Denaturierung der Proteine durch Zugabe reduzierender Substanzen wie β -Mercaptoethanol und Dithiothreitol (DTT), werden Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgelöst und es erfolgt eine Aufspaltung der Schwefelbrücken zwischen Cysteinen. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) verleiht den Proteinen eine insgesamt negative Nettoladung, die direkt proportional zu dessen Größe ist. Die Proteine wandern durch die Poren der Polyacrylamidgele zur Anode, wobei die Proteine nach ihrem

METHODEN

jeweiligen Molekülgewicht aufgetrennt werden. Je kleiner die Proteine sind, desto schneller können sie das Gel passieren. Die zurückgelegte Strecke steht in direkter Verbindung mit der Proteingröße. Die Größe der Poren ist hierbei abhängig von der Konzentration des Acrylamids bei der Polymerisation des Gels.

Die verwendeten diskontinuierlichen Polyacrylamidgele nach Lämmli (Lämmli, 1970) bestehen aus zwei Teilen, die sich hinsichtlich der Porengröße und des pH-Wertes unterscheiden. Die Proben werden in einem Sammelgel mit großen Poren und niedrigerem pH-Wert (pH= 6,8) zu einer scharfen Bande konzentriert, so dass alle Proteine gleichzeitig das darunter liegende Trenngel erreichen. Diese zweite Gelphase besitzt einen höheren pH-Wert (pH= 8,8) und durch den höheren Anteil an Acrylamid kleinere Poren. Dies ermöglicht eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht ermöglicht wird. Je nach Größe des zu detektierenden Proteins wurden im Acrylamid-Gehalt unterschiedlich prozentige Trenngele gegossen (für PrP und Rabproteine 12,5 %, für Clathrin 7,5%).

	Gele x 2	Gele x 2
	12,5% Trenngel	7,5% Trenngel
H ₂ O _{dest}	20,3 ml	30,7 ml
Trenngel-Lösung	15,5 ml	15,5 ml
Acrylamid 30%	25,8 ml	15,5 ml
TEMED	90 µl	90 µl
APS 10%	192 µl	192 µl
	5% Sammelgel	
H ₂ O _{dest}	9,9 ml	9,9 ml
Sammelgel-Lösung	4,2 ml	4,2 ml
Acrylamid 30%	2,8 ml	2,8 ml
TEMED	30 µl	30 µl
APS 10%	168 µl	168 µl

4.2.1 Gelelektrophorese

Die Proben (4.4.3) wurden mit einer entsprechenden Menge an Auftragspuffer versetzt (3x SEB) und bei 95°C für 10 min denaturiert. Hierfür wurden die Gele in eine Elektrophoresekammer eingespannt und die Anoden- und Kathodenkammer mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Proben und der Längenstandard *Rainbow coloured protein molecular weight marker* (Amersham Biosciences, Freiburg) wurden aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einem 16 x 14 cm-Gel bei konstanten 35 mA für etwa 3 h.

4.2.2 Western Blot

Mittels Western Blot, der auch als Immunoblot bezeichnet wird, können Proteine nach der SDS-PAGE-Auftrennung durch Inkubation mit einem spezifischen Antikörper identifiziert werden. Hierzu wurden die Proteine nach der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese elektrophoretisch auf eine Hybond-P Polyvinylidindifluorid-Membran (PVDF-Membran, Amersham, Freiburg) übertragen. Der Transfer wurde in einer *semi-dry Transfer Cell* Fastblot-Apparatur durchgeführt. Sechs Whatman-Filterpapiere und eine PVDF-Membran wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die Filterpapiere wurden in Blotting-Puffer, die Membran in Methanol äquilibriert. Nacheinander wurden drei Filterpapiere, die Membran, das Polyacrylamidgel und wiederum drei Filterpapiere übereinander luftblasenfrei auf die Anode platziert. Nach dem Auflegen der Kathode erfolgte die Elektrophorese für 30 min bei 18 V pro Gel.

4.2.3 Proteindetektion

Die PVDF-Membran wurde nach dem Proteintransfer für mind. 30 min in einer Block-Lösung bei Raumtemperatur (RT) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Zur Detektion eines spezifischen Proteins wurde die Membran im entsprechenden Primärantikörper in 1x TBST über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Der Primärantikörper bindet an ein oder mehrere Epitope des Proteins und kann durch Bindung seinerseits an einen Sekundärantikörper, der mit

einer Peroxidase gekoppelt ist, detektiert werden. Nach 5maligem Waschen der Membran für je mind. 5 min in 1x TBST wurde dieser Zweitantikörper 1:10000 in 1x TBST verdünnt und mit der Membran für 1 h unter Schwenken bei RT inkubiert. Die Membran wurde 5x für mind. 5 min bei RT in 1x TBST gewaschen, kurz in H₂O_{dest} gelegt und getrocknet. Die ECLPlus-Lösung wurde nach Herstellerangaben angesetzt und für 3 min mit der Membran inkubiert. Der Protein-Antikörper-Komplex konnte durch die Peroxidase vermittelte Umsetzung chemogener Substanzen der ECL-Lösung durch ein chemolumineszierendes Signal auf einem Röntgenfilm visualisiert werden. Hierzu wurde die Membran getrocknet und in Klarsichtfolie eingeschlagen. Der Röntgenfilm BioMax MR Film (Kodak, Cedex, Frankreich) wurde im Regelfall 1 min, 5 min und 2 h exponiert und in einer Röntgenfilmprozessormaschine entwickelt.

4.3 Dot Blot

Die DotBlot Technik ist eine Vereinfachung des Immunoblot. Bei dieser Methode werden die Protein- Proben nicht über eine SDS-PAGE aufgetrennt, sondern direkt tropfenweise auf eine Membran aufgetragen. Daher können keine Aussagen über Molekülgrößen gemacht werden. Der Dotblot dient ausschließlich zum Nachweis eines Proteins in einer Probe. So kann beispielsweise ein bestimmtes Protein in unterschiedlichen Fraktionen eines Gradienten nachgewiesen werden.

Eine PVDF-Membran (0,45 nm, Millipore) wurde 30 s in Methanol äquiliert und 2x mit PBS 5 min gewaschen. Die Membran wurde luftblasenfrei unter leichtem Vakuum auf der Apparatur platziert. Jede Aussparung wurde nochmals mit 200 µl PBS gewaschen, bevor die Proteinlysate (4.4.3), welche nicht mit Auftragspuffer versehen waren, aufgetragen wurden. Unbeladene Aussparungen der Apparatur wurden mit PBS aufgefüllt. Nach dem Vakuumtransfer der Proteine auf die Membran erfolgten zwei weitere Waschschrte mit PBS bevor der Deckel der Apparatur unter Vakuum geöffnet wurde. Die Membran wurde 10 min in 3 M Guanidiniumthiocyanat geschwenkt und anschließend 2x 5 min in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurde die Membran 30 min 5% Magermilch inkubiert. Die weitere Proteindetektion erfolgte wie in der SDS-PAGE Methode beschrieben (siehe 4.2.3).

4.4 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank und unter Berücksichtigung der Arbeitsanweisungen des Labors der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt.

4.4.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Alle verwendeten adhärenenten Zelllinien benötigten für ihr Wachstum einen regelmäßigen Austausch des Mediums. Die verschiedenen Medien wurden mit 1% Penicillin-Streptomycin (PS) und 10% fötales Kälberserum (FKS) versetzt, welches zuvor 30 min bei 56°C inaktiviert worden war. Die Zeitintervalle des Mediumwechsels oder der Subkultivierung betragen abhängig von Wachstumsgeschwindigkeit und Metabolismus der jeweiligen Zelllinie 4 bis 5 Tage. Bei Erreichen der 100%igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit einer magnesium- und kalziumfreien phosphatgepufferten Salzlösung (D-PBS) gewaschen. Um die Zellen ablösen zu können, wurden sie mit 500 µl Trypsin-EDTA etwa 4 min inkubiert. Die noch lose anhaftenden Zellen konnten mit entsprechendem Medium abgelöst und in der passenden Verdünnung homogen in die neuen Kulturschalen (Becton Dickinson (Falkon), Franklin Lakes, NJ USA) ausgesät werden. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre im Inkubator (siehe 3.1) kultiviert.

4.4.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Für eine längere Lagerung wurden die konfluent gewachsenen Zellen nach der Trypsinisierung 10 min bei 1000 rpm (Sigma centrifuge 4K15) bei RT schonend pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 ml vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert. Je 1 ml wurde in vorgekühlte Kryoröhrchen (Corning Incorporated, NY, USA) überführt und sofort bei -80°C eingefroren. Am folgenden Tag konnten diese in flüssigen Stickstoff (-196°C) zur längeren Aufbewahrung überführt werden. Um in Flüssigstickstoff gelagerte Zellen wieder zu kultivieren,

wurden diese in einem 37°C-Wasserbad zügig aufgetaut und in das entsprechende Medium gegeben. Durch eine Zentrifugation von 10 min. bei 1000 rpm (Sigma centrifuge 4K15) bei RT wurden die Reste des Einfriermediums entfernt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert und kultiviert.

4.4.3 Zellyse und Proteinase K-Behandlung

Zur Präparation postnukleärer Lysate wurden adhärente Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Lysepuffer für 10 min bei RT lysiert. Die Zellmembran wurde hierbei zerstört und die intrazellulären Proteine freigesetzt. Das Zelllysate wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zur Abtrennung von Zellrückständen 1 min bei 14.000 rpm (Centrifuge 5415C) zentrifugiert. Der geklärte Überstand wurde zur weiteren Verarbeitung in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße übertragen. Einem Aliquot des Lysats wurde 20 µg/ml Proteinase K (PK) zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert (+ PK-Ansatz). Hierdurch wurden alle Proteinase K-sensitiven Proteine proteolytisch abgebaut, u.a. das zelluläre Prionprotein PrP^C. Weitere Proteinaseaktivitäten wurden durch Zugabe von 2 mM Pefabloc, ein spezifischer Serinproteasen Inhibitor, gestoppt. Der Ansatz wurde mit der 5fachen Menge Methanol versetzt und die Proteine über Nacht bei -20°C gefällt. Das restliche Lysat wurden ohne Proteinase K-Behandlung mit Methanol gefällt und dient als - PK-Ansatz. Die Präzipitate wurden bei 4°C, 3500 rpm (Sigma Zentrifuge 4K15) 25 min sedimentiert. Nach Verwerfen des methanolhaltigen Überstands wurde das Pellet 10 min bei RT getrocknet und in 40-100 µl TNE-Puffer resuspendiert. Nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung wurden die Proben mit 3x SEB versetzt und die Proteine 10 min bei 95°C denaturiert. Die Lysate wurden bis zur SDS-Analyse bei -20°C aufbewahrt.

4.4.4 Ultrazentrifugation

Postnukleäre Lysate (4.4.3) wurden mit Proteinase K behandelt und mit 50 µl 10% N-Lauroyl-Sarcosin versehen. Nach der Ultrazentrifugation für 1 h bei 4°C und 40.000 rpm (Ultrazentrifuge TL-100) wurden die Proteine der solublen Fraktion umgehend

abgenommen und mittels Methanol gefällt (4.4.3). Die unlösliche Fraktion (Pellets) wurde in 15 µl 1x SEB aufgenommen (Verdünnung des 3x SEB mit TNE-Puffer). Nach der üblichen Denaturierung (siehe 4.2.1) wurden die Proteine bis zur PAGE-Analyse bei -20°C aufbewahrt.

4.4.5 Transiente Transfektion von siRNA in Säugerzellen

Die transiente Transfektion von Säugerzellen mittels siRNA (*small interfering RNA*) ist eine effektive Möglichkeit Proteine und deren zelluläre Funktionen zu blockieren. SiRNAs sind kurze, doppelsträngige RNA-Moleküle, die über einen zellulären Prozess, der RNA Interferenz (RNAi), zur Degradierung von mRNA mit komplementärer Sequenz führen (Elbashir *et al.*, 2001a). Durch die transiente Transfektion von synthetischer siRNA kann für 6-10 Tage eine Erniedrigung zellulärer Proteine erreicht werden (Byrom *et al.* 2002). Die transiente Transfektion mittels Lipofektion ermöglicht die Einschleusung der siRNAs über Bildung von Liposomen. Diese fusionieren mit der Zellmembran und können so den jeweiligen Inhalt in die Zelle abgeben.

Die Fibroblastenzellen L929 wurden mit Lipofektamin 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben unter RNase freien Bedingungen mit den jeweiligen siRNAs (Tabelle 5) und einer Kontroll-siRNA für 24 h transient transfiziert. L929 Zellen wurden in einer Verdünnung von 1×10^5 Zellen (DMEM +FKS, -PS) in 24-Lochplatten ausgesät. Im Ansatz A wurden 50 µl DMEM- Medium, ohne Mediumzusätze, und 1 µl Lipofektamin gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Dem Ansatz B wurde 50 µl DMEM-Medium (-FKS, -PS) und 20 nmol der zu transfizierenden siRNA zugegeben. Beide Ansätze wurden gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Frisches Medium ohne Zusätze wurde vorgelegt und die Zellen mit dem gesamten Ansatz inkubiert. Nach 24 h wurde das Transfektionsmedium durch Kultivierungsmedium (+FKS, +PS) ersetzt und die Zellen bis zur Infektion bei 37°C im Brutschrank inkubiert oder direkt lysiert. Die transiente Erniedrigung von zellulären Proteinen in persistent infizierten L929 Zellen (22L, RML, ME7) erfolgte nach dem oben genannten Protokoll mit geringen Abweichungen. Die infizierten Zellen wurden in einer 6-Lochplatte 1:20 am Vortag ausgesät. Der gesamte Transfektionsansatz wurde nach Herstellerangaben (Lipofectamine 2000, Invitrogen) auf den Zellen verteilt und 24 h inkubiert bevor ein

Mediumwechsel durchgeführt wurde. Die Zellen wurden nach weiteren zwei Tagen lysiert und für die SDS-PAGE Analyse vorbereitet.

4.4.6 Indirekte Immunfluoreszenz

Durch die Immunfluoreszenz können spezifische Proteine in Zellen lokalisiert und dokumentiert werden, indem fixierte Zellen mit einem speziellen Primärantikörper und einem entsprechenden Sekundärantikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist, markiert werden. Die Anregung des Konjugates erfolgt durch ein kofokales Laserscanning-Mikroskop. Hierzu sollten die Zellen von einer konfluent bewachsenen 10 cm-Schale in einer Verdünnung von 1:25 auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausplattiert werden, um ein Überwachsen der Zellen zu verhindern. Nach siRNA Transfektion und/oder Infektion wurden die Zellen vier Tage nach dem Aussäen, nach einmaligem Waschen mit PBS im Falle einer Oberflächenfärbung, vor der Fixierung mit dem jeweiligen Erstantikörper in einer feuchten Kammer 1 h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit Roti-Histofix für 30 min bei RT fixiert. Die Fixierlösung wurde entfernt, die Zellen 3x mit PBS gewaschen und mit dem Zweitantikörper 20 min bei RT inkubiert. Nach 3x Waschen mit PBS wurden die Zellen 15 min bei RT in der feuchten Kammer mit dem Hoechst DNA Farbstoff (2 μ g/ml in PBS) behandelt, um die Zellkerne gegenzufärben. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen auf den Deckgläschen in *Permafluor* (Beckman Coulter, Marseilles, France) eingedeckt und nach dem Trocknen bei -20°C gelagert.

Im Unterschied zu einer Oberflächenfärbung werden Zellen für eine intrazelluläre Färbung direkt wie zuvor beschrieben fixiert. Des Weiteren wurden die Zellen für die intrazelluläre Färbung durch Zugabe einer Lösung von 50 mM NH₄Cl und 20 mM Glycin 10 min bei RT *gequench*t. Dies führt zur Absättigung der Aldehydgruppen des Roti-Histofix, um eine unspezifische Bindung der Primärantikörper zu unterbinden. Nach weiteren Waschschritten (3x PBS) wurden die Zellen mit 0,1% Triton X- 100/ PBS für 10 min bei RT permeabilisiert. Im Falle einer PrP^{Sc} Detektion (siehe 5.2.4) folgt ein Denaturierungsschritt mit 6 M GndCl für 10 min bei RT. Die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen und mit 0,2% Gelatine 10 min bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Zellen wurden mit dem

Primärantikörper (in Gelatine verdünnt) 30 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Es erfolgten drei Waschschrte in PBS und die Inkubation mit dem Cy2- oder Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper (in Gelatine verdünnt) 20 min bei RT in der feuchten Kammer im Dunkeln. Nach weiteren Waschschrten (3x PBS) erfolgte, wie bei der Oberflächenfärbung, die Färbung der Zellkerne mittels Hoechst DNA Farbstoff 15 min im Dunkeln bei RT in der feuchten Kammer. Nach dem letzten Waschschrte wurden die Zellen auf den Deckgläschen in *Permafluor* (Beckman Coulter, Marseilles, France) auf Objektträgern eingedeckt und nach dem Trocknen bei -20°C gelagert. Die konfokale Laserscanning Mikroskopie wurde an einem LSM 510 Laserscanning Mikroskop (Zeiss, Göttingen, Germany) mit der Software LSM 510 Zeiss Mikroskop System Version 3.0 durchgeführt.

4.4.7 FACS Analyse

Im Gegensatz zur Immunfluoreszenz können mittels Durchflusszytometrie auch quantitative Aussagen durch Analyse von Zellen in Suspension gemacht werden. Je nach Form, Struktur und Fluoreszenz der Zellen werden unterschiedliche Darstellungen erzeugt. Daraus könnten die Eigenschaften der Zellen abgeleitet werden. Da die Zellen bei der Oberflächenfärbung weder fixiert noch permeabilisiert werden, können tote Zellen durch Anfärbung der DNA detektiert und von der Quantifizierung ausgeschlossen werden. Die Oberflächenexpression von PrP^C nach Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen siRNAs wurde unter anderem mittels Durchflusszytometrie untersucht. L929 SK15.9 Zellen wurden 1:20 in 6-Lochplatten ausgesät und mit siRNA transfiziert (4.4.5). Um die Oberflächenexpression von PrP^C zu analysieren, wurden die Zellen 48 h nach Transfektion in FACS-Puffer (2,5% FCS und 0,05% Na-Azid in PBS) aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert. Zur Färbung wurde der Primärantikörper zugegeben und die Zellen für 30 min auf Eis gelagert. Nach dreimaligem Waschen in FACS-Puffer, wurde der Sekundärantikörper zu den Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach drei Waschschrten wurden die Zellen mit 7-Amino-actino-mycin D (BD Pharmingen, Heidelberg, Germany) (in FACS-Puffer verdünnt) gefärbt, um tote Zellen ausschließen zu können. So konnten 7-AAD negative Zellen als zu analysierende Zellpopulation abgegrenzt werden. Um das Gesamt-PrP^C nachzuweisen, muss eine intrazelluläre FACS-Färbung

durchgeführt werden. Hierzu wurden die Zellen bei 1200 rpm, 4°C für 5 min sedimentiert und 10 min bei RT in Roti-Histofix fixiert. Nach dreimaligem Waschen in FACS-Puffer und wiederholten Zentrifugationsschritten wurden die Zellen 10 min bei RT in einer *Quenching*-Lösung (50 mM NH₄Cl und 20 mM Glycin) zur Reduzierung der Autofluoreszenz inkubiert. Die Zellmembranen wurden durch die Zugabe von Saponin-Puffer (10 min, RT) permeabilisiert und anschließend mit dem Primärantikörper (verdünnt in Saponin-Puffer) 30 min auf Eis inkubiert. Nach 3 Waschschritten in Saponin-Puffer wurde das PrP^C mittels Sekundärantikörper für 30 min im Dunkeln auf Eis fluoreszenz-markiert. Nach den darauffolgenden Waschschritten in Saponin-Puffer wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Analyse im Dunkeln auf Eis gehalten. Die FACS-Analyse wurde mit Hilfe eines Coulter Epics XL MCL Apparates (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) durchgeführt.

4.4.8 Phosphoinositolphospholipase C (PIPL-C)-Verdau

Um die Oberflächenexpression von PrP^C zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem bakteriellen Enzym PIPL-C (Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C) behandelt. Das Enzym spaltet spezifisch GPI-verankerte Proteine von der Zelloberfläche ab. Diese Proteine befinden sich daraufhin im Überstand und lassen sich nach einer Proteinfällung des Mediums mit Western Blot nachweisen. Da Kulturmedium mit 10 % fötalem Kälberserum für die folgende Proteinfällung zu proteinhaltig ist, werden die Zellen während des Verdauens mit PIPL-C in Medium ohne Kälberserum kultiviert.

Sobald L929 Zellen zu 80% konfluent gewachsen sind, wurden diese zweimal mit PBS gewaschen und mit Medium ohne FKS unter Zugabe von 200 mU PIPL-C (Roche, Mannheim, Germany) für 8 h bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde gesammelt und der Überstand zweimal 5 min bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10 µl Pefablock versetzt und die darin enthaltenen Proteine in 3 ml MetOH über Nacht bei -20°C gefällt.

Die Zellen selbst wurden mit PBS gewaschen und nach der Sedimentation lysiert (Lysepuffer siehe 3.5). Nach der Zentrifugation des Lysats (1 min bei 14.000 rpm)

wurde dem Überstand mit 10 µl Pefabloc und 3 ml MetOH zugefügt. Das Zellpellet sowie die Mediumfraktion wurden in einem Immunoblotverfahren analysiert.

4.4.9 Gradientenzentrifugation

Die Gradientenzentrifugation ermöglicht es, durch ein Medium mit stufenweiser oder kontinuierlich zunehmender Dichte, unter einem Schwerefeld, das durch eine Ultrazentrifuge erzeugt wird, in unterschiedlichen Membranfraktionen Vesikel oder *Rafts* der zu untersuchenden Zellen aufzutrennen und zu analysieren. Hierzu wurden 3×10^7 Zellen in 400 µl Lysepuffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton-X 100, 25 mM Tris/HCl pH 7.5) aufgenommen und 30 min auf Eis in einem Kühlraum inkubiert. Bei 4°C wurden die Ansätze mit 70% Nycodenz (150 mM NaCl, 25 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM EDTA) versetzt und in einer Endkonzentration von 35% Nycodenz in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Diese Fraktion wurde mit einem diskontinuierlichen Nycodenzgradienten überschichtet, indem 200 µl Nycodenz Fraktionen mit variierenden Konzentrationen (25, 22.5, 20, 18, 15, 12 und 8%) nacheinander bei 4°C aufeinander pipettiert wurden. Die Ansätze wurden mit 200.000 g bei 4°C für 4 h in einem Beckman SW50 Rotor ultrazentrifugiert. Die 200 µl Fraktionen wurden bei 4°C vom oberen Rand des Ultrazentrifugenröhrchens nach unten abgenommen und die Proteine mit 5 Volumen Methanol gefällt. Nach der Zentrifugation bei 2600 g für 25 min (Beckman SW50 Rotor, Beckman Coulter Zentrifuge) wurden die Pellets in TNE und Auftragspuffer (3x SEB) aufgenommen und im Immunoblot analysiert.

4.4.10 Behandlung von Zellen mit chemischen Inhibitoren

Mit 22L, RML, ME7 persistent infizierte L929 Zellen bzw. 22L- und RML-infizierte ScMHM2 Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät und mit unterschiedlichen Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen (Tabelle 4) behandelt. In dieser Zeit wurde weder ein Mediumwechsel durchgeführt noch der Inhibitor erneut zugegeben. Nach einem Zeitraum von 4 Tagen wurden die Zellen lysiert und auf eine mögliche Änderung des PrP^{Sc} Gehalts über SDS-PAGE analysiert. Für die Wirkung der verschiedenen Inhibitoren während einer akuten Infektion wurden Zellen des L929

Klon SK 15.9 bzw. des MHM2 Klons K21 in einer Konzentration von 1×10^5 in einer 24-Lochplatte ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen für 3 h mit den Inhibitoren vorinkubiert. Die Infektion mit Hirnhomogenat (siehe 4.4.12) fand ebenfalls in inhibitorhaltigem Medium ohne FCS statt. Fünf Stunden später wurden nach dreimaligem Waschen mit PBS die Zellen in Vollmedium aufgenommen und bis zur Analyse kultiviert.

4.4.11 Infektion von Säugerzellen mit verschiedenen Maus-adaptierten Prionenstämmen

Die Maus-adaptierten Prionstämme 22L, RML und ME7 wurden von Prof. Dr. M. Groschup (Friedrich-Loeffler Institut, Insel Riems, Deutschland) und Suzette Priola (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Hamilton, MT) bezogen. Die Gehirne wurden mit PBS in einem Glashomogenisator unter erhöhten Sicherheitsbedingungen homogenisiert und in Aliquots bei -80°C gelagert. Der MHM2 Klon K21 wurde in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/24-well in OptiMEM (+ 10% FKS, + PenStrep) ausgesät. Die Zellen wurden mit $200 \mu\text{l}$ 1% Hirnhomogenat inkubiert (Verdünnung in OptiMEM +PS, -FKS). Nach 4 h wurde den Zellen $400 \mu\text{l}$ Medium (+PS, +FKS) zugegeben. Weitere 24 h später wurde das Hirnhomogenat verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach 96 h wurden die Zellen expandiert oder aber für den Nachweis von PrP^{Sc} lysiert. Die Proben wurden bis zur Auftrennung mittels der SDS-PAGE bei -20°C gelagert. Als Negativ-Kontrolle wurden Zellen mit einem nicht infektiösen Hirnhomogenat (CD-1 Mäuse) inkubiert.

L929 Zellen (Klon SK 15.9), die 24 h vor der Infektion in einer 24-Lochplatte mittels siRNA transfiziert wurden (4.4.5), wurden ebenfalls mit $200 \mu\text{l}$ 1% Hirnhomogenat (22L, RML, ME7) inkubiert. Nach fünf Stunden wurde das Hirnhomogenat verworfen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in DMEM Medium (+FKS, +PS) aufgenommen und bis zur Konfluenz kultiviert. Die infizierten Zellen wurden auf 6-Lochplatten (Passage 1) und 10cm-Schalen (Passage 2) expandiert und auf ihren PrP^{Sc} Gehalt hin untersucht. Um die Effizienz der Blockierung durch die siRNA zum Zeitpunkt der Infektion zu ermitteln, wurde eine zusätzliche 24-Lochplatte mit siRNA transfiziert (siehe 4.4.5) und nach 30 h, etwa zum Zeitpunkt der Infektion

des parallelen Ansatzes, lysiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Infektionen wurden in fünf unabhängigen Experimenten durchgeführt.

4.5 Photodensitometrische Analyse und Statistik

Die photodensitometrische Analyse der Western Blot Signale wurde mit Hilfe der ImageJ Software (Broken Symmetry Software) durchgeführt. Die Bandenintensität wurden mit der GraphPad Prism Software (GraphPad Software, San Diego, CA) statistisch ausgewertet. Zur Ermittlung statistischer Signifikanzen wurde der *paired two-tailed t test* verwendet, wobei die Kontrollwerte auf 100% festgesetzt wurden. *p*-Werte niedriger als 0,05 wurden als signifikant bewertet. Quantitative Auswertungen wurden als Mittelwerte der verwendeten Daten mit Standardabweichungen dargestellt.

4.6 Biologische Sicherheit

Gentechnische Arbeiten erfolgten in einem Labor Sicherheitsstufe 2 gemäß den Richtlinien des deutschen Gentechnikgesetzes vom 01.01.2004. Biologisch kontaminierte Materialien und Lösungen wurden getrennt gesammelt und nach den bestehenden Bestimmungen inaktiviert und entsorgt. Prionenhaltigen Lösungen wurden für 24 h mit 1 M NaOH versetzt und sowohl flüssiger Müll als auch Feststoffe, die mit Prionen in Kontakt gekommen sein könnten, wurden vorschriftsmäßig für 60 min bei 134°C und 3 bar autoklaviert.

5 Ergebnisse

5.1 Identifizierung Zelltyp- und Prionstamm-spezifischer Charakteristika während der akuten und persistenten Prioninfektionen von Säugerzellen

Zahlreiche Studien konnten Prionstämme bereits nach ihren unterschiedlichen biochemischen und phänotypischen Merkmalen unterteilen (2.6.2). Prionstämme unterscheiden sich *in vivo* in Merkmalen wie die Inkubationszeit nach der Inokulation, dem Läsionsprofil im Gehirn und der Lokalisierung von PrP^{Sc} in speziellen Gehirnbereichen (Bessen & Marsh 1992; Bruce 1993; Peretz *et al.*, 2002; Safar *et al.*, 1998). *In vitro* stellt u.a. die Proteaseresistenz, die Resistenz gegenüber Denaturierung durch chaotropische Reagenzien und die Bindungsaffinität zu Kupfer biochemische Indikatoren zur Differenzierung der Prionstämme dar (Morales *et al.*, 2007). Daher stellt sich die Frage, wie sich die einzelnen Stämme auf zellbiologischer Ebene etablieren können und ob sich hierbei ebenfalls Unterschiede erkennen lassen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung kann nur eine Zelllinie genutzt werden, die für mehrere Prionstämme nachweisbar empfänglich ist. In einer vorangegangenen Diplomarbeit wurde die neuronale, RML-infizierte Neuroblastom Zelllinie ScMHM2 subkloniert und schließlich durch die Behandlung mit Pentosanpolysulfat (PPS) von der Prioninfektion geheilt. So konnte der Subklon K21 generiert werden, der für 22L- und RML-Infektionen hochempfindlich ist. Diese neuronale Zelllinie ist eines der gängigsten Untersuchungsmodelle und sollte zudem als Vergleichszelllinie dienen. Ebenso wurde die nicht-neuronale Zelllinie L929 in dieser Arbeit verwendet, die nach einer Subklonierung für die drei Maus-adaptierten Prionstämme 22L, RML und ME7 empfänglich ist. Über die Endozytose von PrP^C und die möglichen Internalisierungswege von PrP^{Sc} einzelner Stämme in persistent infizierten neuronalen Zellen ist bereits einiges bekannt (2.4; 2.5.2). Für L929 Zellen liegen jedoch wenige Daten diesbezüglich vor. Im Folgenden sollte untersucht werden, welche Rolle Cholesterol für die PrP^{Sc} Akkumulierung während einer akuten sowie persistenten Infektion mit Prionerregern verschiedener Prionenstämme in unterschiedlichen Zelllinien spielt. Hierfür wurden Substanzen verwendet, die

persistente Infektionen durch die Veränderungen der *Raft*-Strukturen beeinflussen können (Taraboulos *et al.*, 1995; Bate *et al.*, 2004; Gilch *et al.*, 2005; Gilch *et al.*, 2009).

5.1.1 Charakterisierung der murinen Zelllinie L929

Murine L929 Fibroblasten dienen als nicht-neuronale Zellkulturmodelle in der Prionforschung (Vorberg *et al.*, 2004a). Durch die Subklonierung von L929 Zellen ist es gelungen, den hochempfindlichen L929 Klon 15.9 zu generieren (Romina Bester, Institut für Virologie, München). Dies eröffnet neue Erforschungsmöglichkeiten für die Prionbiologie, da nur wenige nicht-neuronale Zelllinien mit drei unterschiedlichen Prionstämmen infizierbar sind (Nuvolone *et al.*, 2009). Zum einen kann der Einfluss unterschiedlicher chemischer Inhibitoren auf die Zellbiologie verschiedener Prionstämmen untersucht werden. Desweiteren ist es möglich Unterschiede der Prionstämmen bezüglich der Infektionskinetik, des zellulären Aufnahmemechanismus und des Konversionsortes von PrP^C zu PrP^{Sc} näher zu beleuchten. Durch die Verwendung solcher neuer Zellkultursysteme sollte es möglich sein, die Vorgänge während der Infektion mit Prionen genauer zu charakterisieren.

Der L929 Klon 15.9 wurde nach der Infektion acht Passagen kultiviert, um eine stabile Infektion in den Zellen sicherzustellen. Die Expression von PrP^{Sc} wurde nach einem PK-Verdau mittels Immunoblot analysiert (Abb.23). Die deutlich höchste PrP^{Sc} Akkumulierung zeigt sich nach der Infektion mit dem Prionstamm 22L (Spuren 1-4). Die Infektion mit dem ME7-Stamm (Spuren 9-12) weist nach einer Infektion mit dem RML-Stamm (Spuren 5-8) die niedrigste PrP^{Sc} Menge in dem verwendeten Klon 15.9 auf (Abb. 23).

ERGEBNISSE

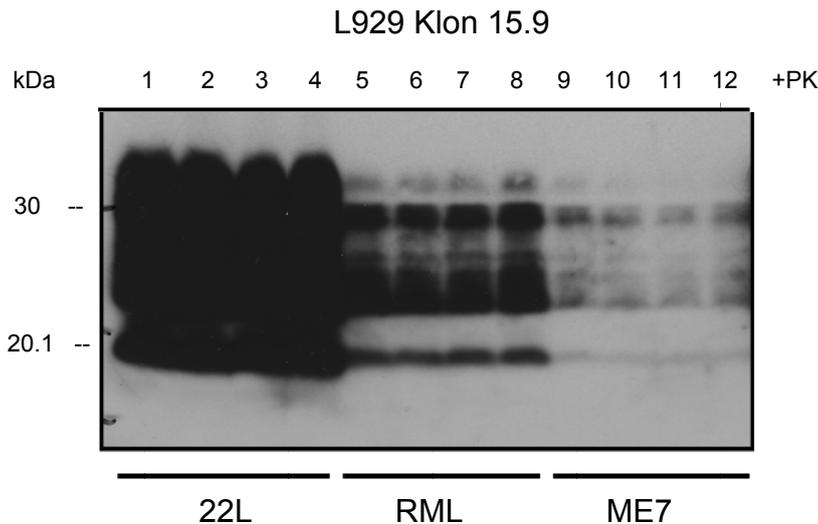


Abb. 23: L929 Klon 15.9 ist mit den 3 unterschiedlichen Prionstämmen 22L, RML und ME7 infizierbar. L929-15.9 Zellen wurden 24 h mit 1%igem Hirnhomogenat von prion-infizierten Mäusen der Stämme 22L (Spur 1-4), RML (Spur 5-8) und ME7 (Spur 9-12) inkubiert. Es ist der PrP^{Sc} Gehalt der 8. Passage nach PK-Verdau im Immunoblot gezeigt. Die di-, mono- und unglykosylierten Formen von PrP^{Sc} zeigen Signale bei 27-30, 24 und 19 kDa. Es wurde der PrP-4H11 AK verwendet.

Da es nur wenige Angaben in der Literatur über die PrP^C Verteilung in L929 Zellen gibt, wurde in diesem Teil der Arbeit ein Vergleich mit nicht-infizierten MHM2 Zellen (Klon 21) bezüglich der Oberflächenlokalisierung und der Verteilung in *Lipid Rafts* durchgeführt (Abb. 24). Das GPI-verankerte Protein PrP^C ist in *Lipid Rafts* lokalisiert und sollte daher durch eine Gradientenzentrifugation isolierbar sein (Abb. 24 A, B). Die jeweilige Zellprobe wurde mit unterschiedlich prozentigen Sucroselösungen überschichtet, welche nach der Zentrifugation (siehe 4.4.9) in umgekehrter Reihenfolge von oben nach unten wieder abgenommen wurden. Diese Fraktionen wurden im Immunoblot analysiert. Bei den L929 Zellen diente der *Lipid Raft* Marker, Caveolin, als Kontrolle. Bei den Versuchen mit MHM2 Zellen wurde GM1 als *Lipid Raft* Kontrollmarker verwendet, weil diese Zellen kein Caveolin exprimieren. Da GM1 ein sehr kleines Protein ist, wurde das Dot Blot Verfahren zur Detektion von GM1 verwendet. Sowohl in L929 als auch in MHM2 Zellen zeigt sich das PrP^C Signal hauptsächlich in den Fraktionen 4-6. Dies korreliert sowohl mit Caveolin als Marker, als auch mit GM1.

ERGEBNISSE

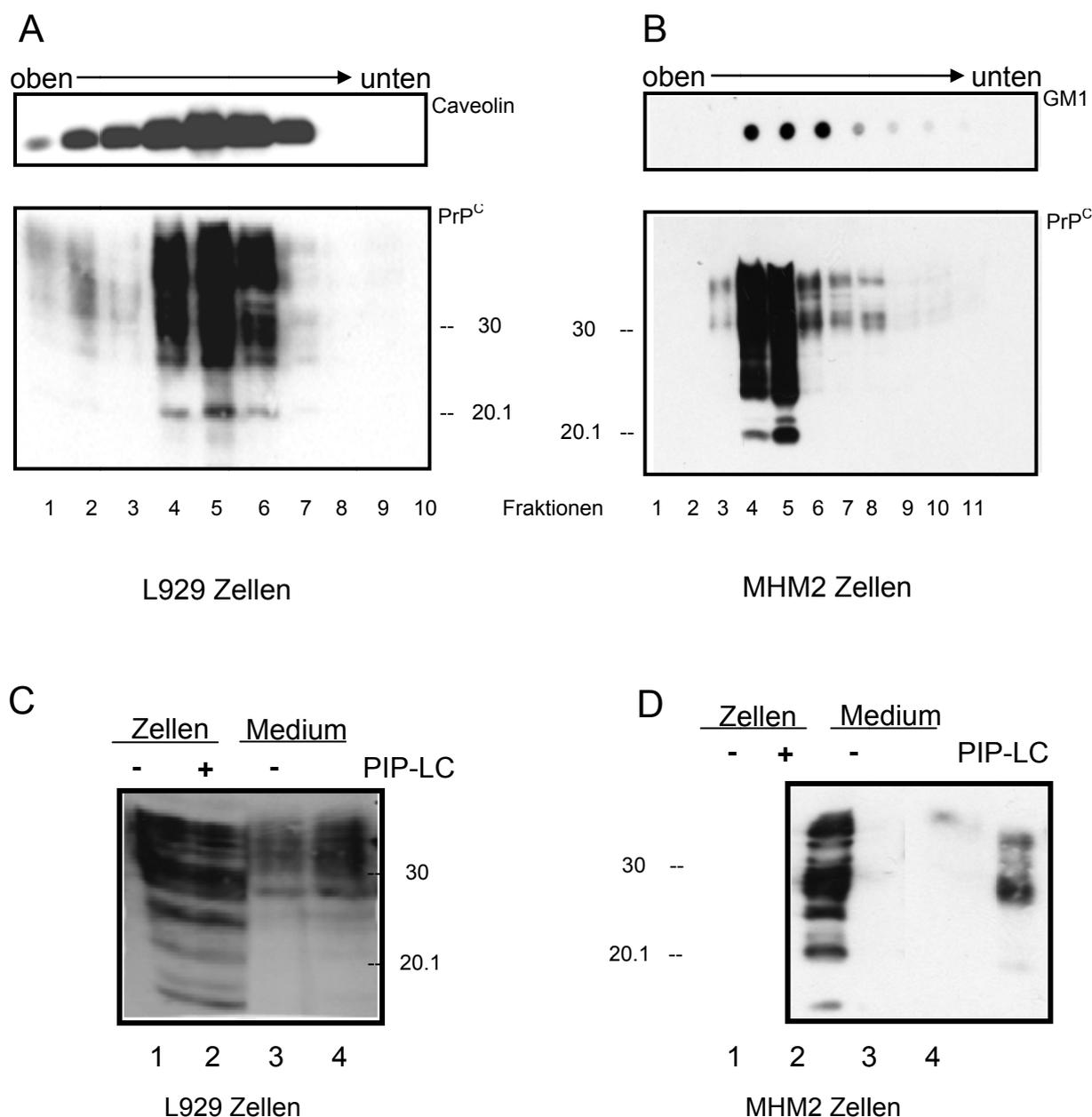


Abb. 24: PrP^C ist in L929 Zellen und neuronalen Zellen gleich verteilt. Aus L929 Zellen-15.9 (A, unten) und MHM2-K21 Zellen (B, unten) wurden *Lipid Rafts* mittels Gradientenzentrifugation isoliert. Die einzelnen Fraktionen wurden von oben bis zum Boden des Reaktionsgefäßes abgenommen und im Immunoblot mit anti-PrP AK 4H11 analysiert. Die Expression des *Lipid Raft* Markers in L929-15.9 Zellen wurde mit anti-Caveolin AK nachgewiesen (A, oben). In MHM2-K21 Zellen wurde GM1 als *Lipid Raft* Marker verwendet und im Dot Blot Verfahren und mittels HRP-gebundenem Choleratoxin Untereinheit B (CtxB) analysiert (B, oben). C) und D) Um PrP^C mittels PIP-LC Verdau von der Membran zu lösen, wurden die Zellen 4 h mit und ohne dem Enzym PIP-LC inkubiert. Daraufhin wurde die Mediumfraktion gesammelt, die Zellen lysiert und mit anti-PrP AK 4H11 im WB entwickelt. Positionen 1 und 2 in Abb. 24 C und D zeigen das PrP^C Signal der Zellen vor und nach PIP-LC Behandlung. Positionen 3 und 4 (Abb. 24 C, D) stellen die Mediumüberstände ohne und mit PIP-LC Verdau dar.

ERGEBNISSE

Die Oberflächen- und subzelluläre Lokalisierung von PrP^C wurde mittels PIP-LC Verdau untersucht, durch welchen GPI-verankerte Proteine von der Zelloberfläche abgelöst werden. Es wurde in mehreren unabhängigen Versuchen nachgewiesen, dass nach der PIP-LC Behandlung in den Zelllysaten der L929 Zellen weniger PrP^C nachweisbar ist als vor der Behandlung (Abb. 24 C). Diese Reduktion des PrP^C Signals ist jedoch in MHM2 Zellen wesentlich höher, so dass nach dem PIP-LC Verdau so gut wie kein PrP^C nachweisbar war (Abb. 24D, Spur 2). Aufgrund der vermehrten Ablösung des PrP^C durch den PIP-LC Verdau an der Zelloberfläche fand sich in der Mediumfraktion der MHM2 Zellen vermehrt PrP^C (Abb. 24D, Spur 4) im Gegensatz zur Mediumfraktion ohne PIP-LC Behandlung (Abb. 24D, Spur 3). Im unbehandelten Medium der L929 Zellen kann mehr PrP^C als im Medium der MHM2 Zellen (Abb. 24C/24D, Spur 3) nachgewiesen werden, was möglicherweise auf vermehrte Sekretion hinweisen könnte. Diese Hypothese kann bislang jedoch nicht mit veröffentlichten Ergebnissen bestätigt werden. Eigene vorläufige Daten zeigen vermehrt Exosomen in L929 Zellen im Vergleich zu MHM2 Zellen. Dies könnte vielleicht ein Hinweis auf vermehrte PrP^C Sekretion darstellen. Da sie Exosomenisolierung jedoch nur einmalig durchgeführt wurde, werden diese Daten nicht explizit gezeigt. Nach dem PIP-LC Verdau ist die Menge an PrP^C im Medium der L929 Zellen wie erwartet erhöht (Abb. 24C, Spur 4), jedoch nicht so stark wie in MHM2 Zellen. In den Zelllysaten der L929 Zellen zeigt sich eine geringe Verminderung des PrP^C Signals nach PIP-LC Zugabe (Abb. 24C, Spuren 1 und 2), was sich mit den Ergebnissen in der Mediumfraktion entspricht. Dies weist darauf hin, dass die PrP^C Verteilung an der Plasmamembran in den L929 Zellen der der MHM2 Zellen ähnelt (Abb. 24C/D). Das membrangebundene PrP^C der L929 Zellen scheint jedoch nicht vollständig von dem Enzym PIP-LC abgelöst werden zu können (Abb. 24C/D, Spur 2). Da das Enzym PIP-LC große Mengen an PrP^C in MHM2 Zellen ablösen kann, müsste das PrP^C hauptsächlich an der Zelloberfläche der MHM2 Zellen lokalisiert sein. Dagegen sezernieren L929 Zellen wohl mehr PrP^C ins Medium als MHM2 Zellen. Der Phosphoinositolphospholipase C gelingt es nur geringe Mengen das PrP^C von den Zelloberflächen abzuspalten, weshalb die Möglichkeit besteht, dass das zelluläre PrP^C vorwiegend innerhalb der L929 Zellen lokalisiert ist. Zusammenfassend kann man sagen, dass das PrP^C der L929 und MHM2 Zellen in

Lipid Rafts lokalisiert. Jedoch scheint die Verteilung des PrP^C innerhalb der Zellen unterschiedlich zu sein.

5.1.2 Veränderungen des Cholesterolmetabolismus beeinflussen die akute Infektion von verwendeten Säugerzellen

Versuche, in welchen Cholesterol aus Membranen extrahiert wurden, führten zu einem Herauslösen von Proteinen aus den *Raft*-Regionen (Cerneus *et al.*, 1993; Ledesma *et al.*, 1998; Scheiffele *et al.*, 1997). Es gibt Veröffentlichungen die zeigen, dass PrP^C und PrP^{Sc} mit DRMs assoziiert sind und vermutlich sowohl in der Funktion des PrP^C eine Rolle spielen als auch in der Konversion zu PrP^{Sc} (Mouillet-Richard *et al.*, 2000; Naslavsky *et al.*, 1999; Naslavsky *et al.*, 1997; Taraboulos *et al.*, 1995). Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass die PrP-Konversion in Zellkulturexperimenten eine Beteiligung der *Rafts* benötigt (Kaneko *et al.*, 1997; Vey *et al.*, 1996), was eine Erklärung dafür wäre, dass eine Extraktion von Cholesterol die PrP^{Sc} Akkumulierung in persistent infizierten Zellen unterbindet (Taraboulos *et al.*, 1995). Daher sollte in diesem Teil der Arbeit die Abhängigkeit der Prioninfektion von Cholesterol in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen getestet werden. Durch die Verwendung verschiedener Inhibitoren, die den zellulären Cholesterolgehalt verändern, sollten zudem mögliche Unterschiede zwischen akuter und persistenter Infektion unterschiedlicher Prionstämme untersucht werden.

Da die meisten veröffentlichten Inhibitorstudien in persistent infizierten N2a Zellen durchgeführt wurden, wurde in dieser Arbeit der MHM2 Klon K21 als Kontrollzelllinie verwendet. Diese neuronale Zelllinie ist jedoch nur mit 22L und RML infizierbar. Als Beispiel für eine nicht-neuronale Zelllinie diente der Subklon 15.9 der Fibroblasten L929. Diese Zellen sind mit den Prionstämmen 22L, RML und ME7 infizierbar. In Abbildung 25 wird der experimentelle Ablauf der akuten Infektion mit gleichzeitigem Einsatz der erwähnten Substanzen gezeigt. MHM2 Zellen (K21) wurden in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen, L929 Zellen (K15.9) in einer Konzentration von 1×10^5 ausgesät. Um eine Wirkung der verschiedenen Inhibitoren während einer akuten Infektion zu gewährleisten, wurden die Zellen nach 24 h für 3 h mit den Inhibitoren vorinkubiert. Die Infektion mit Hirnhomogenat (4.4.11) fand ebenfalls in

ERGEBNISSE

inhibitorhaltigem Medium statt. Nach 4 h wurde das Hirnhomogenat mit den Inhibitoren entfernt und die Zellen in Vollmedium weiter kultiviert (Abb. 25).

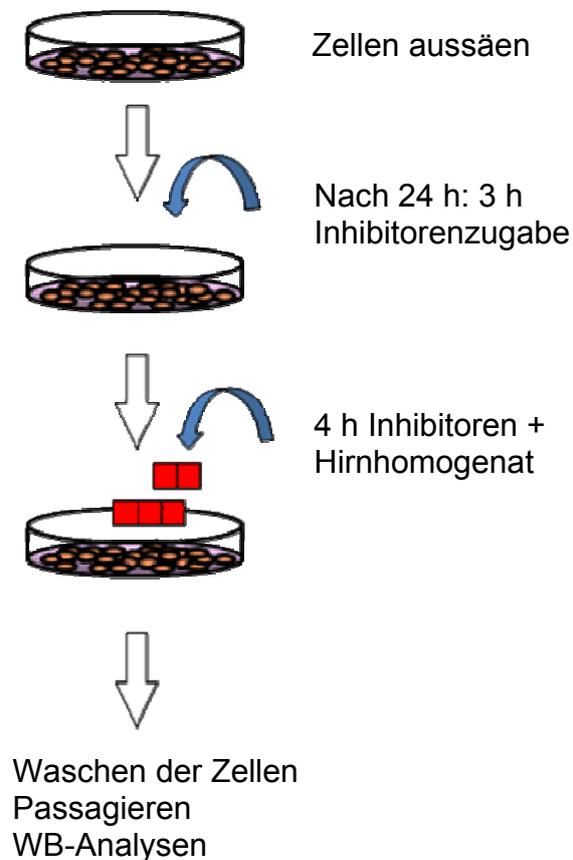


Abb. 25: Schematische Darstellung der Verwendung von chemischen Inhibitoren in Verbindung mit einer akuten Prioninfektion. Zellen werden 3 h mit Inhibitoren vorbehandelt. Nach einem Mediumwechsel werden die verwendeten Inhibitoren mit den jeweiligen Prionstämmen für 4 h inkubiert. Danach können die Zellen weiter passagiert und unterschiedliche Analysemethoden zur Kontrolle einer Neuinfektion durchgeführt werden.

Die Inkubationszeit des Hirnhomogenates konnte genauer eingegrenzt werden, da in einer vorausgegangenen Infektionskinetik in 3F3 transduzierten Hippocampus Zellen (Hpl3F4) mit 22L-Prionen bereits nach 3-5 h eine effiziente Infektion detektierbar war (Abb. 26). Die verwendeten Hpl3F4 Zellen wurden zuvor subkloniert und der hochempfindliche Klon11 generiert. Trotz Subklonierung blieben die Hpl3F4 Zellen nur für den Prionstamm 22L infizierbar und wurden daher in den weiteren Studien dieser Arbeit nicht verwendet. Da sich diese kurze Inkubationszeit des Hirnhomogenates jedoch auch in L929 und MHM2 Zellen als äußerst effektiv für eine akute sowie persistente Infektion herausgestellt hat, wurde ein Zeitfenster von 4 h für die folgenden Versuche beibehalten. Trotz der kurzen Inokulationszeit des

ERGEBNISSE

Hirnhomogenats konnte zudem eine persistente Infektion in diesen Zellen aufgezeigt werden.

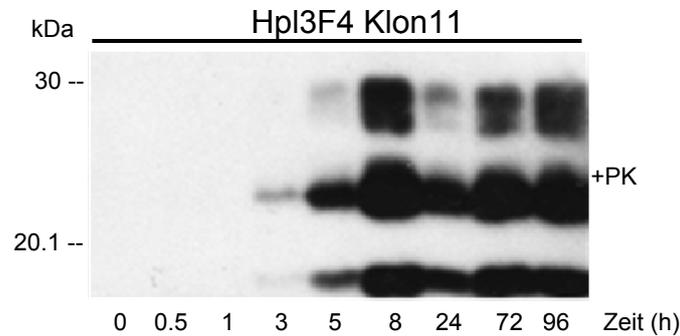


Abb. 26: Infektionskinetik des 22L-Prionstammes in 3F4 transduzierten Hpl Zellen (Klon11). Der Subklon K11 wurde in einer Zeitkinetik von 30 min bis 96 h mit 1%igem Hirnhomogenat von prion-infizierten Mäusen des 22L Stammes inkubiert. Es ist der PrP^{Sc} Gehalt der ersten Passage nach Inkubation des Hirnhomogenates (2. Passage) nach PK-Verdau gezeigt. Die di-, mono- und unglykosylierten Formen von PrP^{Sc} zeigen Signale bei 27-30, 24 und 19 kDa. Es wurde der PrP-3F4 AK verwendet.

Die Unterscheidung von neu synthetisiertem PrP^{Sc} und PrP^{Sc} Inokulum erfolgte in dieser Arbeit indirekt über die Passagendauer. Zudem konnte in eigenen Vorversuchen mit der Zelllinie L929 gezeigt werden (Daten werden nicht gezeigt), dass der Nachweis von *de novo* PrP^{Sc} erst nach 24 h möglich ist (Vorberg et al., 2004b). Der Nachweis von neu gebildetem PrP^{Sc} wurde in der ersten Passage nach der Neuinfektion gezeigt. Durch die vorangegangene Infektionskinetik mit neuronalen Hpl3F4 Zellen (Abb. 26), konnte nachgewiesen werden, dass bereits nach einer 3-4 stündigen Inokulation mit Hirnhomogenat, in der ersten Passage nach Neuinfektion (8 Tage, Passage 2) neu synthetisiertes PrP^{Sc} in den Zellen detektierbar war.

Die verwendeten Inhibitoren beeinflussen in unterschiedlicher Weise den Cholesterolgehalt der Zellmembran. Progesteron ist bekannt dafür, dass es u.a. die Cholesterolveresterung im rauhen ER unterbindet, und es so zu einer Veränderung der Lipidviskosität und der Protein-Lipid Interaktion kommt (Lange *et al.*, 1994, Bate *et al.*, 2008). Progesteron blockiert den intrazellulären Transport von Cholesterol, insbesondere den Transport vom endoplasmatischen Retikulum zu den Caveolae an der Plasmamembran (Sviridov *et al.*, 2001; Smart *et al.*, 1996). Filipin hat eine hohe Affinität zu Cholesterol und zerstört so die Struktur der Caveolae, wobei eine

ERGEBNISSE

Ansammlung von GPI-verankerten Proteinen verhindert wird (McGookey *et al.*, 1983; Bolard J., 1986; Rothberg *et al.*, 1992). Nystatin ist ein Antimykotikum, das in die Permeabilität der Lipidmembranen eingreift, indem es wie Filipin an Cholesterol bindet und so die Funktion der Caveolae inhibiert (Rothberg *et al.*, 1992; Marella *et al.*, 2002; Hac-Wydro *et al.*, 2007).

In den Experimenten dieser Arbeit führt Nystatin in L929 Zellen während der akuten Infektion zu einer Reduktion der Prioninfektion, wobei der stärkste Effekt bei Prionstamm ME7 zu erkennen ist. Bei Betrachtung der PrP^C Expression in akuter 22L-Infektion mit Nystatin weisen die L929 Zellen insgesamt mehr totales PrP auf. Dagegen hat Progesteron in L929 Zellen die gegenteilige Wirkung. Progesteron führt zu einer höheren PrP^{Sc} Akkumulierung während der akuten Infektion mit allen drei Stämmen ME7, 22L und RML. Filipin hat keinen signifikanten Einfluss auf die akute Infektion aller drei Prionstämme in L929 Zellen (Abb. 27). Die Ergebnisse der akuten Infektionen in L929 Zellen zeigen, dass die Wirkungsweisen der Inhibitoren auf eine Prionstammspezifität hindeuten.

ERGEBNISSE

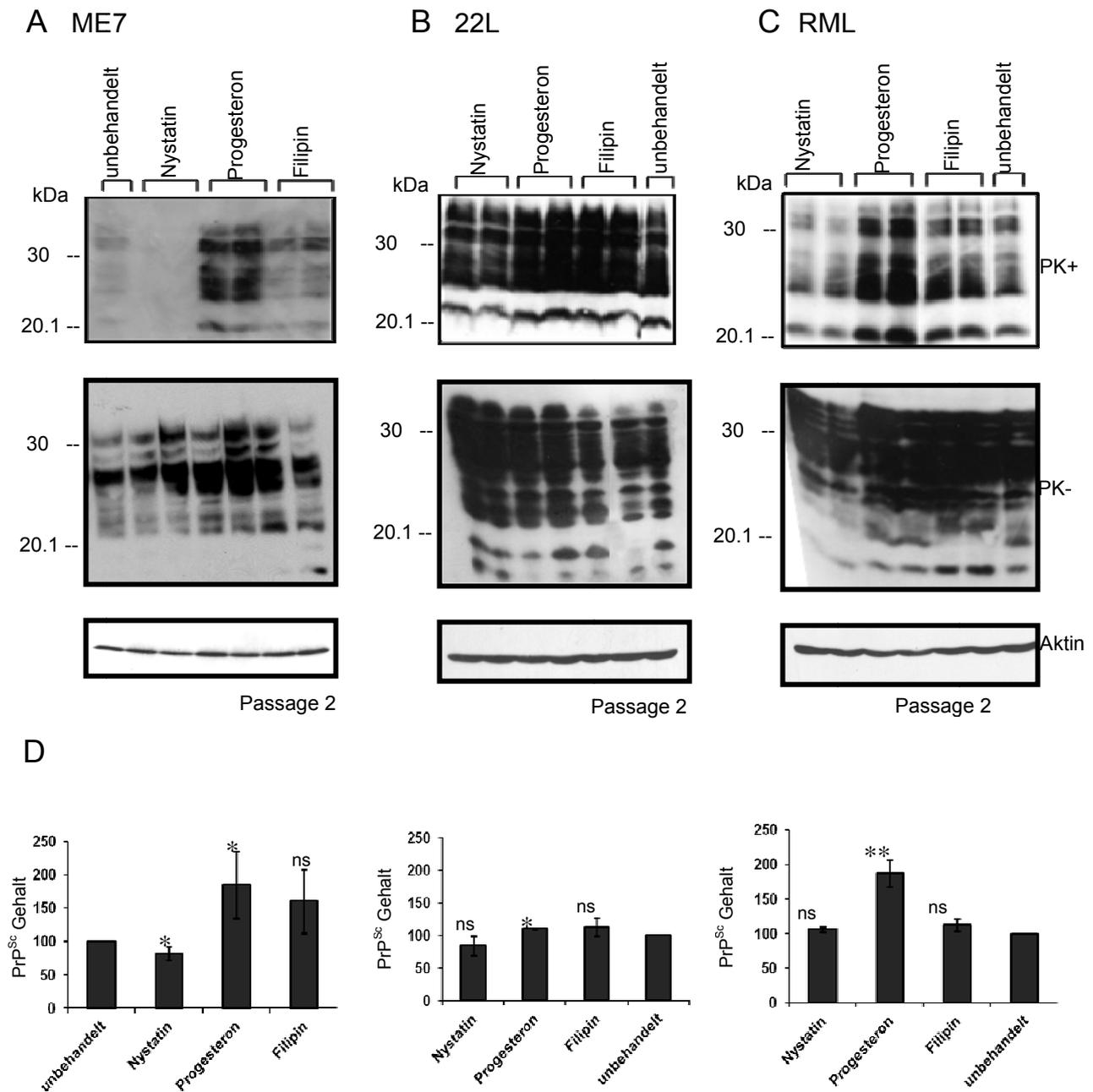


Abb. 27: PrP^{Sc} Gehalt in akut infizierten L929 Zellen (Klon 15.9). Zellen wurden mit Nystatin (25 µg/ml), Progesteron (10 µg/ml) und Filipin (5 µg/ml) für 3 h vorbehandelt und während der Infektionszeit von 4 h mit inkubiert (Abb. 25). Unbehandeltes Hirnhomogenat dient als Positivkontrolle und bezeichnet Zellen, die mit dem jeweiligen prion-infizierten Gehirn inkubiert wurden ohne Zugabe von Inhibitoren. Die Proteine wurden mit dem PrP-4H11 AK in der ersten Passage nach der Infektion (2. Passage) im Immunoblot detektiert. Neben PrP^{Sc} ist ebenfalls PrP^C abgebildet und als Ladungskontrolle diente die Detektion von Aktin. PrP^{Sc} Signal in L929 Zellen mit Inhibitorenzugabe und akuter Infektion mit ME7 (**A**), 22L (**B**) und RML (**C**). **D**) Die PrP^{Sc} Signale, der mit Inhibitoren behandelten L929 Zellen (Nystatin, Progesteron, Filipin), werden als PrP^{Sc} Gehalt in % dargestellt und repräsentieren den Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten (n=2, Doppelansatz). Die statistische Auswertung erfolgte mittels „paired t-test“, wobei die Menge an gemessenen PrP^{Sc} in Relation zur Kontrolle (unbehandelt) gestellt wurde, die immer auf 100% gesetzt wurde (p-Werte: * = p<0.05, ** = p<0.01, ns = nicht signifikant).

ERGEBNISSE

Während der akuten 22L-Infektion der MHM2 Zellen weist Nystatin keine Wirkung auf. Im Gegensatz dazu führt die Gabe des Antimykotikums zu einer völligen Blockierung der RML-Infektion. Daher scheint Nystatin auch bei der akuten Infektion der MHM2 Zellen eine stammspezifische Wirkung aufzuzeigen. Nystatin wirkt daher sowohl in L929 als auch in MHM2 Zellen inhibierend auf die PrP^{Sc} Bildung. Jedoch zeigt sich die Blockierung der PrP^{Sc} Akkumulierung in L929 Zellen nur im Falle der ME7 Infektion und in MHM2 Zellen nur während der akuten RML Infektion. Progesteron inhibiert die PrP^{Sc} Bildung während der akuten 22L-Infektion, jedoch ist diese Wirkung während der RML-Infektion der MHM2 Zellen nicht signifikant. Interessanterweise akkumuliert PrP^{Sc} in L929 Zellen bei der Zugabe von Progesteron, während in MHM2 Zellen die Bildung von PrP^{Sc} sehr stark abnimmt (Abb. 27C, 28C). Diese Zellspezifität zeigt sich bei der Betrachtung der Ergebnisse nur nach Behandlung mit Progesteron in der Phase der akuten Infektion. Insgesamt betrachtet zeigt Filipin keine größeren Effekte bezüglich der PrP^{Sc} Akkumulierung während akuter Infektionen (Abb. 28).

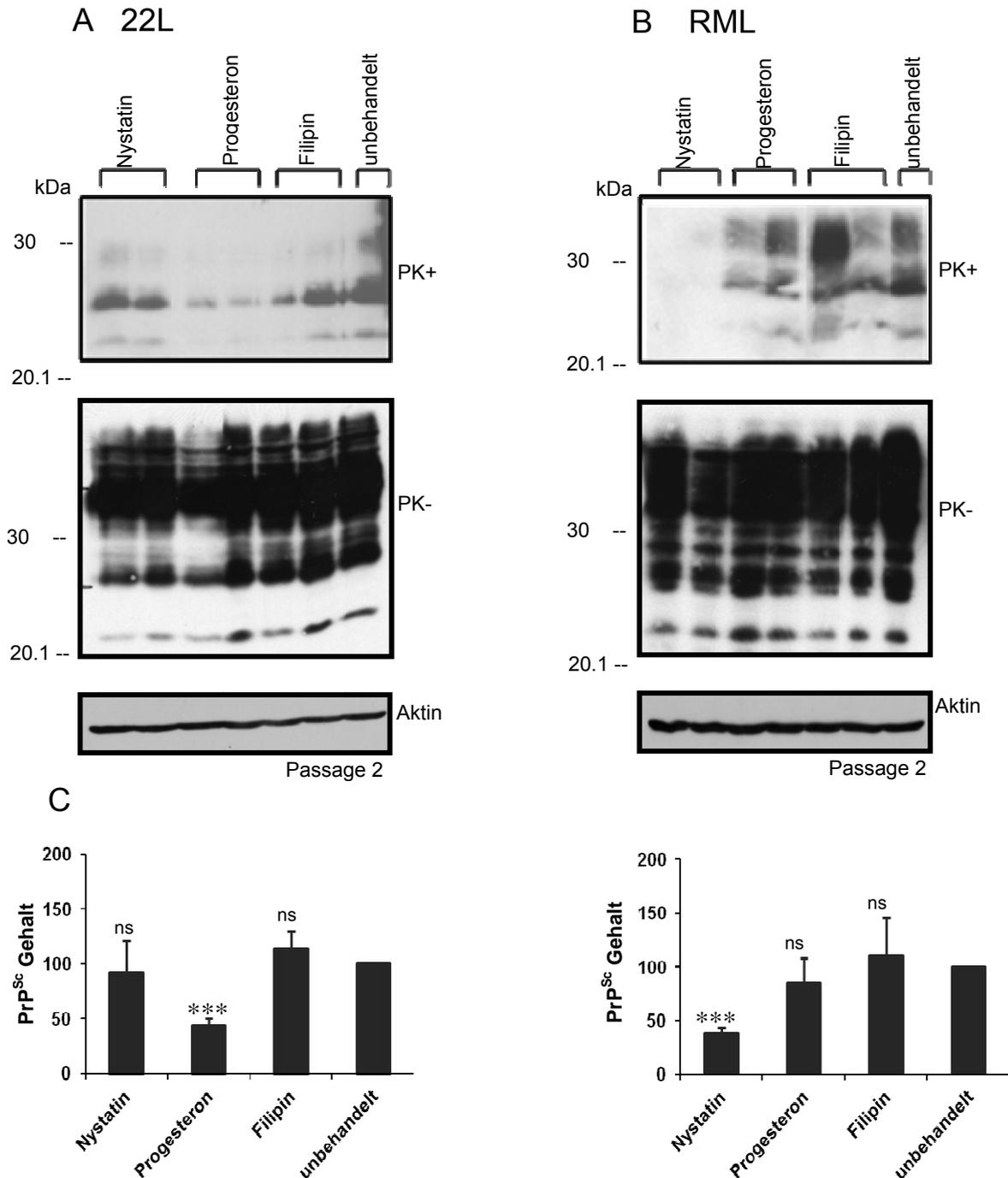


Abb. 28: PrP^{Sc} Gehalt in akut infizierten MHM2-K21 Zellen. Zellen wurden mit Nystatin (25 µg/ml), Progesteron (10 µg/ml) und Filipin (5 µg/ml) für 3 h vorbehandelt und weiterhin zusammen mit dem Hirnhomogenat während der Infektionszeit von 4 h inkubiert (Abb. 25). Die unbehandelte Probe bezeichnet mit dem jeweiligen Prionstamm akut infizierte Zellen ohne Zugabe von Inhibitoren, welche als Positivkontrolle dienen. Die Proteine wurden mit dem PrP-4H11 AK in Immunoblot detektiert. Neben PrP^{Sc} ist ebenfalls PrP^C abgebildet und als Ladungskontrolle diente die Detektion von Aktin. PrP^{Sc} Signal in MHM2 Zellen mit Inhibitorzugabe und akuter Infektion mit 22L (**A**) und RML (**B**). **C** Die PrP^{Sc} Signale, der mit Inhibitoren behandelten MHM2 Zellen (Nystatin, Progesteron, Filipin), werden als PrP^{Sc} Gehalt in % dargestellt und repräsentieren den Mittelwert von zwei unabhängigen

ERGEBNISSE

Experimenten (n=2, Doppelansatz). Die statistische Auswertung erfolgte mittels „paired t-test“, wobei die Menge an gemessenen PrP^{Sc} in Relation zur Kontrolle (unbehandelt) gestellt wurde, die immer auf 100% gesetzt wurde (p-Werte: *** = p<0.001, ns = nicht signifikant).

Es ist bekannt, dass Filipin in N2a Zellen die PrP^C-Endozytose hemmt und es zu einer Sekretion von PrP^C führt (Marella *et al.*, 2002). Um diesen Effekt in L929 Zellen zu untersuchen, wurde in einer Immunfluoreszenz PrP in L929-3F4 Zellen angefärbt und mögliche Veränderungen an der Oberfläche bzw. intrazellulär nach der Zugabe der verwendeten Substanzen beobachtet (Abb. 29). Um eine Oberflächenfärbung darstellen zu können, mussten die Zellen bereits vor der Fixierung mit einem Anti-PrP Antikörper angefärbt werden. Im Gegensatz zur intrazellulären Färbung, bei welcher die Zellen direkt fixiert werden und anschließend mit einem Anti-PrP Antikörper inkubiert werden. Aus diesem Grund wurden zwei Färbungen durchgeführt. Da L929 Zellen nur eine sehr geringe Menge an PrP^C exprimieren, wurden die L929 Zellen zuvor mit dem 3F4-Epitop transduziert, um in der Immunfluoreszenz eine deutliche PrP^C Färbung der Zellen erreichen zu können. Da es sich hierbei um ein semiquantitatives Verfahren handelt, kann lediglich eine Aussage über die Oberflächen- sowie intrazellulären Verteilung des PrP^C der L929-3F4 Zellen nach Zugabe der Inhibitoren gemacht werden. Die Kernfärbung dient in diesem Fall der deutlicheren Darstellung der einzelnen Zellen. Die Oberflächen- und intrazelluläre Expression von 3F4-PrP ist in L929-3F4 Zellen zeigt nach der Inkubation mit den Inhibitoren Nystation, Progesteron und Filipin keine Veränderungen.

ERGEBNISSE

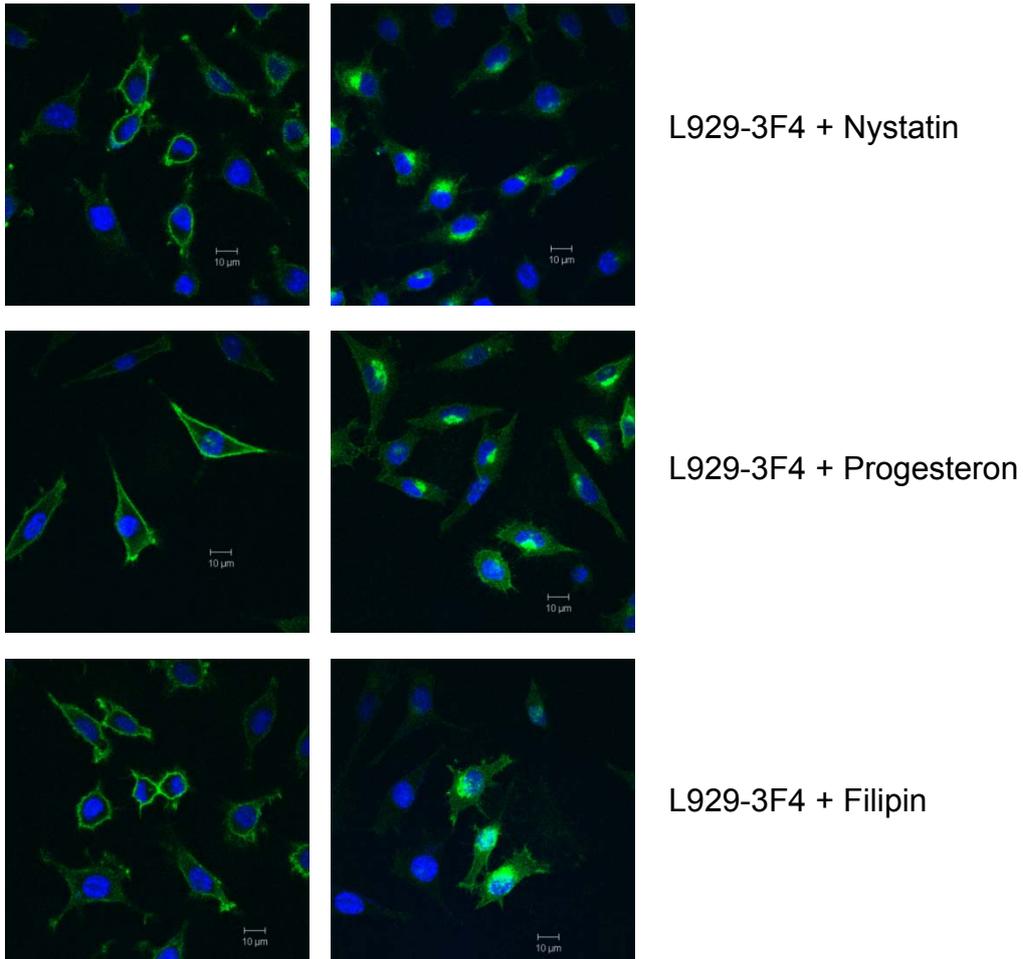


Abb. 29: Die Oberflächenexpression von 3F4-PrP ist in L929-3F4 Zellen durch die Inkubation mit den verwendeten Inhibitoren nicht verändert. L929 Zellen, die zuvor mit dem 3F4-Epitop transduziert wurden, wurden fixiert und mit dem PrP-3F4 Antikörper angefärbt (grün). Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt (blau). Es wurde eine Immunfluoreszenz durchgeführt und die Proben mittels konfokaler Mikroskopie analysiert.

5.1.3 Einfluss von Inhibitoren auf die persistente Infektion

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung cholesterol-interagierender Inhibitoren auf PrP^{Sc} in persistent infizierten L929 und ScMHM2 Zellen. Hierbei sollte insbesondere auf Veränderungen der PrP^{Sc} Menge der verschiedenen Prionstämme geachtet werden, da die Verwendung der Inhibitoren in persistent infizierten Zellen die Bildung von PrP^{Sc} unterbinden kann (Marella *et al.*, 2002). In Abbildung 29 ist der experimentelle Ablauf der Inhibitorbehandlung persistent infizierter Zellen bildlich dargestellt. Mit den Prionstämmen 22L, RML, ME7 persistent infizierte L929 Zellen und 22L und RML persistent infizierte ScMHM2 Zellen wurden vor dem Aussäen auf die PrP^{Sc} Akkumulierung im WB getestet. Daraufhin wurden die Zellen mit Nystatin, Filipin und Progesteron über einen Zeitraum von vier Tagen behandelt (siehe 3.3). Nach diesem Zeitraum wurden die Zellen lysiert und auf eine mögliche Änderung des PrP^{Sc} Gehalts hin analysiert.

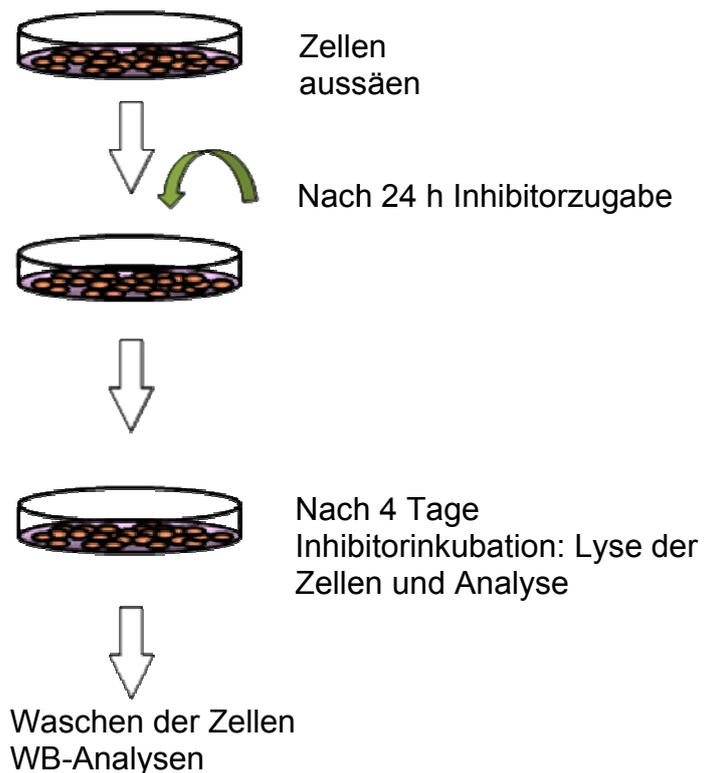


Abb. 30: Schematische Darstellung der Verwendung von chemischen Inhibitoren in Verbindung mit einer persistenten Prioninfektion. Zellen werden ausgesät und nach 24 h mit Inhibitoren vier Tage behandelt. Danach werden die Zellen bezüglich des PrP^{Sc} Gehalts analysiert.

Während die RML-PrP^{Sc} Akkumulierung durch die Inkubation von Nystatin in L929 Zellen noch verstärkt wird, wird in 22L-infizierten L929 Zellen kaum eine Wirkung bezüglich der PrP^{Sc} Anreicherung erreicht (Abb. 31 C, B). Dagegen wird die PrP^{Sc} Akkumulierung in der ME7-Infektion fast völlig unterbunden (Abb. 31 A). Filipin hat eine inhibierende Wirkung auf PrP^{Sc} Anhäufung von 22L-Prionen, jedoch kaum einen Effekt auf die Akkumulierung von ME7-PrP^{Sc} (Abb. 31 B, A). RML-infizierte L929 Zellen weisen im Gegensatz dazu eine enorm erhöhte PrP^{Sc} Akkumulierung bei einer Inkubation mit Filipin auf (Abb. 31 C). Progesteron zeigt keine inhibierende Wirkung auf die PrP^{Sc} Anreicherung der drei Prionstämme in L929 Zellen.

Nystatin hat keine effiziente Wirkung auf 22L-infizierte ScMHM2 Zellen, führt jedoch zu einer höheren PrP^{Sc} Menge in RML-infizierten ScMHM2 Zellen. Filipin dagegen unterbindet die PrP^{Sc} Akkumulierung in RML-infizierten ScMHM2 Zellen sehr deutlich, wobei kein Effekt in 22L-infizierten Zellen zu erkennen ist (Abb. 32). Progesteron inhibiert sowohl in 22L- als auch in RML-infizierten ScMHM2 Zellen die PrP^{Sc} Akkumulierung äußerst effektiv. Insgesamt scheint allgemein die 22L-Infektion weniger sensitiv auf die Veränderung des Cholesterols durch die verwendeten Substanzen zu reagieren. Die Daten der persistenten Infektionen weisen darauf hin, dass die inhibitorischen Effekte prionstamm-spezifisch sein können. Insbesondere wird die prionstamm-spezifische Wirkung nach der Zugabe von Nystatin in persistent infizierten L929 Zellen deutlich. Durch Inkubation mit Progesteron kann keine Abnahme des PrP^{Sc} Signals in L929 Zellen beobachtet werden. Jedoch unterbindet Progesteron in infizierten ScMHM2 Zellen eine PrP^{Sc} Akkumulierung nahezu vollständig (Abb. 31, 32). Diese Experimente gaben Hinweise darauf, dass die Inhibitoren ebenfalls zelltypabhängige Wirkungen haben können. Die neuronale Zelllinie scheint hierbei generell anfälliger für Veränderungen des Cholesterols zu sein.

ERGEBNISSE

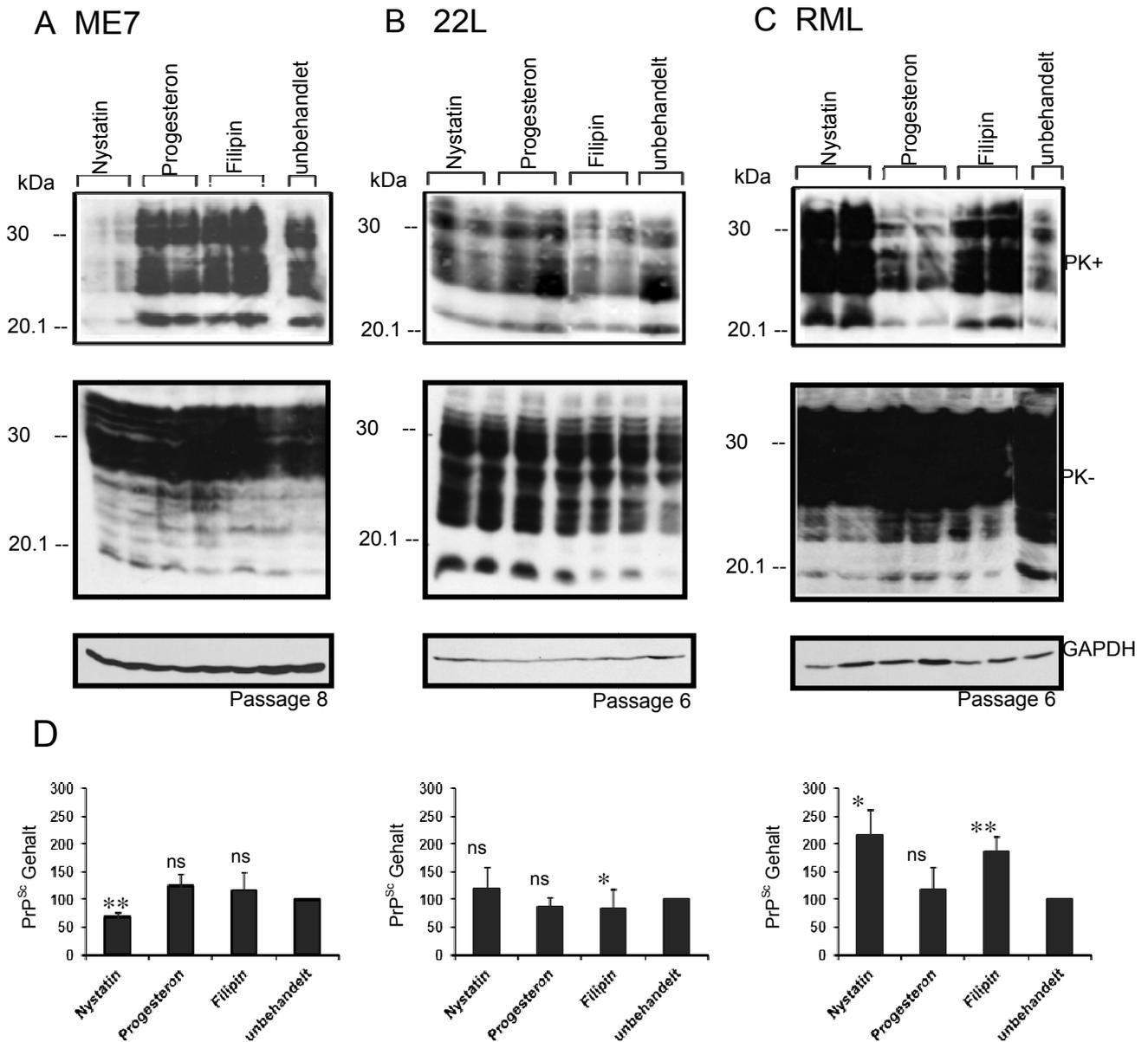


Abb. 31: PrP^{Sc} Gehalt in persistent infizierten L929 Zellen (Klon 15.9). Zellen wurden mit Nystatin (25 µg/ml), Progesteron (10 µg/ml) und Filipin (5 µg/ml) für einen Zeitraum von 4 Tagen behandelt. „Unbehandelt“ bezeichnet mit dem jeweiligen Prionstamm infizierte Zellen ohne Zugabe von Inhibitoren, welche als Positivkontrolle dienen. Die Proteine wurden mit dem PrP-4H11 AK in der 6. und 8. Passage nach der Infektion im Immunoblot detektiert. Als Ladungskontrolle diente die Detektion von GAPDH. PrP^{Sc} und PrP^C Signal in L929 Zellen nach Inhibitorenzugabe und Infektion mit ME7 (A), 22L (B) und RML (C). D) Die PrP^{Sc} Signale, der mit Inhibitoren behandelten L929 Zellen (Nystatin, Progesteron, Filipin), werden als PrP^{Sc} Gehalt in % dargestellt und repräsentieren den Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten (n=2, Doppelansatz). Die statistische Auswertung erfolgte mittels „paired t-test“, wobei die Menge an gemessenen PrP^{Sc} in Relation zur Kontrolle (unbehandelt) gestellt wurde, die immer auf 100% gesetzt wurde (p-Werte: * = p<0.05, ** = p<0.01, ns = nicht signifikant).

ERGEBNISSE

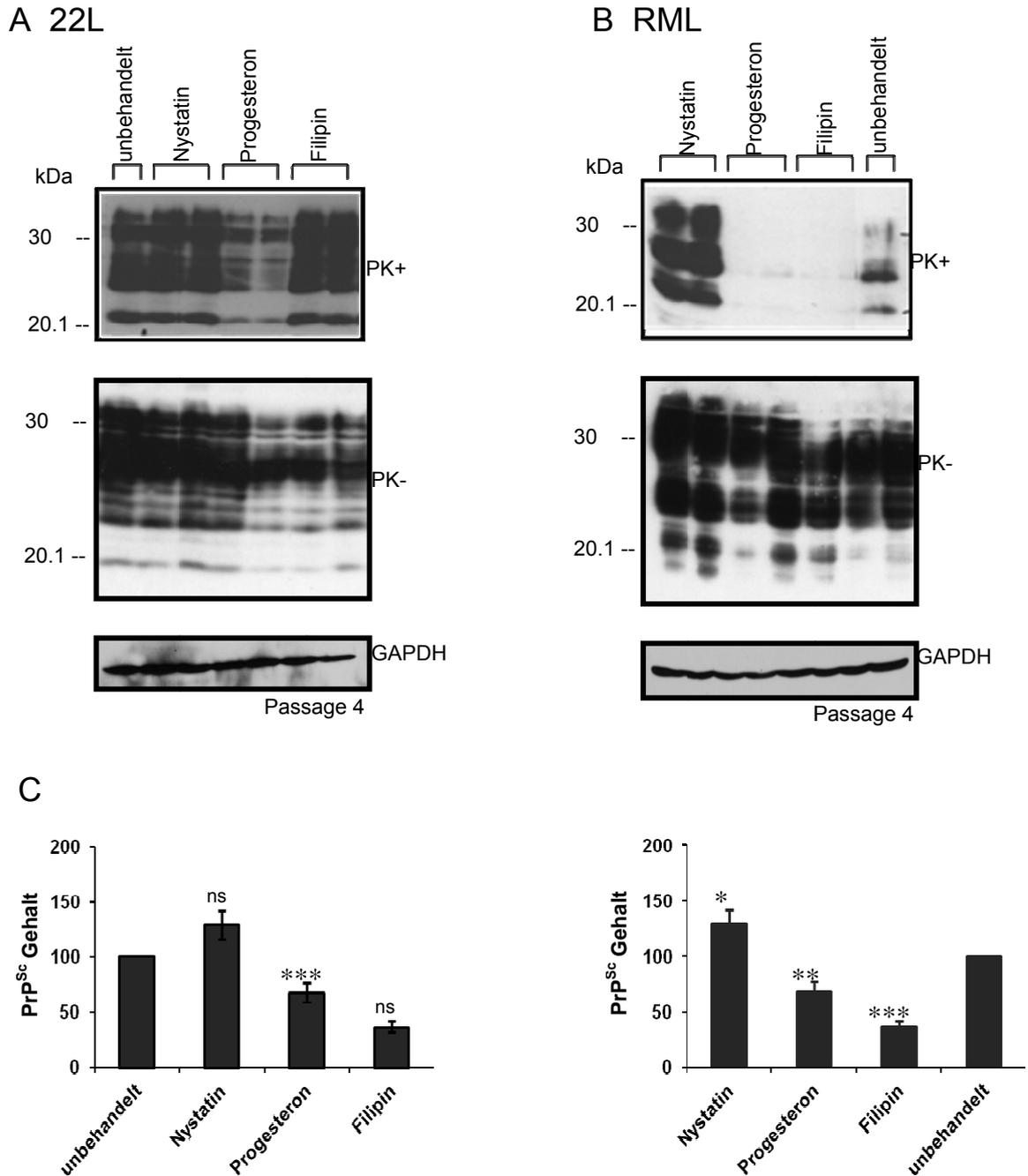


Abb. 32: PrP^{Sc} Gehalt in persistent infizierten ScMHM2 Zellen (K21). Zellen wurden mit Nystatin (25 µg/ml), Progesteron (10 µg/ml) und Filipin (5 µg/ml) 4 Tage behandelt. Mock bezeichnet mit dem jeweiligen Prionstamm infizierte Zellen ohne Zugabe von Inhibitoren, welche als Positivkontrolle dienen. Die Proteine wurden mit dem PrP-4H11 AK in der 4. Passage im Immunoblot detektiert. Als Ladungskontrolle diente die Detektion von GAPDH. PrP^{Sc} und PrP^C Signal in ScMHM2 Zellen nach Inhibitorenzugabe und persistenter Infektion mit 22L (A) und RML (B). C) Die PrP^{Sc} Signale, der mit Inhibitoren behandelten ScMHM2 Zellen (Nystatin, Progesteron, Filipin), werden als PrP^{Sc} Gehalt in % dargestellt und repräsentieren den Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten (n=2, Doppelansatz). Die statistische Auswertung erfolgte mittels „paired t-test“, wobei die Menge an gemessenen PrP^{Sc} in Relation zur Kontrolle (unbehandelt) gestellt wurde, die immer auf 100% gesetzt wurde (p-Werte: * = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001, ns = nicht signifikant).

Vergleicht man nun die persistente mit der akuten Infektion, kann folgendes festgestellt werden. In L929 Zellen scheint eine persistente oder akute 22L-Infektion nicht besonders anfällig auf Veränderungen von Cholesterol zu sein (Tabelle 8). Auffällig ist, dass die Wirkung von Progesteron in L929 Zellen bezüglich akuter und persistenter RML-Infektion immer gegenteilig zu sein scheint. Das heißt, dass Progesteron beispielsweise eine PrP^{Sc} Akkumulierung während einer akuten RML-Infektion begünstigt, jedoch keine signifikanten Effekte auf persistent RML-infizierte L929 Zellen hat (Abb. 27 C, 31 C). Dieser Effekt zeigt sich ebenso in 22L- und ME7-Infektionen der L929 Zellen (Abb. 27 A, B; 31 A, B). ME7-Infektionen, akut und persistent, werden mittels Nystatin inhibiert. Dagegen führt Progesteron zu einer vermehrten PrP^{Sc} Akkumulierung in der akuten ME7-Infektion, wobei persistent kaum eine Wirkung vorhanden ist (Abb. 27 C, 31 C). Wie schon erwähnt, reagieren die verwendeten neuronalen Zellen sensitiver auf die jeweilige Veränderung des Cholesterols. Die verwendeten Substanzen haben sowohl in persistent 22L-infizierten ScMHM2 Zellen als auch in akut 22L-infizierten MHM2 Zellen eine vergleichbare Wirkung. Interessanterweise zeigen jedoch auch die MHM2 Zellen, wie die L929 Zellen, bei der RML-Infektion gegenteilige Effekte, je nach Art der Infektion. Nystatin inhibiert beispielsweise die akute RML-Infektion in MHM2 Zellen so gut wie vollständig, unterstützt dagegen die PrP^{Sc} Akkumulierung in der persistenten RML-Infektion in ScMHM2 Zellen (Abb. 28 C, 32 C; Tabelle 8).

Durch diese Versuche können verschiedene Aussagen über persistente und akute Infektionen sowie über stammspezifische und zellartspezifische Phänomene gemacht werden. Mit Hilfe der verwendeten cholesterol-reduzierenden Substanzen, die die *Lipid Raft* Strukturen innerhalb der Plasamembran auf unterschiedliche Arten manipulieren, könnte man vermuten, dass verschiedene Endozytosewege wichtig für die Etablierung einer persistenten Infektion sein können. Diese Erkenntnisse zeigen nicht nur die Relevanz solcher Inhibitorientests auf, sondern machen zudem deutlich, dass die Erforschung der Zellbiologie der Prioninfektion essentiell für das Verständnis des Zusammenspiels zwischen Zellen und verschiedenen Prionstämmen ist.

ERGEBNISSE

	PrP ^{Sc} Gehalt									
	MHM2 K21				L929 K15.9					
Substanz	22L		RML		ME7		22L		RML	
	akut	pers	akut	pers	akut	pers	akut	pers	akut	pers
Nystatin	=	=	-	+	-	-	=	=	=	+
Progesteron	-	-	=	-	+	=	+	=	+	=
Filipin	=	=	=	-	=	=	=	-	=	+

Tabelle 8: Zusammenfassende Tabelle der inhibitorischen Effekte der in Abb. 26, 27, 30 und 31 gezeigten PrP^{Sc} Levels. Vergleich des PrP^{Sc} Gehalts der MHM2 und L929 Zellen während akuter und persistenter Infektion bei Verwendung unterschiedlicher Inhibitoren. + (mehr PrP^{Sc} als Kontrollzellen) und – (weniger PrP^{Sc} als Kontrollzellen) zeigen die PrP^{Sc} Menge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an, wobei = in etwa den PrP^{Sc} Gehalt der Kontrollzellen (unbehandelt) entspricht.

5.2 Charakterisierung Endozytoseprotein-defizienter und Rabprotein-defizienter L929 Zellen während der akuten Infektion mit verschiedenen Maus-adaptierten Prionstämmen

5.2.1 Wichtige Proteine der Internalisierungsprozesse und intrazellulären Transportwege

Da aufgrund vorangegangener Ergebnisse (5.1.2, 5.1.3), verschiedene Endozytosewege zur Etablierung einer Prioninfektion essentiell zu sein scheinen, wurden in einem weiteren Teil dieser Arbeit die Auswirkungen auf die PrP^{Sc} Menge in den nicht-neuronalen L929 Zellen durch die Manipulation des Rab-abhängigen Vesikeltransports untersucht. Da einzelne pharmakologische Substanzen ein relativ großes Wirkungsspektrum besitzen können und teilweise unspezifische Reaktionen hervorrufen können, wurde zudem durch transiente siRNA-Transfektion die Expression bestimmter Rabproteine in L929 Zellen erniedrigt. Da Rabproteine mit speziellen Vesikeln des endozytotischen Prozesses assoziiert sind (2.3), ist es wahrscheinlich, dass sie ebenfalls am intrazellulären PrP-Transport beteiligt sind. Aus diesem Grund könnten durch eine funktionelle Inhibierung mittels siRNA zellbiologisch bestimmende Faktoren definiert werden. Diese sind möglicherweise Zelltyp- und/oder Prionstamm-spezifisch bei der Etablierung einer Prioninfektion beteiligt.

Da *Lipid Rafts* bei der Endozytose des PrP möglicherweise eine Rolle spielen, wurde deshalb auch die Funktion der Endozytoseproteine Clathrin und Caveolin, welche direkt an der Zellmembran bei der Internalisierung von Substanzen wirken, mittels siRNA-Transfektion in dieser Arbeit näher untersucht. Der weitere Transport zwischen bestimmten Zellorganellen und Vesikeln ist streng durch Rab-GTPasen reguliert (2.3.1; Abb. 33). Diese über Rabproteine regulierten Bereiche des zellulären Transports sollten in dieser Arbeit bezüglich akuter Infektionen mit unterschiedlichen Prionstämmen untersucht und mögliche Unterschiede definiert werden. Es wurden bereits Studien in persistent infizierten Zellen und bei der akuten Aufnahme von PrP^{Sc} durchgeführt, in denen die Expression von diversen Rabproteinen manipuliert

wurden (Béranger *et al.*, 2002; Magalhaes *et al.*, 2005; Zafar *et al.*, 2011; Gilch *et al.*, 2009). In diesen Versuchen wurden unterschiedliche Zelllinien verwendet und verschiedene Rabproteine (wie Rab4, 7 und 9) betrachtet. Die Experimente führten zu Veränderungen in der PrP^{Sc} Aufnahme und Akkumulierung (6.6). Des Weiteren konnte eine direkte Interaktion von Rab7 und Rab11 mit PrP^C nachgewiesen werden (Massignan *et al.*, 2010; Zafar *et al.*, 2011).

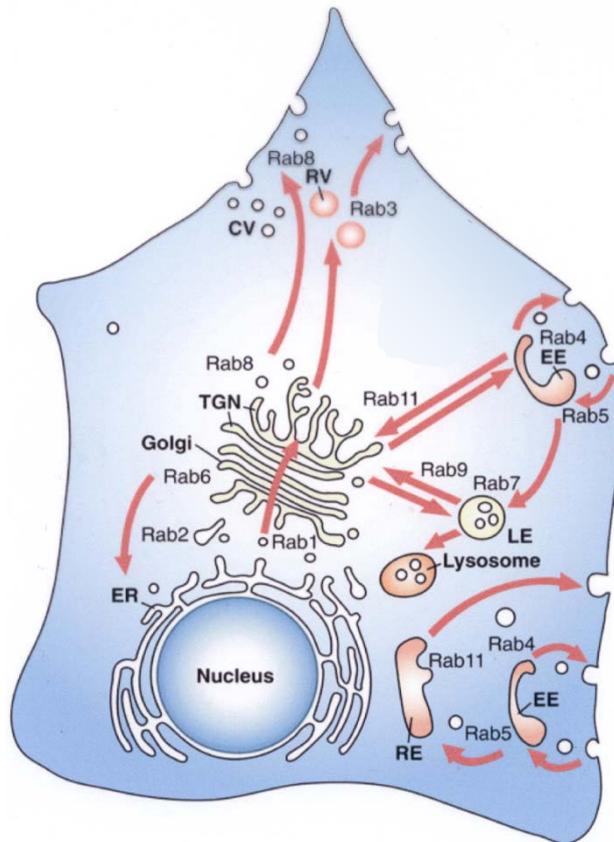


Abb. 33: Intrazellulärer Vesikeltransport ausgewählter Rab-GTPasen vom endoplasmatischen Retikulum (ER) über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche. Moleküle können zum einen in konstitutive, sekretorische Vesikel (*constitutive secretory vesicles*, CV), zum anderen in regulatorische, sekretorische Vesikel (*regulated secretory vesicles*, RV) transportiert werden. Extrazelluläre Partikel werden in frühen Endosomen (*early endosomes*, EE) aufgenommen und können entweder direkt zurück zur Zelloberfläche transportiert werden oder über Recycling Endosomen (RE) zurück zur Zelloberfläche gelangen. Die endozytierten Partikel können zu späten Endosomen (*late endosomes*, LE) und Lysosomen weitertransportiert werden. Die Lokalisierung ausgewählter Rabproteine ist in den jeweils spezifischen Membrankompartimenten dargestellt (entnommen aus Stenmark & Olkkonen, 2001 und modifiziert).

5.2.2 Transiente Transfektion von L929 Zellen mittels siRNA gegen diverse Endozytoseprotein- und Rabprotein-Gene

Zur Feststellung einer möglichen Ko-Lokalisierung von PrP^C mit unterschiedlichen Rabproteinen, wurde in dem folgenden Immunofluoreszenzversuch PrP^C zusammen mit den frühen und späten Endosomen sowie dem Recyclingsystem untersucht. Die verwendeten L929 Zellen wurden mit dem 3F4-Epitop transduziert, um die ursprüngliche geringe PrP^C Expression der L929 Zellen besser nachweisen zu können. L929-3F4 Zellen wurden mit GFP-Vektoren, die für ein Rab4-, Rab9- und Rab11-GFP Fusionsprotein kodieren, transfiziert und nach 24 h fixiert. PrP^C wurde mit dem 3F4-PrP Antikörper und einem sekundären Cy3-Antikörper (Abb. 34) angefärbt. Die Immunofluoreszenzdaten zeigen, dass das PrP^C sowohl randständig an der Zellmembran als auch intrazellulär stark exprimiert wird (zweite Spalte, rot). Die jeweiligen GFP-Fusionsproteine der verschiedenen Rabproteine sind innerhalb des Zytoplasmas lokalisiert (erste Spalte, grün). Eine gelbe Färbung bestimmter Regionen in der Zelle spricht für eine Überlappung von PrP^C und den GFP-markierten Rabproteinen und indiziert eine mögliche Ko-Lokalisierung in diesen Bereichen (dritte Spalte). Hier konnte eine Ko-Lokalisierung von zellulärem PrP mit frühen, Rab4-positiven Endosomen (Reihe 1), späten, Rab9-positiven Endosomen (Reihe 2) und Rab11-positiven Recycling Endosomen (Reihe 3), in L929 Zellen dargestellt werden.

ERGEBNISSE

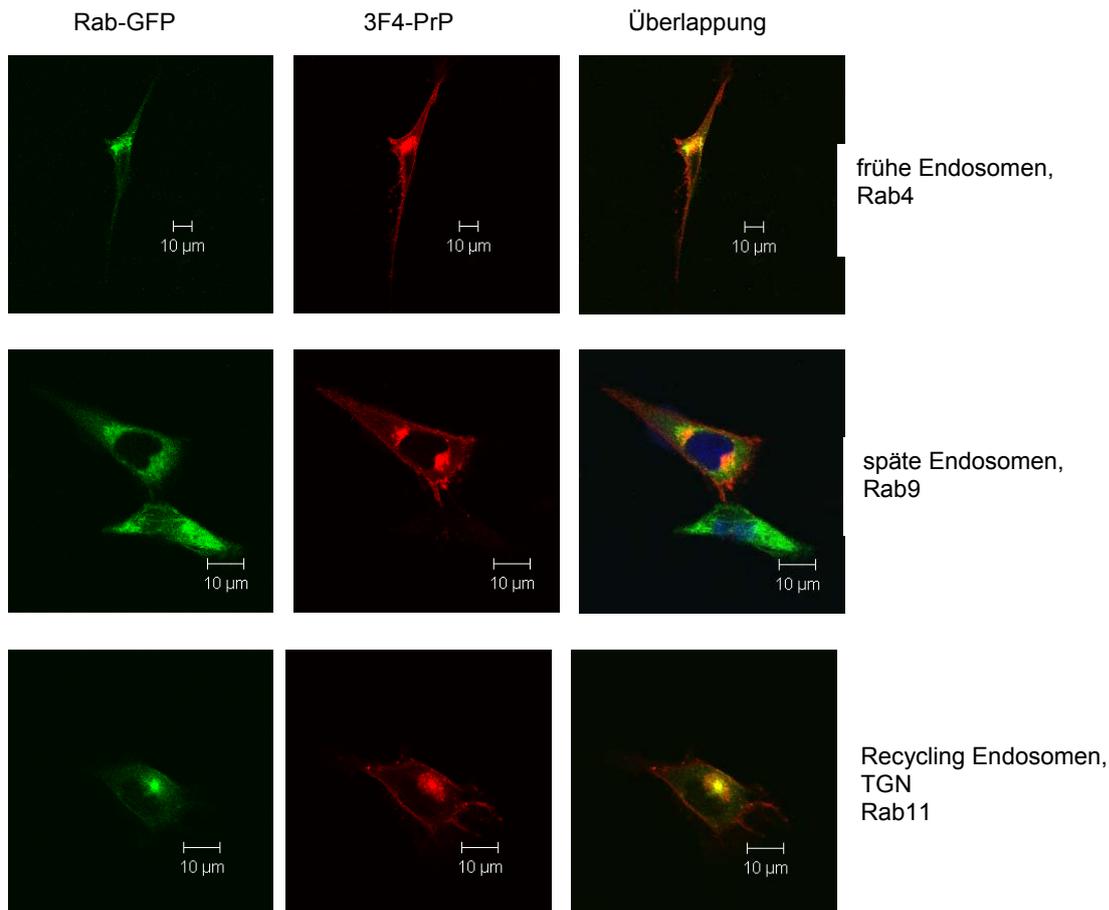
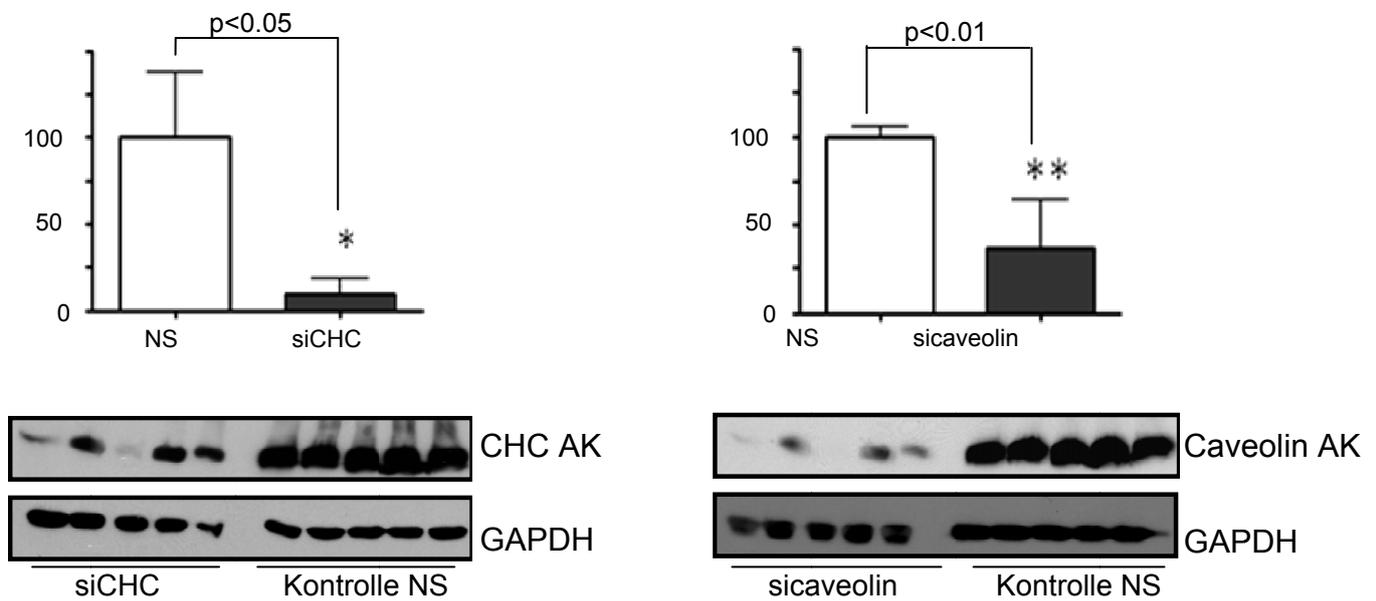


Abb. 34: Ko-Lokalisierung von PrP^C und diversen Rabproteinen in L929-3F4 Zellen. Die Zellen wurden mit Plasmiden, die für Rab4-GFP (obere Reihe, grün), Rab9-GFP (mittlere Reihe, grün) und Rab11-GFP (untere Reihe, grün) kodieren, transfiziert und nach 24 h fixiert. Das PrP der uninfizierten L929-3F4 Zellen wurden mit dem 3F4-PrP primär AK und einem sekundären Cy3-AK angefärbt (mittlere Spalte, rot). Die rechte Spalte zeigt die Überlappung des jeweiligen Rabproteines mit PrP^C (Überlappung, gelb). Die Auswertung der Immunfluoreszenzaufnahmen wurde mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop durchgeführt.

Da die Immunfluoreszenz auf eine mögliche Verbindung von PrP und Rabproteinen hindeutet, wurde im folgenden Teil dieser Arbeit untersucht, ob eine Verminderung gewisser Rabprotein-vermittelter Transportwege einen Einfluss auf die PrP^{Sc} Akkumulierung hat. Aufgrund dessen wurden transiente Transfektionen von siRNA gegen Caveolin, die schwere Kette von Clathrin (CHC) und diversen Rabproteinen in nicht-neuronalen L929 Zellen durchgeführt. Im folgenden Experiment sollte die funktionelle Inhibierung spezieller Endozytose-relevanter Proteine in Form einer transienten Blockierung mittels siRNA in L929 Zellen erreicht werden (Abb. 35).

ERGEBNISSE

Hierzu wurden L929 Zellen 24 h nach Aussaat mit 20 nmol der jeweiligen siRNA über Lipofektion transient transfiziert. Um die Effizienz der Genausschaltung zum Zeitpunkt einer späteren Infektion zu ermitteln, wurden die Zellen nach 35 h lysiert und die Expression des jeweiligen Proteins im Western Blot im Vergleich zu GAPDH als Ladungskontrolle untersucht. Als Kontrolle wurde eine unspezifisch bindende siRNA (*nonsilencing*, NS), parallel zu den zu untersuchenden siRNAs, mitgeführt und in der Statistik als Vergleichskontrolle mit 100% angegeben.



ERGEBNISSE

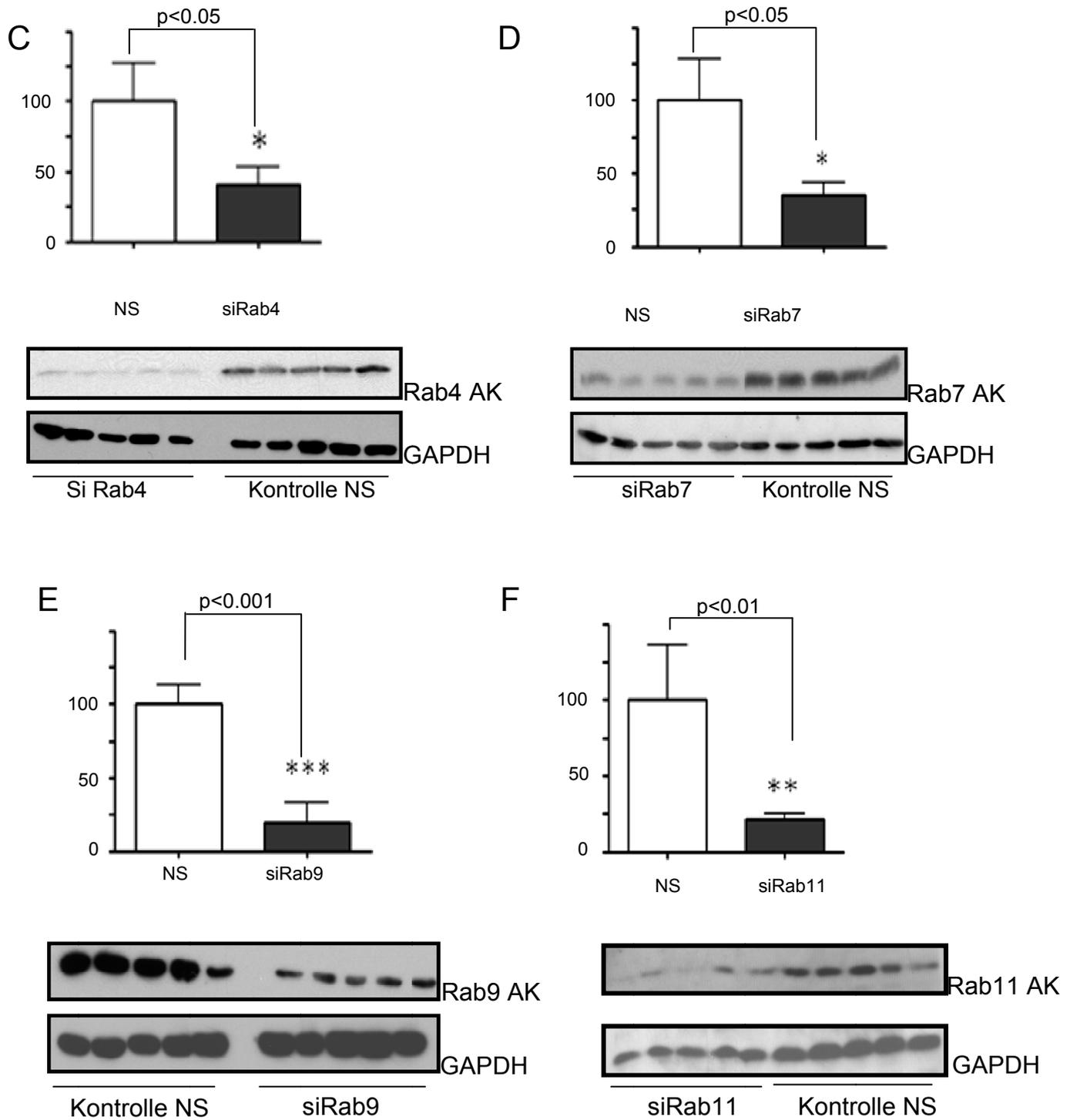


Abb. 35: Effekte der transienten siRNA Transfektionen. L929 Zellen wurden 24 h nach dem Aussähen mit der jeweiligen siRNA (20 nmol) mittels Lipofektion in einem 5fach Ansatz transfiziert und nach 35 h lysiert. Als Kontrolle dienen L929 Zellen, welche mit NS-siRNA transfiziert wurden. Diese Kontrollen werden in den Auswertungen immer als 100%

ERGEBNISSE

angegeben. Die statistische Signifikanz der Werte wurde mit Hilfe des „paired *t* test“ ermittelt (p-Werte: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). Zusätzlich zur statistischen Auswertung sind Western Blots mit Antikörpern, welche gegen die Proteine, die durch die siRNA des jeweiligen Versuches gerichtet sind, und GAPDH als Ladungskontrolle abgebildet. A) Effizienz der Genausschaltung in L929 Zellen, Detektion im Immunoblot mit dem jeweiligen gegen das auszuschaltende Gen gerichteten AK **(A)** Caveolin, **(B)** CHC, **(C)** Rab4, **(D)** Rab7, **(E)** Rab9 und **(F)** Rab11.

Die Effizienz der Genausschaltung der unterschiedlichen Proteine in Abbildung 35 wurde im Vergleich zur Ladungskontrolle GAPDH mittels photodensitometrischer Analyse der Western Blots (ImageQuant TL Software) statistisch ausgewertet (Abb. 35). Da die Effizienz der siRNA Transfektion zwischen 59% und 90% beträgt, können somit die folgenden Versuche durchgeführt werden.

Um eine eventuelle Wirkung der transfizierten siRNAs auf die PrP^C Verteilung in L929 Zellen zu untersuchen, wurden FACS Analysen durchgeführt. L929 Zellen wurden mit siRNA gegen diverse Rabprotein- und Endozytoseprotein-Gene transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, um intrazelluläres PrP^C mittels FACS Analyse nachzuweisen. Durch Färbung von totalem PrP^C zeigt sich eine leichte Erhöhung der gemessenen PrP^C Moleküle durch die Transfektion mit siRNA der Proteine Rab4, Rab7, Rab9, Rab11 und Caveolin. Nach der Transfektion mit der CHC-siRNA kann man dagegen eine geringfügige Erniedrigung des totalen PrP^C im Vergleich zur NS-Kontrolle erkennen (Abb. 36).

ERGEBNISSE

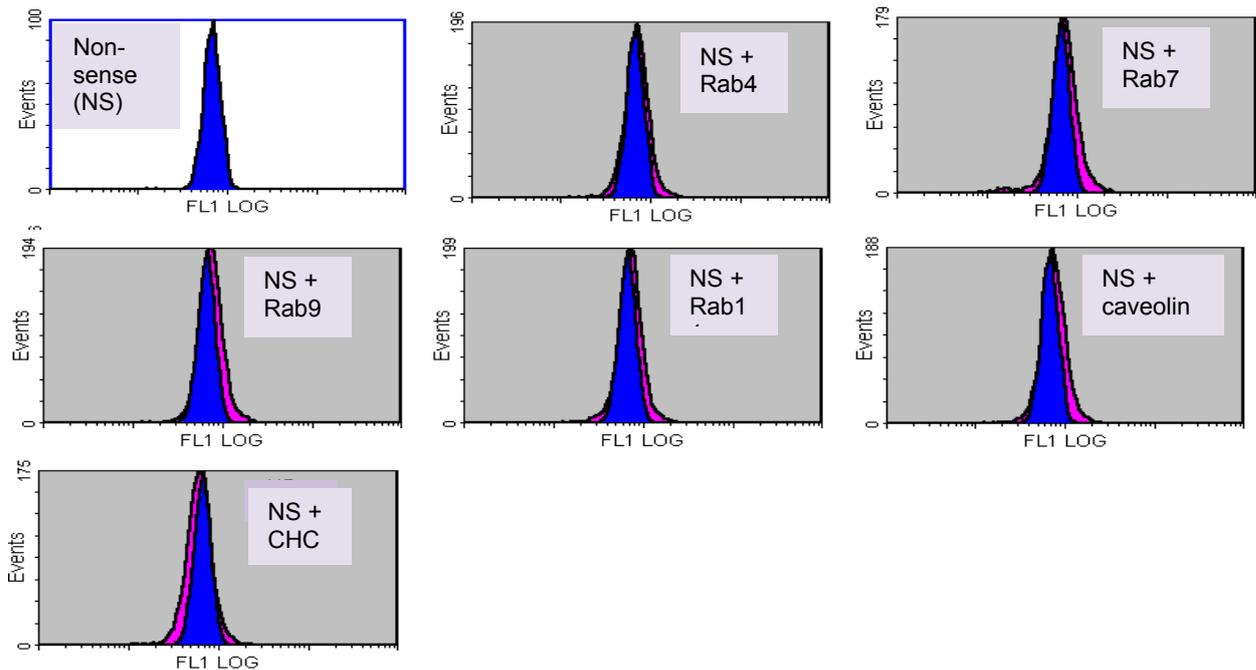


Abb. 36: Expression von totalem PrP^C nach siRNA-Transfektion. L929 Zellen wurden mit den oben genannten siRNAs transfiziert und 48 h später wurde das zelluläre PrP mit PrP-4H11 Antikörper angefärbt. Als sekundärer Antikörper wurde ein Cy2-konjugierter anti-IgG verwendet (siehe 3.4). Als Bezugskontrolle dienen L929 Zellen, welche nur mit NS-siRNA transfiziert wurden (linke Spalte, obere Reihe). Die Expression von intrazellulärem PrP^C wurde mittels FACS Analyse untersucht.

Im folgenden Versuch wurden die L929 Zellen wiederum mit den zuvor verwendeten siRNAs transfiziert. Um nun das PrP^C zu messen, das an der Zelloberfläche lokalisiert ist, wurde nach 48 h das membranständige PrP^C an der Zelloberfläche direkt ohne Fixierung angefärbt, um eine Zerstörung der Oberflächenstrukturen zu verhindern. Da durch die Zugabe von Trypsin Oberflächenproteine degradiert werden, dient Trypsin als Negativkontrolle für die FACS Analyse der Oberflächenexpression von PrP^C (Mittlere Spalte, obere Reihe). Die Oberflächenexpression der PrP^C Moleküle nach der Transfektion mit Rab9, Rab11, Caveolin und Clathrin siRNA bleibt unverändert. Nach der Rab4-siRNA Transfektion verringert sich die PrP^C Oberflächenexpression geringfügig, dagegen zeigt sich nach der Behandlung mit Rab7-siRNA eine leichte Erhöhung der Menge an PrP^C Molekülen durch eine leichte Rechtsverschiebung der Messspitze der FACS-Messung (Abb. 37).

ERGEBNISSE

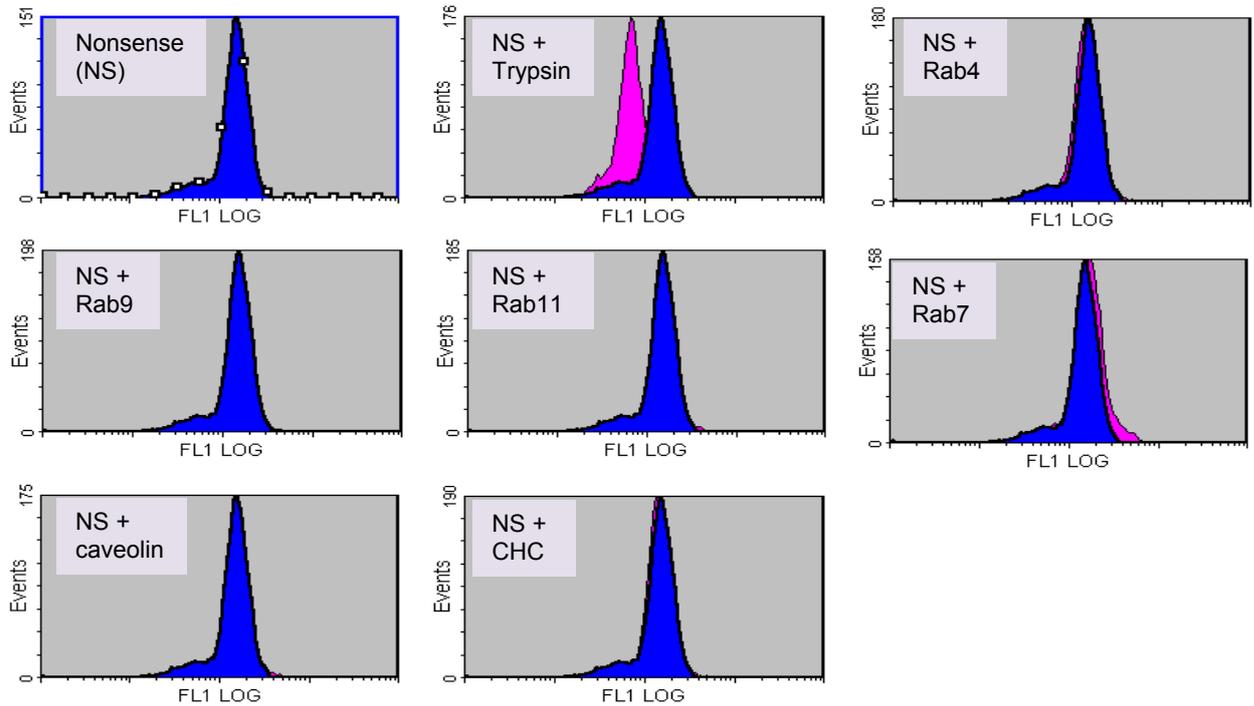


Abb. 37: Oberflächenfärbung von PrP^C nach siRNA-Transfektion. L929 Zellen wurden mit den oben genannten siRNAs transfiziert und 48 h später wurde das PrP^C in unpermeabilisierten Zellen mit PrP-4H11 Antikörper angefärbt. Der Cy2-konjugierte anti-IgG Antikörper diente als sekundärer Antikörper. Als Bezugskontrolle wurden L929 Zellen verwendet, welche nur mit NS siRNA transfiziert wurden (linke Spalte, obere Reihe).

Insgesamt kann jedoch weder bei der intrazellulären noch bei der Oberflächenexpression große Veränderungen in der PrP^C Verteilung nach der siRNA Transfektion der jeweiligen Proteine in L929 Zellen festgestellt werden.

5.2.3 Akute Infektion der Endozytoseprotein- und Rabprotein-defizienten L929 Zellen mit drei verschiedenen mausadaptierten Prionstämmen

Die Clathrin- oder Caveolin-abhängige Endozytose und die Abläufe des intrazellulären Transports werden von Rabproteinen reguliert. Diese sollten nun nach dem transienten Ausschalten, während der akuten Infektionen mit unterschiedlichen Prionstämmen, untersucht und mögliche Unterschiede aufgezeigt werden. Durch die Transfektion mit siRNA konnte eine deutliche Abnahme in der Expression der einzelnen Rabproteine erreicht werden (5.2.2). Diese Methode ist somit geeignet, die Abhängigkeit der Prionkonversion von Rabproteinen während der akuten Infektion zu untersuchen. Dazu wurde in folgenden Experimenten der effizient infizierbare L929 Klon 15.9 mit siRNAs gegen diverse Rabproteine transient transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen mit unterschiedlichen Prionstämmen infiziert (Abb. 38). Die Inkubationszeit des Hirnhomogenats beträgt, wie in den vorangegangenen Inhibitorenversuchen (5.1.2), lediglich 4 h. Die Kontrolle der Infektion erfolgte in der ersten Passage nach der Neuinfektion (2.Passage) nach PK-Verdau mittels Immunoblot.

ERGEBNISSE

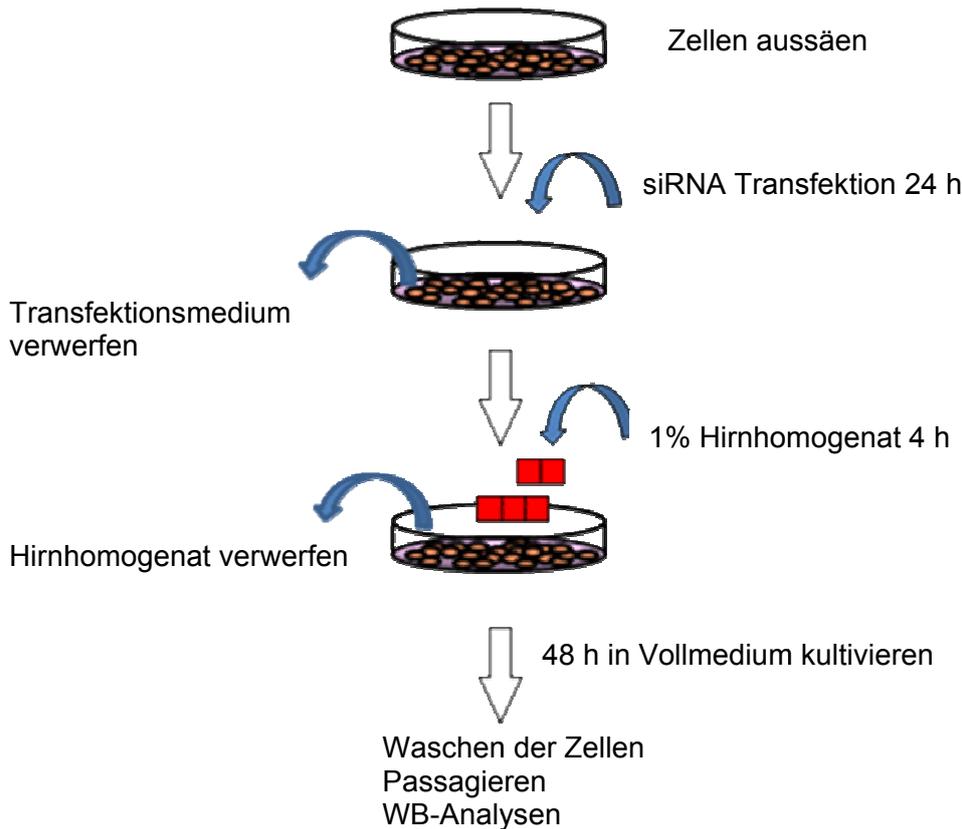


Abb. 38: Schematische Darstellung der transienten Transfektion in Verbindung mit der akuten Prioninfektion. Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit der jeweiligen siRNA transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 1%igem Hirnhomogenat für 4 h infiziert und nach einem Mediumwechsel für weitere 48 h kultiviert. Bereits zu diesem Zeitpunkt konnten die Zellen auf eine akute Prioninfektion mittels WB getestet werden. Danach konnten die Zellen weiter passagiert und unterschiedliche Analysemethoden zur Kontrolle einer Neuinfektion durchgeführt werden.

Für die PrP^{Sc} Konversion während einer Prioninfektion müssen gewisse Voraussetzungen herrschen. PrP^C muss vorhanden (Buehler *et al.*, 1993), korrekt gefaltet (Nunziante *et al.*, 2005) und in den *Lipid Rafts* an der Zelloberfläche lokalisieren (Taraboulos *et al.*, 1992; Vey *et al.*, 1996). Die Extraktion von Cholesterolem u.a. aus diesen Membranregionen kann die PrP^{Sc} Akkumulation unterbinden (Taraboulos *et al.*, 1995). Unterschiedliche Effekte hinsichtlich der PrP^{Sc} Akkumulation verschiedener Prionstämme konnten mittels cholesterolem-metabolismus-verändernder Substanzen in dieser Arbeit bereits nachgewiesen werden (5.1.2 und 5.1.3). Daher liegt die Vermutung nahe, dass verschiedene Internalisierungswege zur Etablierung einer Prioninfektion essentiell sein könnten. Die Endozytoseproteine Caveolin und Clathrin wirken direkt an der Zellmembran und

könnten somit die Etablierung einer Infektion verhindern. Diese sind an den ersten Internalisierungsschritten von extrazellulären Liganden beteiligt. Aus diesem Grund wurden L929 Zellen, nach einer Blockierung der Expression der beiden genannten Proteine, mit unterschiedlichen Prionstämmen akut infiziert. So kann eine mögliche Infektion über die PrP^{Sc} Akkumulierung im Immunoblotverfahren genauer untersucht und verglichen werden.

ME7- und 22L-Infektionen zeigen eine signifikante Reduktion der PrP^{Sc} Menge bei Ausschaltung des Gens für Clathrin-HC. Dagegen führt der Clathrin-*Knockdown* bei der RML-Infektion zu einer verstärkten PrP^{Sc} Akkumulierung (Abb. 39). In Abbildung 40 kann man erkennen, dass eine RML-Infektion mit einem Caveolin-KO fast nicht möglich ist. Die Caveolae-vermittelte Endozytose scheint daher essentiell für eine akute RML-Infektion zu sein. Das Fehlen von Caveolin während der 22L- und ME7-Infektion führt zu einer erhöhten PrP^{Sc} Akkumulierung (Abb. 41). Jedoch können *clathrin coated pits* nur Partikel einer bestimmten Größe internalisieren. Da nicht bekannt ist, wie groß die infektiösen Aggregate des hergestellten Prionhirnhomogenats sind, kann hierzu keine endgültige Aussage getroffen werden. Jedoch zeigen Studien von Magalhaes *et al.*, dass große Aggregate von PrP^{Sc}, die an die Zellmembran binden, „aufgebrochen werden und in kleine Vesikel internalisiert werden“ (Magalhaes *et al.*, 2005) können. Vermutlich besteht die Möglichkeit, PrP^{Sc} Moleküle auch aus größeren infektiösen Aggregaten über eine Clathrin- oder Caveolin-abhängige Endozytose aufzunehmen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Clathrin-abhängige Endozytose ein wichtiger Weg für die Neubildung von PrP^{Sc} des 22L- und ME7-Prionstammes zu sein scheint. Die Caveolae-vermittelte Endozytose ist eine wichtige Komponente der RML-PrP^{Sc} Akkumulierung.

ERGEBNISSE

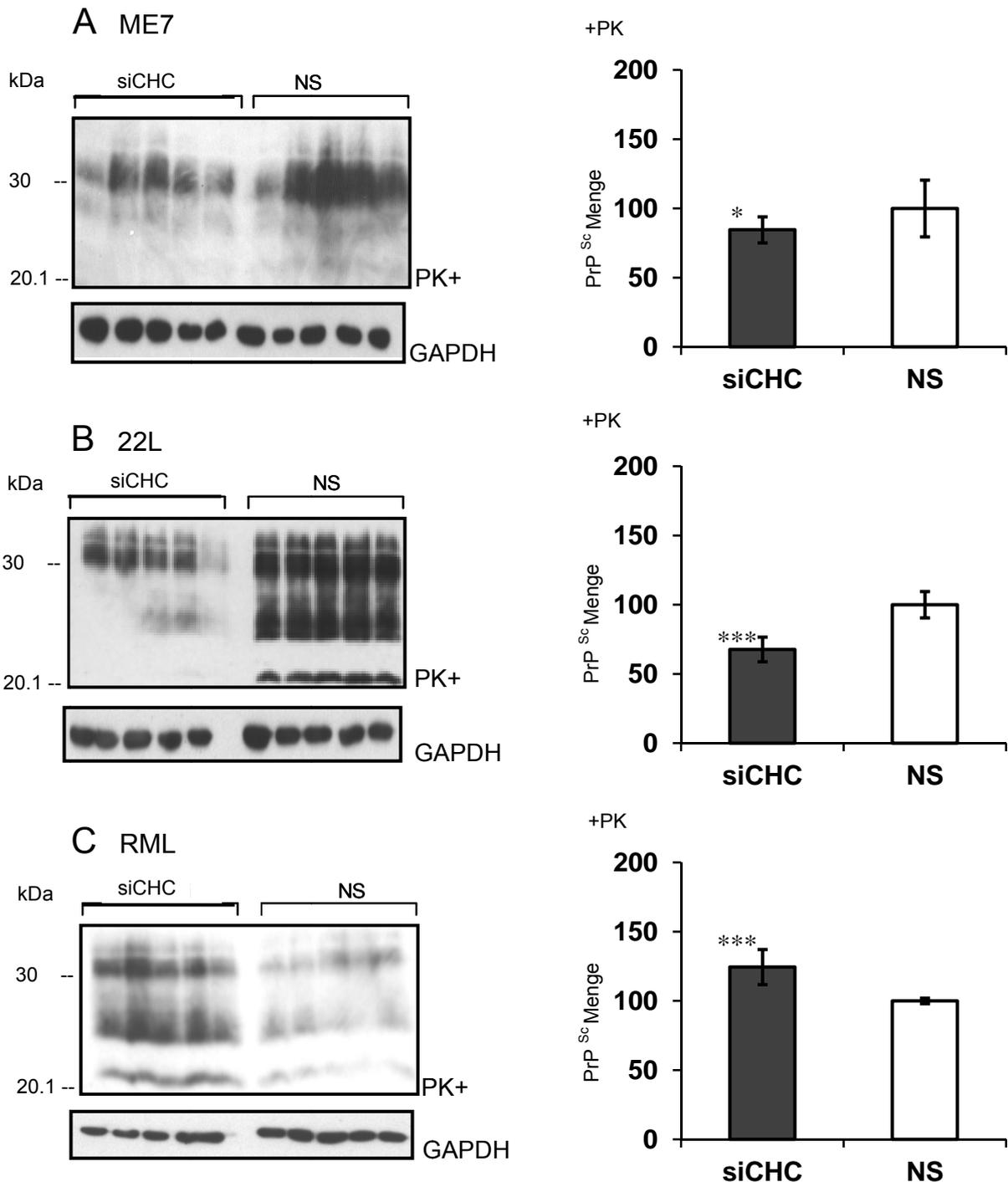


Abb. 39: PrP^{Sc} Gehalt in akut infizierten L929 Zellen nach CHC-KO. Die Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen im 5fachen Ansatz mit CHC-siRNA (20 nmol) transfiziert. Als Kontrolle dienen L929 Zellen, welche mit einer NS-siRNA behandelt wurden. Der PrP^{Sc} Gehalt dieser Kontrollen wird in den Auswertungen immer als 100% angegeben. 24 h nach der Transfektion werden die Zellen mit 1% Hirnhomogenat der jeweiligen Prionstämme 4 h inkubiert und weiterkultiviert. In den Western Blots wird die Menge an PrP^{Sc} mittels anti-PrP AK 4H11 in der 2. Passage nach Neuinfektion gezeigt. Zusätzlich ist GAPDH als Ladungskontrolle abgebildet, welche in der photodensitometrischen Analyse neben dem WB (+PK) zum Abgleich in die Statistik mit einbezogen wurde. Auf der rechten Seite erfolgte die statistische Auswertung mittels „paired t-test“, wobei die Menge an gemessenen PrP^{Sc} in

ERGEBNISSE

Relation zur Kontrolle gestellt wurde, die immer auf 100% gesetzt wurde (p-Werte: * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$). A) PrP^{Sc} akut ME7-infizierter L929 Zellen nach CHC- KO. B) PrP^{Sc} akut 22L-infizierter L929 Zellen nach CHC-KO. C) PrP^{Sc} akut RML-infizierter L929 Zellen nach CHC-KO.

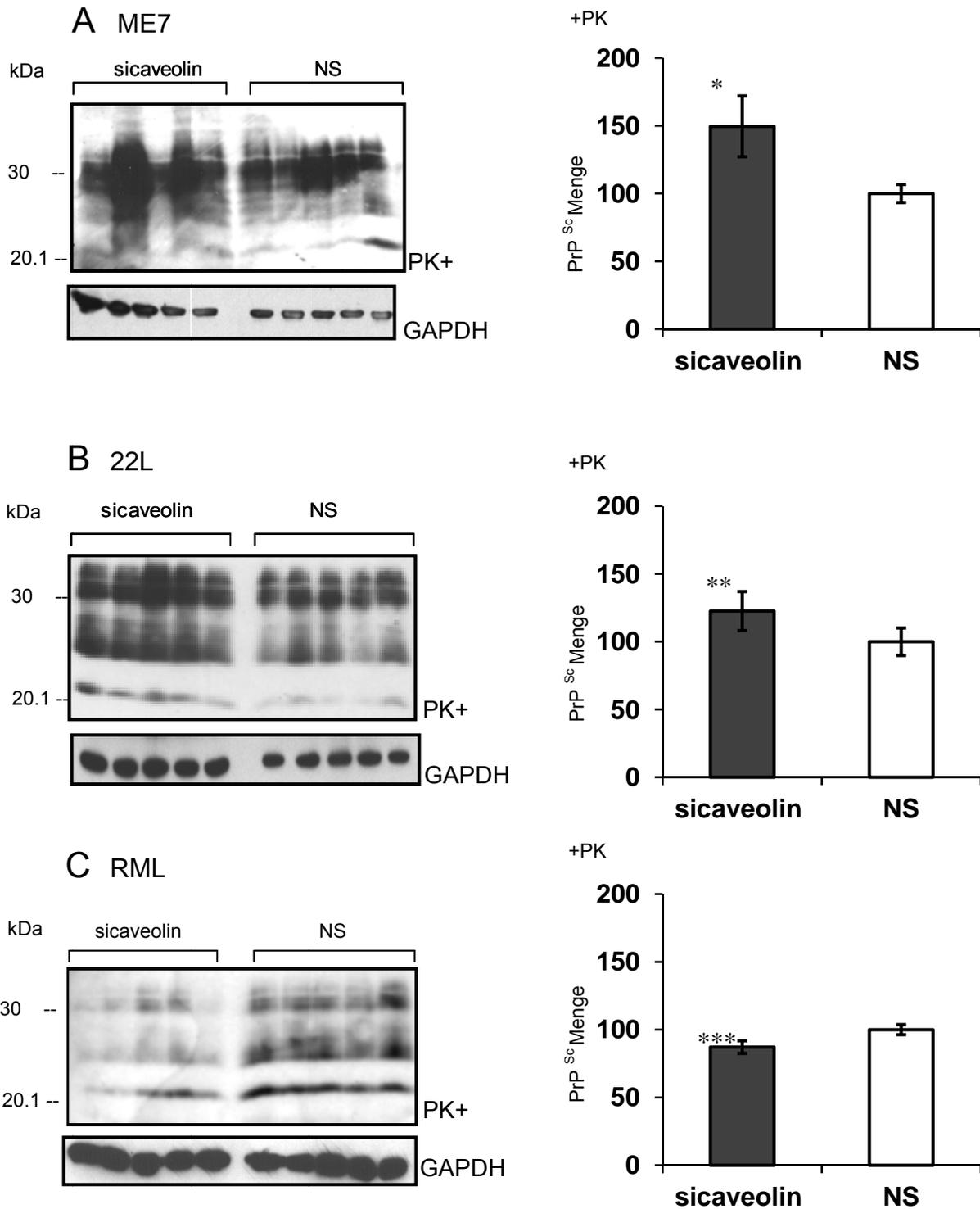


Abb. 40: PrP^{Sc} Gehalt in akut infizierten L929 Zellen nach Caveolin-KO. Die Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen im 5fachen Ansatz mit Caveolin-siRNA (20 nmol) transfiziert. Als Kontrolle dienen L929 Zellen, welche mit einer NS-siRNA behandelt wurden. Der PrP^{Sc} Gehalt dieser Kontrollen wird in den Auswertungen immer als 100% angegeben. 24 h nach der Transfektion werden die Zellen mit 1% Hirnhomogenat der jeweiligen Prionstämme 4 h inkubiert und weiterkultiviert. In den Western Blots wird die Menge an PrP^{Sc} mittels anti-PrP AK 4H11 in der 2. Passage nach Neuinfektion gezeigt. Zusätzlich ist GAPDH als Ladungskontrolle abgebildet, welche in der photodensitometrischen Analyse neben dem WB (+PK) zum Abgleich in die Statistik mit einbezogen wurde. Auf der rechten Seite erfolgte die statistische Auswertung mittels „paired t-test“, wobei die Menge an gemessenen PrP^{Sc} in Relation zur Kontrolle gestellt wurde, die immer auf 100% gesetzt wurde (p-Werte: * = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001). **A)** PrP^{Sc} akut ME7-infizierter L929 Zellen nach CHC-KO. **A)** PrP^{Sc} akut ME7- infizierter L929 Zellen nach Caveolin-KO. **B)** PrP^{Sc} akut 22L-infizierter L929 Zellen nach Caveolin-KO. **C)** PrP^{Sc} akut RML-infizierter L929 Zellen nach Caveolin-KO.

Da Teile des intrazellulären Vesikeltransport von Rab-GTPasen reguliert werden und PrP in endozytotischen Vesikeln vorliegt, könnte eine funktionelle Inhibierung spezieller Rabproteine dazu beitragen, den Einfluss von Vesikeln auf die akute Infektion und PrP^{Sc} Akkumulation unterschiedlicher Prionstämme genauer zu bestimmen. Rab4 reguliert im endosomalen System das frühe und schnelle Recycling, ausgehend von den EE zum RC oder direkt zur Plasmamembran (van der Sluijs *et al.*, 1991). Dieses soll durch die Blockierung mittels siRNA unterbrochen werden. Desweiteren ist das Rab4-Protein im Plasmamembran-Recycling des PrP^C beteiligt (Bèranger *et al.*, 2002). Die Versuche in Abbildung 41 zeigen einen unterschiedlichen Einfluss des Rab4-Proteins auf die akute Infektion. Während der Infektion mit ME7 scheint Rab4 eine wichtige Rolle zu spielen, da sich der PrP^{Sc} Gehalt durch die Verringerung der Rab4 Expression deutlich verringert (Abb. 41A). Im Gegensatz hierzu führt die Blockierung von Rab4 während der 22L-Infektion zu einer signifikanten Erhöhung der PrP^{Sc} Akkumulierung (Abb. 41B). Die RML-Infektion wird durch die Rab4-siRNA nicht beeinträchtigt (Abb. 41C). Das Fehlen von Rab4 weist daher eine prionstammspezifische Wirkung auf.

ERGEBNISSE

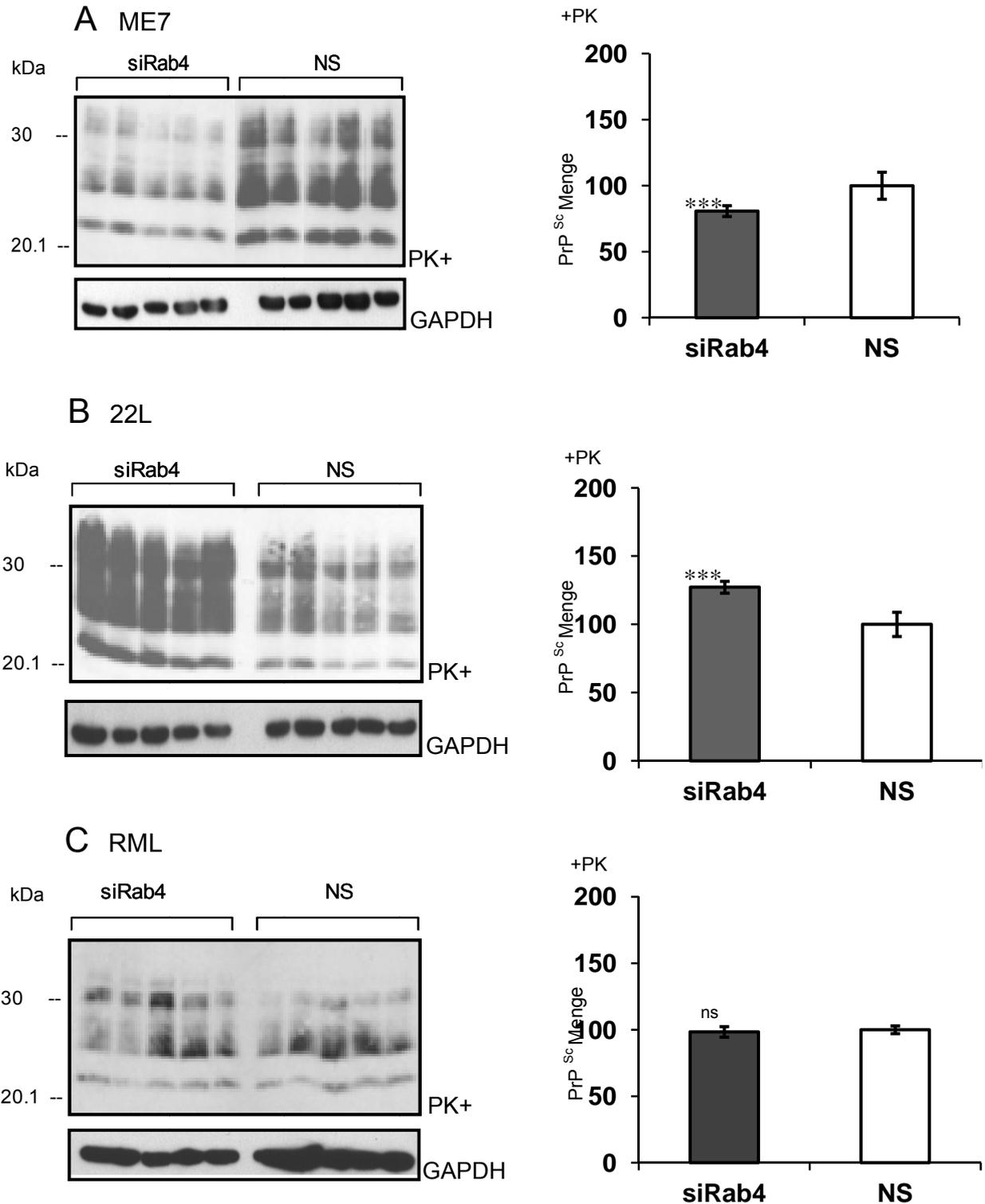


Abb. 41: PrP^{Sc} Gehalt in akut infizierten L929 Zellen nach Rab4-KO. Die Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen im 5fachen Ansatz mit Rab4-siRNA (20 nmol) transfiziert. Als Kontrolle dienen L929 Zellen, welche mit einer NS-siRNA behandelt wurden. Diese Kontrollen werden in den Auswertungen immer als 100% angegeben. 24 h nach der Transfektion werden die Zellen mit 1% Hirnhomogenat der jeweiligen Prionstämme 4 h inkubiert und weiterkultiviert. In den Western Blots wird die Menge an PrP^{Sc} mittels anti-PrP

ERGEBNISSE

AK 4H11 in der zweiten Passage nach Neuinfektion gezeigt. Zusätzlich ist GAPDH als Ladungskontrolle abgebildet, welche in der photodensitometrischen Analyse neben dem WB (+PK) zum Abgleich in die Statistik mit einbezogen wurde. Auf der rechten Seite erfolgte die statistische Auswertung mittels „paired t-test“, wobei die Menge an gemessenen PrP^{Sc} in Relation zur Kontrolle gestellt wurde, die immer auf 100% gesetzt wurde (p-Werte: *** = p<0.001, ns = nicht signifikant). **A)** PrP^{Sc} akut ME7-infizierter L929-Zellen nach Rab4-KO. **B)** PrP^{Sc} akut 22L-infizierter L929 Zellen nach Rab4- KO. **C)** PrP^{Sc} akut RML-infizierter L929 Zellen nach Rab4-KO.

An das frühe endosomale System schließt das späte endosomale System an, welches von Rab7 und Rab9 vermittelt wird. Da bereits gezeigt wurde, dass exogenes PrP^{Sc} internalisiert und in späte Endosomen und/oder Lysosomen transportiert wird (Magalhaes *et al.*, 2005), sollte das Ausschalten der Rab7 Expression den Transport von EEs zu Lysosomen unterbinden. So sind mögliche Unterschiede in der PrP^{Sc} Akkumulierung während der akuten Infektion mit verschiedenen Prionstämmen zu analysieren. Abbildung 41 zeigt, dass Rab7-positive Transportvesikel für 22L- und RML-Infektionen essentiell sind. Durch die Reduzierung der Rab7 Expression und der daraus folgenden Blockierung des Transports der Prionproteine in LEs wird die Akkumulierung von PrP^{Sc} in der 22L- und RML-Infektion inhibiert. Während akuter ME7-Infektion zeigt sich durch das Ausschalten von Rab7 nur eine geringe, nicht signifikante, Reduzierung des PrP^{Sc} Gehalts (Abb. 41).

Mittels Überexpression des Rab9-Proteins konnten Gilch *et al.* u.a. zeigen, dass der PrP^{Sc} Gehalt der neuronalen 22L-infizierten Zellen verringert wird (Gilch *et al.*, 2009). Durch eine Blockierung der Expression des Rab9-Proteins sollte der Weg zwischen LE und TGN ausgeschaltet werden. So konnte der Effekt auf die PrP^{Sc} Akkumulierung nach der akuten Infektion ohne die Möglichkeit eines Transports der Prionproteine in das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) untersucht werden. Nach dem Blockieren der Rab9 Expression, konnte während der ME7- und 22L-Infektion eine deutlich vermehrte PrP^{Sc} Akkumulierung in L929 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 43 A, B). Bei der RML-Infektion ist dies nicht der Fall. Trotz Blockierung der Rab9 Expression kommt es hier zu einer mit der Kontrolle vergleichbaren PrP^{Sc} Akkumulierung (Abb. 43 C).

ERGEBNISSE

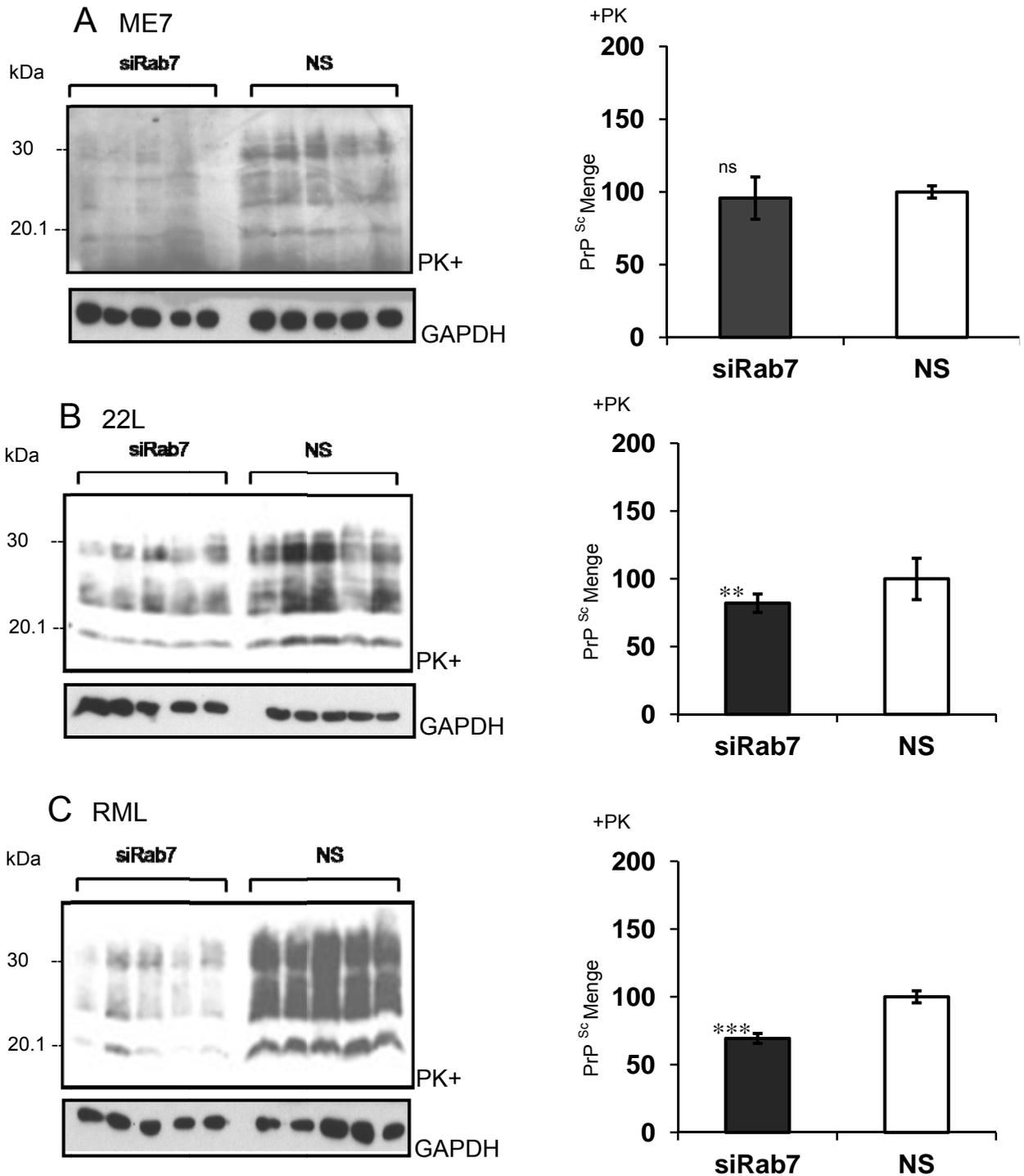


Abb. 42: PrP^{Sc} Gehalt in akut infizierten L929 Zellen nach Rab7-KO. Die Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen im 5fachen Ansatz mit Rab7-siRNA (20 nmol) transfiziert. Als Kontrolle dienen L929 Zellen, welche mit einer NS-siRNA behandelt wurden. Diese Kontrollen werden in den Auswertungen immer als 100% angegeben. 24 h nach der Transfektion werden die Zellen mit 1% Hirnhomogenat der jeweiligen Prionstämme 4 h inkubiert und weiterkultiviert. In den Western Blots wird die Menge an PrP^{Sc} mittels anti-PrP AK 4H11 in der zweiten Passage nach Neuinfektion gezeigt. Zusätzlich ist GAPDH als Ladungskontrolle abgebildet, welche in der photodensitometrischen Analyse neben dem WB

ERGEBNISSE

(+PK) zum Abgleich in die Statistik mit einbezogen wurde. Auf der rechten Seite erfolgte die statistische Auswertung mittels „paired t-test“, wobei die Menge an gemessenen PrP^{Sc} in Relation zur Kontrolle gestellt wurde, die immer auf 100% gesetzt wurde (p-Werte: ** = p<0.01, *** = p<0.001, ns = nicht signifikant). **A)** PrP^{Sc} akut ME7-infizierter L929 Zellen nach Rab7-KO. **B)** PrP^{Sc} akut 22L-infizierter L929 Zellen nach Rab7-KO. **C)** PrP^{Sc} akut RML-infizierter L929 Zellen nach Rab7-KO.

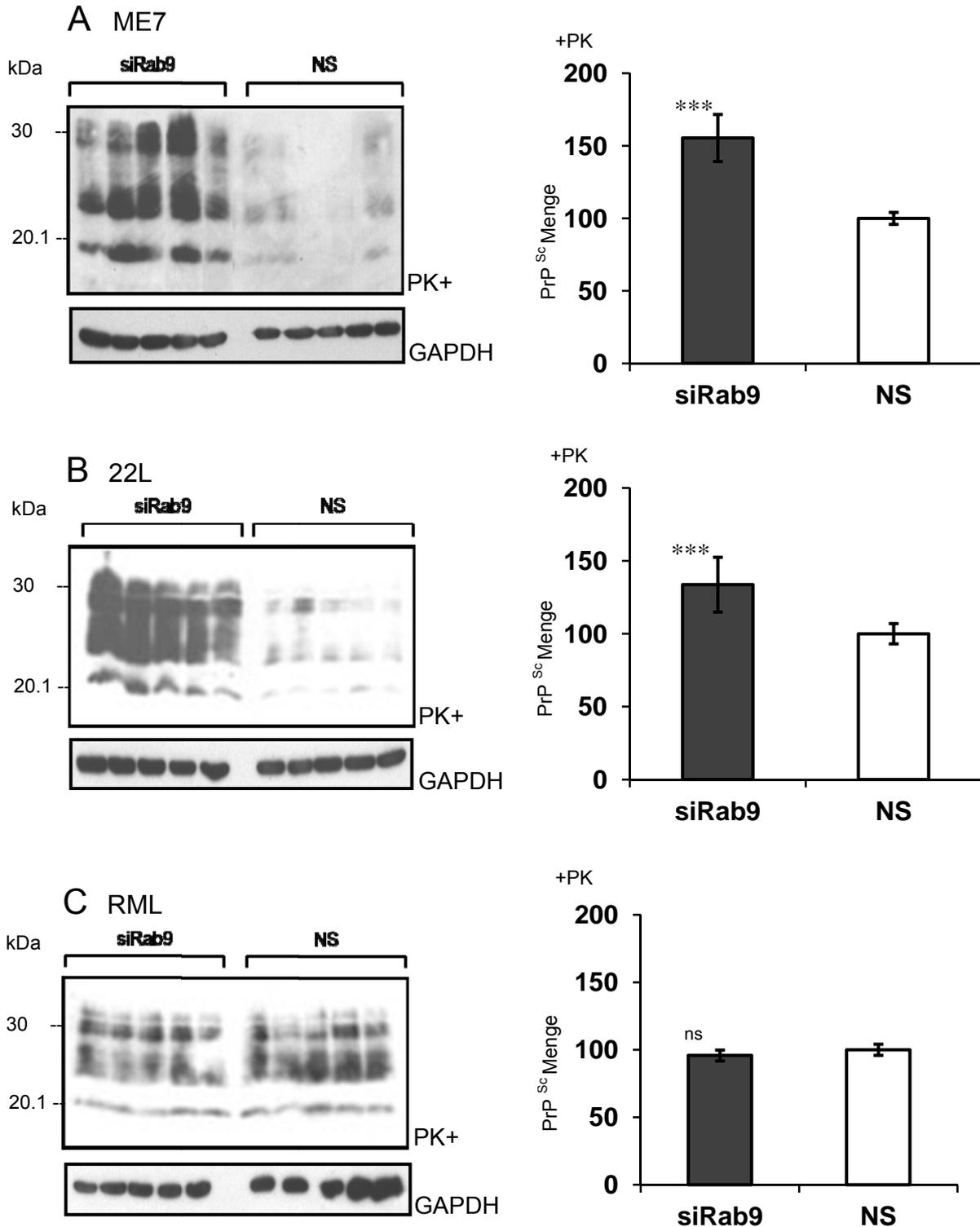


Abb. 43: PrP^{Sc} Gehalt in akut infizierten L929 Zellen nach Rab9-KO. Die Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen im 5fachen Ansatz mit Rab9-siRNA (20 nmol) transfiziert. Als Kontrolle dienen L929 Zellen, welche mit einer NS-siRNA behandelt wurden. Diese Kontrollen werden in den Auswertungen immer als 100% angegeben. 24 h nach der Transfektion werden die Zellen mit 1% Hirnhomogenat der jeweiligen Prionstämme 4 h inkubiert und weiterkultiviert. In den Western Blots wird die Menge an PrP^{Sc} mittels anti-PrP AK 4H11 in der ersten Passage nach Neuinfektion gezeigt. Zusätzlich ist GAPDH als Ladungskontrolle abgebildet, welche in der photodensitometrischen Analyse neben dem WB (+PK) zum Abgleich in die Statistik mit einbezogen wurde. Auf der rechten Seite erfolgte die statistische Auswertung mittels „paired t-test“, wobei die Menge an gemessenen PrP^{Sc} in Relation zur Kontrolle gestellt wurde, die immer auf 100% gesetzt wurde (p-Werte: *** = p<0.001; ns = nicht signifikant). **A)** PrP^{Sc} akut ME7-infizierter L929 Zellen nach Rab9-KO. **B)** PrP^{Sc} akut 22L-infizierter L929 Zellen nach Rab9-KO. **C)** PrP^{Sc} akut RML-infizierter L929 Zellen nach Rab9-KO.

Endozytische Recycling an die Zelloberfläche und Transport von frühen Endosomen zum Trans-Golgi Netzwerk ist Rab11 abhängig. Das frühe und schnelle Recycling, ausgehend von den EE zum RC, oder direkt zur Plasmamembran, wird von dem Rab4-Protein reguliert. Dagegen ist das Rab11-abhängige Recycling über Recycling Endosomen die langsamere Form des Transports. Durch die Inhibierung dieser Transportform mittels Rab11-siRNA sollen die Prionproteine keinen direkten Zugang von den EEs zum TGN haben. Die Möglichkeit, längere Zeit in den Recycling Endosomen zu bleiben, um danach wieder an die Zelloberfläche zu gelangen, soll unterbunden werden. Diese Form des Recyclings scheint nur während der ME7-Infektion von Bedeutung zu sein. Das Ausschalten der Rab11 Expression in Abbildung 44 zeigt, dass sich nur der PrP^{Sc} Gehalt nach Infektion mit dem ME7-Prionstamm erhöht. Die 22L- und RML-Infektion zeigen durch den Einsatz der Rab11-siRNA keine signifikanten Veränderungen in der PrP^{Sc} Akkumulierung.

ERGEBNISSE

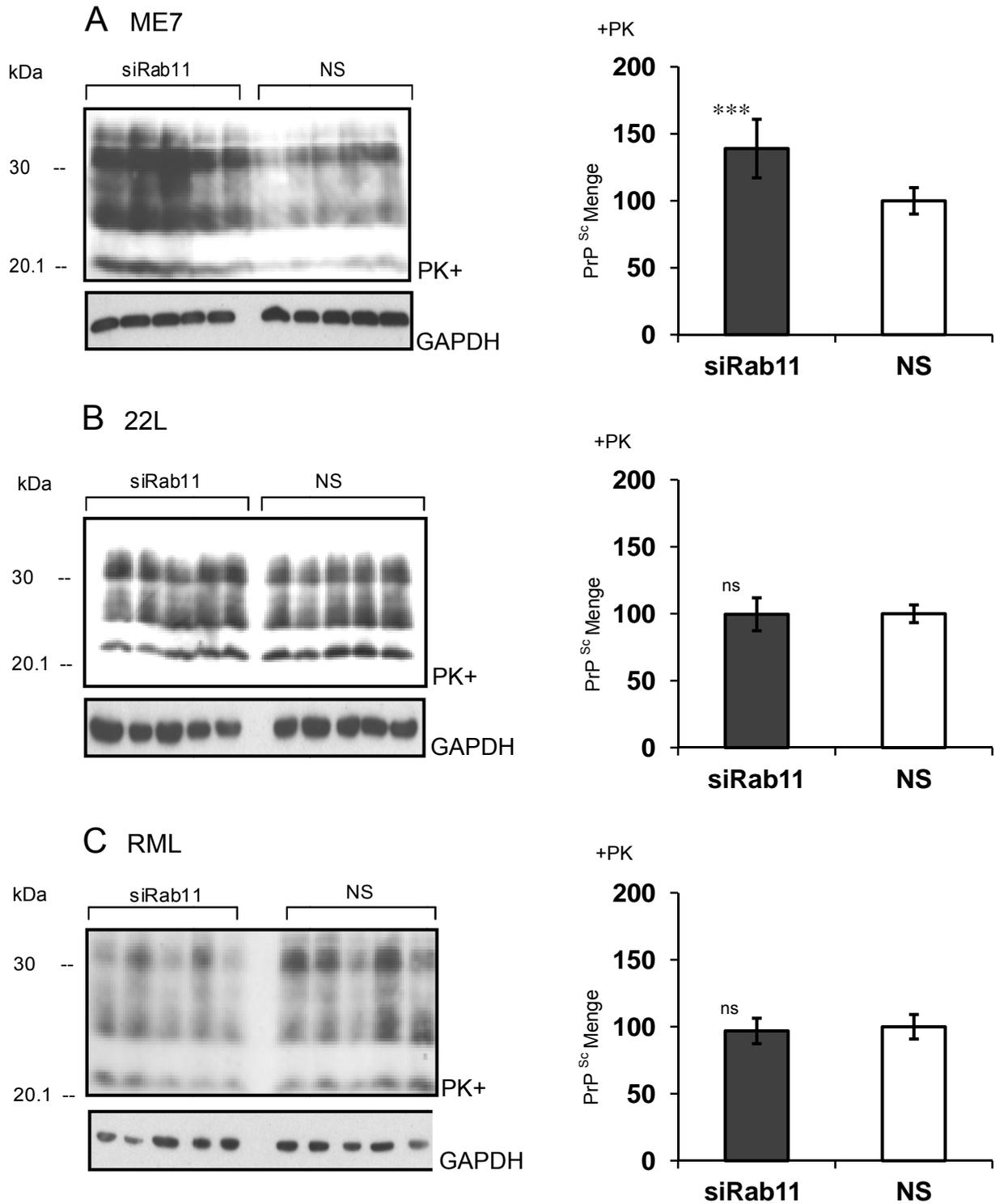


Abb. 44: PrP^{Sc} Gehalt in akut infizierten L929 Zellen nach Rab11-KO. Die Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen im 5fachen Ansatz mit Rab11-siRNA (20 nmol) transfiziert. Als Kontrolle dienen L929 Zellen, welche mit einer NS-siRNA behandelt wurden. Diese Kontrollen werden in den Auswertungen immer als 100% angegeben. 24 h nach der Transfektion werden die Zellen mit 1% Hirnhomogenat der jeweiligen Prionstämme 4 h inkubiert und weiterkultiviert. In den Western Blots wird die Menge an PrP^{Sc} mittels anti-PrP AK 4H11 in der ersten Passage nach Neuinfektion gezeigt. Zusätzlich ist GAPDH als

ERGEBNISSE

Ladungskontrolle abgebildet, welche in der photodensitometrischen Analyse neben dem WB (+PK) zum Abgleich in die Statistik mit einbezogen wurde. Auf der rechten Seite erfolgte die statistische Auswertung mittels „paired t-test“, wobei die Menge an gemessenen PrP^{Sc} in Relation zur Kontrolle gestellt wurde, die immer auf 100% gesetzt wurde (p-Werte: *** = p<0.001, ns = nicht signifikant). **A)** PrP^{Sc} akut ME7-infizierter L929-Zellen nach Rab11-KO. **B)** PrP^{Sc} akut 22L- infizierter L929 Zellen nach Rab11-KO. **C)** PrP^{Sc} akut RML-infizierter L929 Zellen nach Rab11-KO.

Zusammenfassend kann man sagen, dass zum einen Effekte auf die PrP^{Sc} Akkumulierung, durch das Ausschalten diverser Rabproteine, während akuter Infektion durchgehend vorhanden sind. Diese Ergebnisse zeigen zum anderen, dass die Veränderungen im PrP^{Sc} Gehalt stammspezifisch sind (Tabelle 9).

siRNA	PrP ^{Sc} Gehalt		
	ME7	22L	RML
CHC	-	-	+
caveolin	+	+	-
Rab4	-	+	=
Rab7	=	-	-
Rab9	+	+	=
Rab11	+	=	=

Tabelle 9: Zusammenfassende Tabelle der Effekte der verwendeten siRNAs auf die PrP^{Sc} Akkumulierung unterschiedlicher Prionstämme. Vergleich des PrP^{Sc} Gehalts der L929 Zellen während akuter Infektion bei Blockierung diverser Rabproteine (Abb. 40-44). + (mehr PrP^{Sc} als Kontrollzellen) und – (weniger PrP^{Sc} als Kontrollzellen) zeigen die PrP^{Sc} Menge im Vergleich zu den Zellen an, die mit Kontroll-siRNA (NS) behandelt wurden, wobei = in etwa den PrP^{Sc} Gehalt der Kontrollzellen (NS) entspricht.

5.2.4 Indirekte Immunfluoreszenz von PrP^{Sc} unterschiedlicher Prionstämme während der akuten Infektion

Lipid Rafts sind für viele zelluläre Prozesse essentiell. Da PrP^C und PrP^{Sc} in *Raft*-Regionen lokalisieren, stellen sie einen potentiellen Ort der Konversion dar (Mouillet-Richard *et al.*, 2000; Naslavsky *et al.*, 1999; Taraboulos *et al.*, 1995). Da Cholesterol bei der Akkumulierung des PrP^{Sc} eine Rolle spielt, deutet daraufhin, dass die Konversion eine Beteiligung der *Lipid Rafts* benötigt (Taraboulos *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997; Vey *et al.*, 1996). Clathrin und Caveolin sind direkt an der Zellmembran lokalisiert und dort an den ersten Schritten der Internalisierung beteiligt. In den folgenden Versuchen wird besonders auf diese beiden Proteine der frühen Endozytose eingegangen. Durch die Reduzierung der Proteinexpression mit siRNA, mit anschließender akuter Infektion unterschiedlicher Prionstämme (5.2.3), konnte gezeigt werden, dass die PrP^{Sc} Akkumulierung der Prionstämme ME7 und 22L von einer Präsenz der Clathrin-HC profitieren, da sich die PrP^{Sc} Menge durch das Fehlen des Clathrins reduziert. Interessanterweise konnte der RML-Stamm durch das Ausschalten von Clathrin-HC vermehrt PrP^{Sc} akkumulieren. Derartige Unterschiede zeigten sich ebenfalls bezüglich der Reduzierung der Caveolin Expression. Hier kam es jedoch zu einer vermehrten PrP^{Sc} Akkumulierung bei einer akuten 22L- und ME7-Infektion. Dagegen verringert sich die PrP^{Sc} Menge signifikant während akuter RML-Infektion. Diese beiden zellulären Aufnahmemechanismen scheinen daher prionstamm-spezifisch zu fungieren. Deshalb wurde in folgenden Versuchen die Aufnahme von PrP^{Sc} aus Hirnhomogenat, infiziert mit unterschiedlichen Prionstämmen, nach einer Inkubationszeit von 4 h betrachtet. Die PrP^{Sc} Aufnahme der unterschiedlichen Prionstämme während akuter Infektion bei gleichzeitiger Inhibierung der Clathrin- und Caveolin-abhängigen Endozytose wurde mittels Immunfluoreszenzexperimenten analysiert.

Da kein PrP^{Sc}-spezifischer Antikörper existiert, wurden die L929 Zellen in der Immunfluoreszenzanalyse zusätzlich mit Guanidinium behandelt. Die Denaturierung durch das chaotropische Salz Guanidiniumhydrochlorid (GndHCl) ist eine etablierte Methode um PrP^{Sc} zu detektieren (Taraboulos *et al.*, 1990b). Durch die Zugabe von 6 M GndHCl kommt es zu einer Konformationsänderung in PrP^{Sc}, so dass die

ERGEBNISSE

relevanten Epitope gegen PrP-spezifische Antikörper zugänglich gemacht werden (Taraboulos *et al.*, 1990; Monera *et al.*, 1994; Veith *et al.*, 2009). Zur Kontrolle einer funktionellen Guanidiniumbehandlung, durch welche nur akut zugegebenes, exogenes PrP^{Sc} oder neugebildetes PrP^{Sc} sichtbar ist, wurden L929 Zellen mit uninfiziertem Gehirn inkubiert. Kontrollansätze wurden mit Kontroll-siRNA (NS) transfiziert, um sicher zu stellen, dass der Transfektionsvorgang selbst keinen Einfluss auf die Expression von CHC und Caveolin hat (Abb. 45). Diese Kontrollen zeigen, dass die Transfektion mit Kontroll-siRNA und anschließender Infektion mit uninfiziertem Hirnhomogenat keinen Effekt auf die Expression von Clathrin-HC (Abb 45, Reihe 1 und 2) und Caveolin haben (Abb 45, Reihe 3 und 4).

ERGEBNISSE

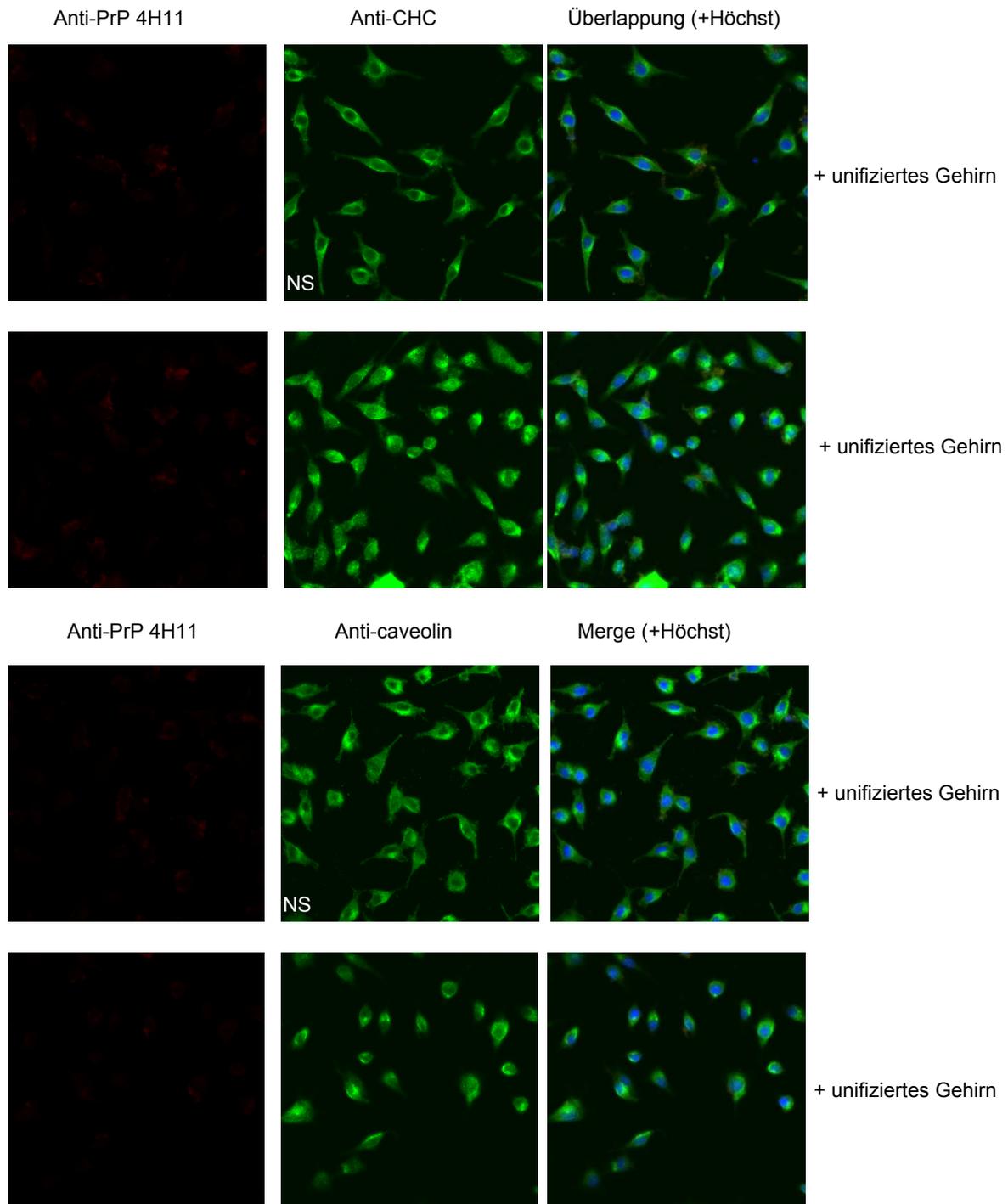


Abb. 45: Transfektion mit NS-siRNA und Infektion mit unifiziertem Mockhirn haben keinen Effekt auf die Expression von Clathrin und Caveolin. L929 Zellen wurden 4 h mit unifiziertem Hirnhomogenat inkubiert. Als Kontrolle dienen L929 Zellen, welche zuvor mit einer NS-siRNA transfiziert wurden, um einen unspezifischen Effekt der Transfektion auf die Clathrin/Caveolin-Verteilung auszuschließen. L929 Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und nach der Guanidiniumbehandlung (6 M GndHCl) mit dem anti-4H11 PrP-Antikörper inkubiert (linke Spalte, rot). Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt (3. Spalte, blau). Zusätzlich wurden Caveolin und Clathrin mit anti-CHC und anti-Caveolin Antikörpern zur Expressionskontrolle gefärbt (2. Spalte, grün).

ERGEBNISSE

In Abbildung 46 zeigt sich, dass nach Transfektion der NS-siRNA PrP^{Sc} nach 4 h Inkubation mit RML infiziertem Hirnhomogenat in den L929 Zellen zu detektieren ist (Abb.46 A, B; Reihe 2). Die Aufnahme von PrP^{Sc} in die Zelle ist in Caveolin-siRNA behandelten Zellen (Abb. 46 A, Reihe 1) schwach und nur vereinzelt zu erkennen. In CHC-siRNA behandelten Zellen (Abb. 46 B, Reihe 1) kann kein Rückgang der PrP^{Sc} Moleküle nach RML-Infektion nachgewiesen werden. Jedoch fiel die RML-Infektion insgesamt eher schwach aus (Abb. 46, Spalte 1). Da das Expressionssignal von Caveolin und Clathrin-HC im Vergleich zu den NS-transfizierten Kontrollzellen deutlich schwächer ausfällt, scheint das Ausschalten der beiden Proteine funktioniert zu haben (Abb. 46 A, 46 B; Spalte 2).

ERGEBNISSE

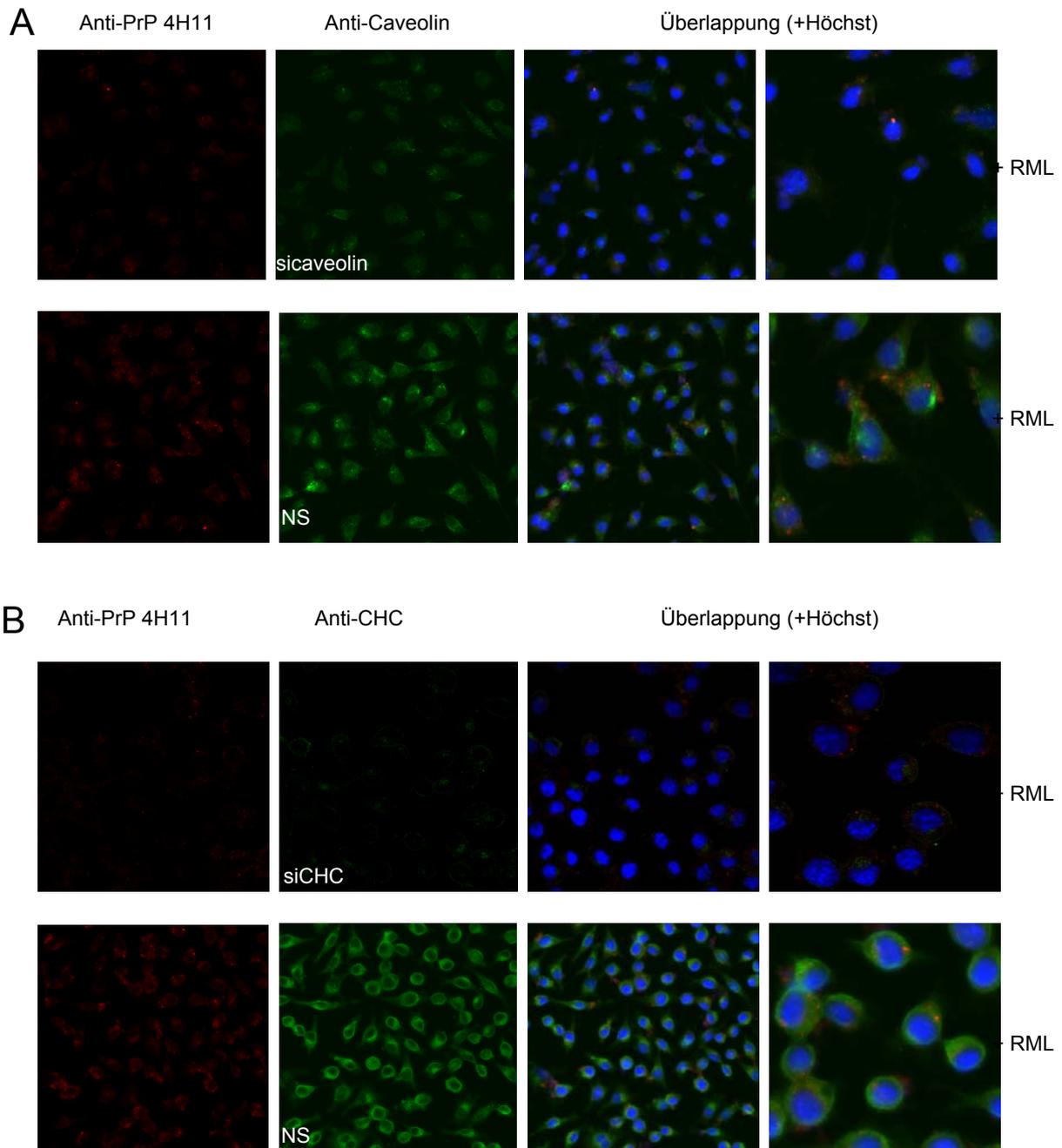
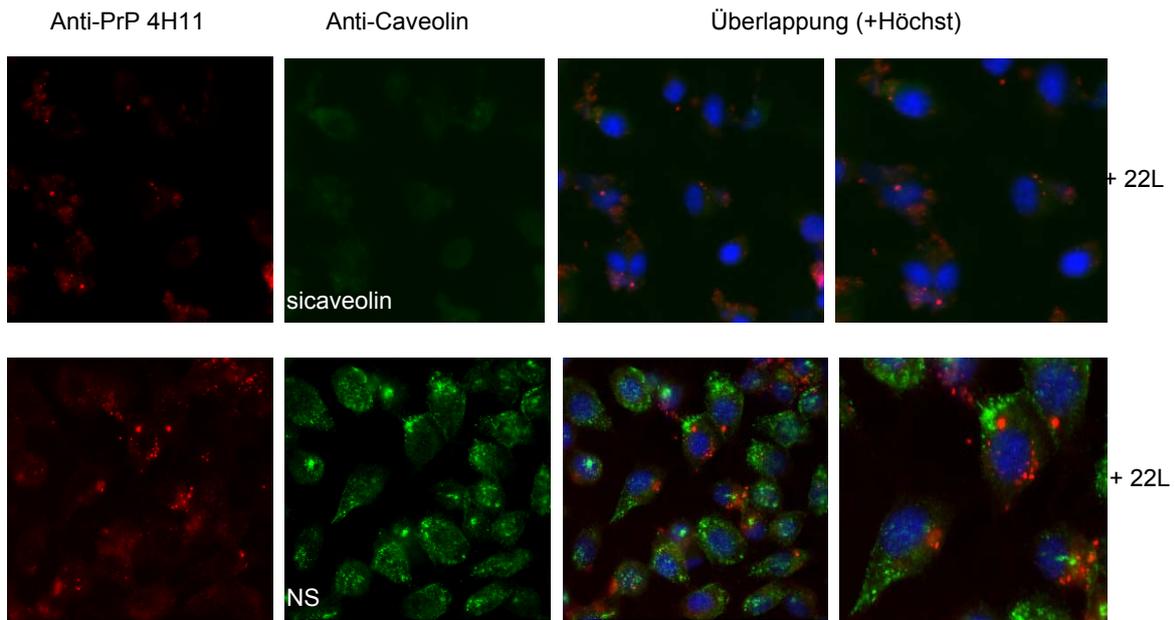


Abb. 46: Transfektion mit Caveolin siRNA vor der akuten RML-Infektion führt zu einer geringeren PrP^{Sc} Aufnahme in L929 Zellen. L929 Zellen wurden mit Caveolin- (Abb.46 A) oder CHC-siRNA (Abb.46 B) transfiziert. Als Kontrolle dienen L929 Zellen, welche mit einer NS-siRNA behandelt wurden. Nach 48 h wurden die L929 Zellen für 4 h mit RML-Hirnhomogenat inkubiert und im Anschluss fixiert, permeabilisiert und nach der Guanidiniumbehandlung (6 M GndHCl) mit anti-4H11 PrP-Antikörper inkubiert (linke Spalte, rot). Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt (3. Spalte, blau). Um den KO der verwendeten siRNAs nachzuweisen, wurden die Zellen mit anti-Caveolin und anti-CHC inkubiert (2. Spalte, grün).

ERGEBNISSE

Im Vergleich zu den verwendeten NS-Kontrollen haben auch hier die Caveolin- (Abb. 47 A) und CHC-Defizienz (Abb. 47 B) zu einer Verringerung der Caveolin- bzw. Clathrin-Proteine geführt. Somit kann eine Reduzierung der Expressionen der beiden Proteine bestätigt werden (Abb 47 A, B; Spalte 2). Wie in den NS-siRNA transfizierten L929 Zellen (Abb. 47 A, B; Reihe 2) zu erkennen ist, konnte die PrP^{Sc} Aufnahme nach der 22L-Infektion durch die Denaturierung mittels 6 M GndHCl nachgewiesen werden (Abb. 47 A, B; Spalte 1). Die PrP^{Sc} Aufnahme in mit Caveolin-siRNA behandelten Zellen, ist mit der von Kontrollzellen, bei Betrachtung der Überlappungen (Abb. 47, Spalten 3 und 4) vergleichbar (Abb. 47 A; Reihe 1 und 2). In L929 Zellen, die mit CHC-siRNA behandelt wurden, zeigt sich dagegen eine reduzierte Aufnahme von PrP^{Sc} des 22L-Prionstammes im Vergleich zur NS-siRNA Kontrolle (Abb. 47 B, Spalte 2 und 4). In den Kontrollzellen kann eine deutliche PrP^{Sc} Aufnahme in vielen Zellen detektiert werden (Abb. 47 B; Reihe 2, Spalte 4).

ERGEBNISSE



B

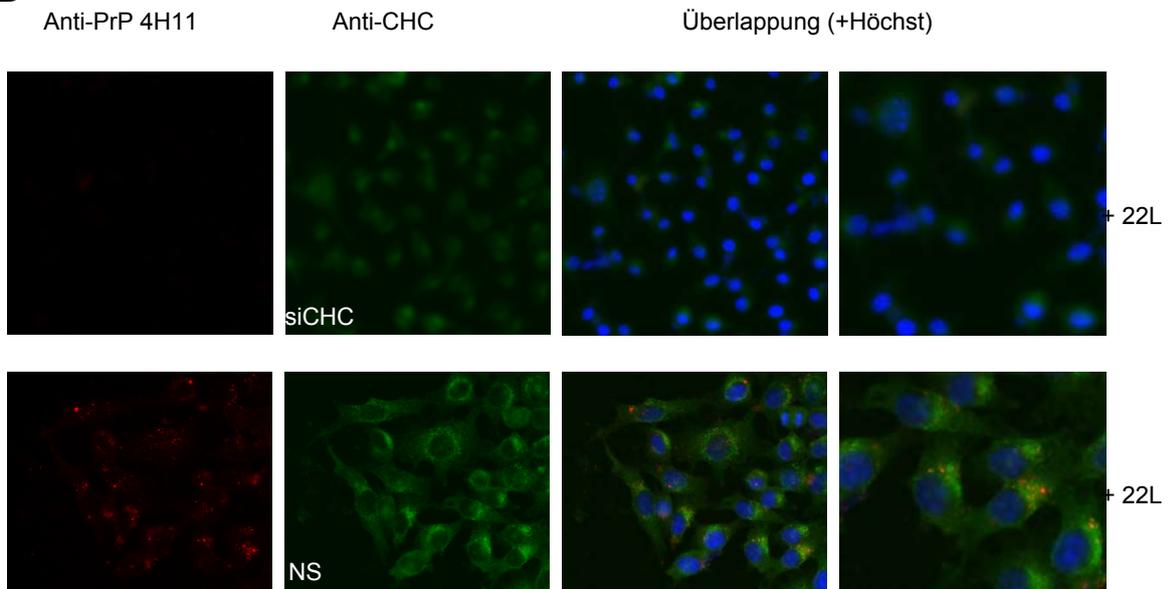


Abb. 47: Transfektion mit CHC-siRNA der akuten 22L-Infektion führt zu einer geringeren PrP^{Sc} Aufnahme in L929 Zellen. L929 Zellen wurden mit Caveolin- (Abb.47 A) oder CHC-siRNA (Abb.47 B) transfiziert. Als Kontrolle dienen L929 Zellen, welche mit einer NS-siRNA behandelt wurden. Nach 48 h wurden die L929 Zellen für 4 h mit RML-Hirnhomogenat inkubiert und im Anschluss fixiert, permeabilisiert und nach der Guanidiniumbehandlung (6 M GndHCl) mit dem anti-4H11 PrP inkubiert (linke Spalte, rot). Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt (3. Spalte, blau). Um den *Knockdown* der verwendeten siRNAs nachzuweisen, wurden die Zellen mit anti-Caveolin und anti-CHC inkubiert (2. Spalte, grün).

ERGEBNISSE

In Abbildung 48 ist eine reduzierte Caveolin (Abb. 48 A, Spalte 2) und CHC (Abb. 48 B, Spalte 2) Expression nach der Behandlung mit siRNA im Vergleich zu den verwendeten NS-Kontrollen erkennbar. Die PrP^{Sc} Aufnahme nach einer ME7-Infektion war sowohl in Caveolin-siRNA behandelten Zellen (Abb. 46 A, Spalte 1) als auch in CHC-siRNA behandelten Zellen (Abb. 48 B, Spalte 1) sichtbar. In beiden Fällen lassen sich im Vergleich zu den Kontrollzellen keine großen Unterschiede bezüglich der PrP^{Sc} Aufnahme der ME7 Prionen erkennen. Sowohl in Caveolin- als auch in CHC-defizienten L929 Zellen, kann eine PrP^{Sc} Aufnahme, die mit der Aufnahme in NS-siRNA transfizierten Zellen vergleichbar ist, detektiert werden. Zusammenfassend kann man sagen, dass eigentlich immer eine PrP^{Sc} Aufnahme, unabhängig von Prionstämmen, nachweisbar ist. Trotz Blockierung der Proteinexpressionen von Calthrin-HC und Caveolin kann eine PrP^{Sc} Aufnahme in den meisten Fällen gezeigt werden. Nur im Fall der akuten RML-Infektion in CHC-defizienten L929 Zellen kann kein PrP^{Sc} detektiert werden. Als weitere Kontrollversuche sollten zudem Versuche mit CTX und Transferrin durchgeführt werden, um die Blockierung der Aufnahmewege durch CHC- und Caveolin-siRNA auch funktionell zu bestätigen.

ERGEBNISSE

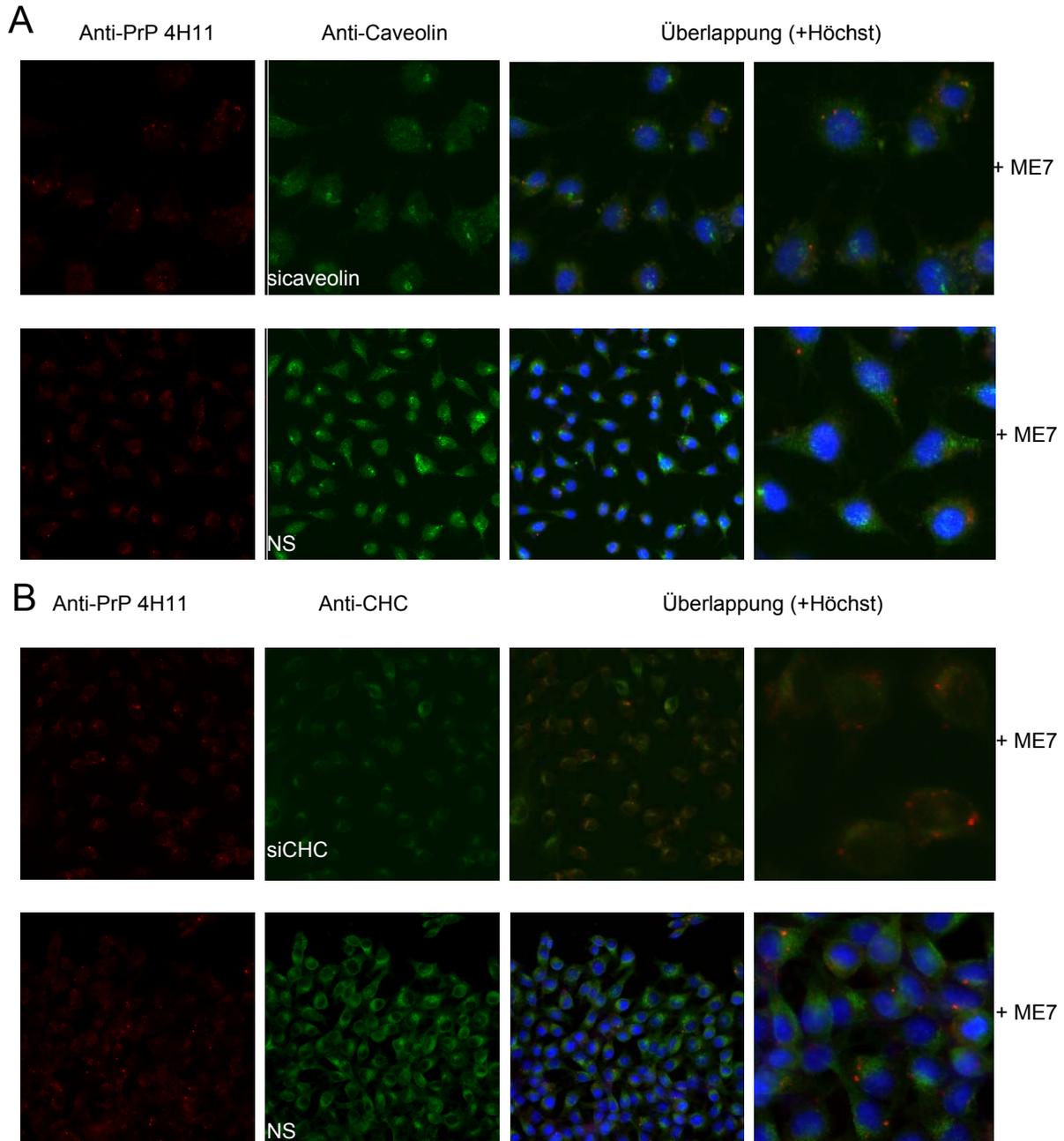


Abb. 48: Transfektion mit CHC- und Caveolin-siRNA vor akuter ME7-Infektion führt zu einer geringeren PrP^{Sc} Aufnahme in L929 Zellen. L929 Zellen wurden mit Caveolin- (Abb.48 A) oder Clathrin-siRNA (Abb.48 B) transfiziert. Als Kontrolle dienen L929 Zellen, welche mit einer NS-siRNA behandelt wurden. Nach 48 h wurden die L929 Zellen für 4 h mit RML-Hirnhomogenat inkubiert und im Anschluss fixiert, permeabilisiert und nach der Guanidiniumbehandlung (6 M GndHCl) mit anti-4H11 PrP inkubiert (linke Spalte, rot). Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt (3. Spalte, blau). Um den KO der verwendeten siRNAs nachzuweisen, wurden die Zellen mit anti-Caveolin und anti-CHC inkubiert (2. Spalte, grün).

6 *Diskussion*

6.1 *Cholesterol und PrP-Metabolismus*

Die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} findet vermutlich an der Zelloberfläche oder entlang des endozytotischen Transportweges statt. Interessanterweise sind diese Kompartimente auch Teil des Cholesteroltransports der Zelle (Caughey & Baron 2006). Tatsächlich ist Cholesterol für eine normale PrP^C Expression an der Zelloberfläche in neuronalen Zellen notwendig. Durch die Inhibierung der Cholesterolsynthese mit Hilfe von Mevinolin, einem HMGCoA-Reduktase Blocker (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A), konnte der Transport von PrP^C an die Zelloberfläche und eine Raft-Lokalisierung blockiert werden (Gilch *et al.*, 2005). Der Mangel an Cholesterol führt zu einer PrP^C-Ansammlung im sekretorischen Transportweg. Das betreffende intrazelluläre Kompartiment konnte mittels Immunfluoreszenzstudien durch einen Rab6-Antikörper als trans-Golgi-Apparat identifiziert werden (Gilch *et al.*, 2005). In mehreren Studien wurde durch den Einsatz pharmakologischer Substanzen, welche auf die Synthese oder Homöostase des Cholesterols einwirken, eine Verringerung des Cholesterollevels und damit einhergehend, eine PrP^{Sc}-Reduktion in persistent infizierten Zellen gezeigt (Taraboulos *et al.*, 1995; Bate *et al.*, 2004). Der Einsatz solcher Inhibitoren und die Untersuchung deren Wirkung in persistent infizierten Zellen sowie während einer akuten Prioninfektion, war Aufgabe dieser Arbeit. In einer Studie von Bach *et al.* wurden auch Unterschiede in der Cholesterolhomöostase zwischen uninfizierten und 22L-infizierten neuronalen Zellen nachgewiesen (Bach *et al.*, 2009). Interessanterweise scheint dies ein zelltypspezifisches Phänomen zu sein. Denn 22L- und RML-infizierte L929 Zellen zeigen keinerlei PrP^{Sc}-Reduktion nach einer transienten Blockade der Expression eines regulatorischen Transkriptionsfaktor der Cholesterolsynthese, Srebp2, im Gegensatz zu den erwähnten 22L-infizierten N2a Zellen (Bach *et al.*, 2009). In allen erwähnten Studien spielt bei der PrP^{Sc}-Bildung eine Veränderung des Cholesterolstoffwechsels oder der *Lipid Raft*-Zusammensetzung eine Rolle. Eine Anfälligkeit der Prionsynthese auf Veränderungen des Cholesterolgehalts, zumindest in neuronalen Zellen, wird vermutet. Deshalb wurde in dieser Arbeit besonders auf Unterschiede zwischen

neuronalen und nicht-neuronalen Zellen bei Behandlung mit Cholesterollowerändernden Substanzen während der persistenten sowie akuten Infektion geachtet.

6.2 Akute Infektion unterschiedlicher Zelllinien

In der Prionforschung konnten durch Zellkulturmodelle molekulare und zelluläre Voraussetzungen geschaffen werden, um Prioninfektionen zu analysieren. Es existieren neuronale und nicht-neuronale Zelllinien bzw. primäre Zellen, die mit Prionen infiziert wurden. Diese Zellkulturmodelle unterscheiden sich in der Empfänglichkeit gegenüber der Infektion mit verschiedenen Prionstämmen und der Eigenschaft, stabil oder nur vorübergehend (transient) mit Prionen infiziert werden zu können. Eine Prioninfektion lässt sich in drei Phasen einteilen: (1) Die direkte Aufnahme von PrP^{Sc} nach Prionkontakt, (2) eine akute Infektion mit Neubildung von PrP^{Sc} und (3) die Etablierung einer persistenten Infektion. Die direkte (1) PrP^{Sc} Aufnahme scheint zelltyp- und prionstammunabhängig zu sein, wobei eine PrP^C Expression nicht notwendig ist (Greil *et al.*, 2008). Die Unabhängigkeit gegenüber Prionstämmen während der akuten Aufnahme von PrP^{Sc} zeigt sich auch in der vorliegenden Arbeit. Die Immunfluoreszenzanalysen der direkten Aufnahme infizierten Hirnhomogenats machen deutlich, dass alle drei verwendeten Prionstämme (22L, RML und ME7) in L929 Zellen aufgenommen werden können. Jedoch führte die PrP^{Sc} Aufnahme nicht zwingend zu einer Etablierung der Prioninfektion (5.2.4, Abb. 46, 47, 48).

Die Internalisierungsgeschwindigkeit scheint von der jeweiligen Aggregatgröße des PrP^{Sc} abzuhängen. Diese variieren durch unterschiedliche methodische Behandlungen. Die Aufnahme (1) von PrP^{Sc} aus grob verarbeitetem Hirnhomogenat startet nach Minuten und läuft innerhalb weniger Stunden nach dem Prionkontakt ab (Vorberg *et al.*, 2004b; Goold *et al.*, 2011). Mit einer Infektionskinetik in Hpl3F4 Zellen konnte diese Tatsache in dieser Arbeit bestätigt werden. Eine Inkubationszeit des Hirnhomogenats von 3-4 h führte hier bereits zu einer detektierbaren 22L-Infektion in der 2. Passage (5.1.2, Abb. 26). Zudem konnte trotz der kurzen Inkubationszeit eine stabile Infektion in diesen Zellen mit dem 22L-Prionstamm in der 8. Passage nachgewiesen werden (Daten werden nicht gezeigt). Interessanterweise kann nur eine Subpopulation der zu infizierenden Zellen PrP^{Sc} aufnehmen und sich vermehren

(Greil *et al.*, 2008). Dies spricht für die erfolgreiche Infektion der L929 und MHM2 Zellen nach einer vorangegangenen Zellklonierung in dieser Arbeit (5.1.2, 5.1.3). Die meisten Zelllinien, die PrP^C exprimieren, können nicht persistent mit Prionen infiziert werden. Zudem ist die PrP^C-Menge nicht ausschlaggebend, um empfängliche Zelllinien zu generieren. Interessanterweise ist die Infektion mit humanen Prionstämmen effizienter, sobald die Prionen im Mausmodell adaptiert wurden (Vella *et al.*, 2007). Die Neuroblastomlinie N2a stellt eine der ersten *Scrapie*-empfindlichen Zelllinien dar, durch welche die zellbiologischen Eigenschaften des Prionproteins näher betrachtet werden konnten (Butler *et al.*, 1988; Race *et al.*, 1987; Borchelt *et al.*, 1992; Taraboulos *et al.*, 1994; Vey *et al.*, 1996). Die Untersuchungen der molekularen Grundlagen einer Prioninfektion wurden zudem fast ausnahmslos in bereits persistent infizierten Zellen durchgeführt. Jedoch können auch stabil infizierte Zellen ihre Infektiosität über mehrere Zellpassagen verlieren. Beispielsweise durch geänderte *in vitro* Bedingungen der Zellkultur oder genetische Heterogenität der Zellen (Kocisko & Caughey, 2006; Klohn *et al.*, 2003). Prioninfektionen von Zellkulturen sind aufgrund der niedrigen Konversionsrate von PrP^C zu PrP^{Sc}, die in etwa 5% beträgt, nicht sehr effektiv (Borchelt *et al.*, 1992). Aus diesem Grund wurden Zellen vor der Infektion subkloniert, um hochempfindliche Klone für die Prioninfektion zu generieren (Bosque & Prusiner, 2000; Klöhn *et al.*, 2003). Eine weitere Problematik stellt die Unterscheidung von neu synthetisiertem PrP^{Sc} und wirtskodierten PrP^{Sc} Inokulum dar. Durch die stabile Expression des 3F4-Epitop-markierten Maus-PrP in den zu analysierenden Zellen, ist eine Unterscheidung jedoch möglich. Mit Hilfe des Antikörper-epitop-markierten PrP^C in Zellkultur ist es gelungen, neu gebildetes PrP^{Sc} bereits 24h nach der Infektion nachzuweisen (Vorberg *et al.*, 2004b). Daher kann die Differenzierung von neu gebildetem PrP^{Sc} der Zellen ebenso, wie in dieser Arbeit, indirekt durch die Passagendauer erfolgen. Des Weiteren konnte 3F4-markiertes PrP^{Sc} transgener, prioninfizierter Mäuse für Studien der zellulären Aufnahme von Prionen erfolgreich verwendet werden (Greil *et al.*, 2008). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, sich die biochemischen Eigenschaften des PrP^{Sc} zu Nutze zu machen und durch denaturierende Substanzen, wie Guanidiniumhydrochlorid, PrP^{Sc} beispielsweise in der Immunofluoreszenz (Abb. 45-48) zu detektieren (Taraboulos *et al.*, 1990b). Um neben der Aufnahme auch den Transport innerhalb der Zelle untersuchen zu können, haben Magalhaes und

Mitarbeiter aufgereinigte Prionen-Fibrillen fluoreszenzmarkiert. Interessanterweise zeigen diese markierten Prionen Unterschiede in der zellulären Aufnahme gegenüber unmarkiertem PrP^{Sc} aus Hirnhomogenat (Magalhaes *et al.*, 2005). Diskrepanzen, wie sie durch Fluorezenzmarkierung aufgetreten sind, sind bisher mit 3F4-markierten PrP^C oder PrP^{Sc} nicht bekannt, können jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Diese potentielle Problematik besteht bei der indirekten Differenzierung über die Passagendauer nicht. Jedoch kann mit dieser Methode die erste Phase der Prion-Aufnahme nicht dokumentiert werden, da das PrP^{Sc} aus dem Inokulum nicht signifikant differenziert werden kann.

Neben Zelllinien wurden ebenso primäre Granularisneuronen aus dem Zerebellum (*cerebellar granular cells*, CGN) verwendet, welche für verschiedene Prionstämme von drei Spezies empfänglich sind (Cronier *et al.*, 2004; 2007). Zudem existieren Zelllinien, welche nicht detektierbare Mengen an PrP^C aufweisen, wie beispielsweise Epithelzellen aus dem Kaninchen (RK13). Vilette *et al.* konnten 2001 zum ersten Mal zeigen, dass die nicht-neuronale Zelllinie RK13, die mit Schaf-PrP^C stabil transfiziert wurde, mit Schaf-*scrapie* infiziert werden konnte (Vilette *et al.*, 2001). Um eine 100%ige Deletion des Prionproteins zu gewährleisten, wurde eine Hpl3-4 Zelllinie aus dem Hippocampus einer *Prnp*-KO-Maus generiert. Hpl3-4 Zellen wurden retroviral mit Maus-PrP transduziert und konnten mit 22L Prionen infiziert werden (Maas *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit durchgeführte Infektionskinetik in 3F4-transduzierten Hpl Zellen konnte die Infizierbarkeit dieser Zellen mit 22L-Prionen bestätigen. Hpl3F4 Zellen konnten sich bislang nicht mit unterschiedlichen Prionstämmen infizieren lassen und wurden daher in dieser Arbeit nicht als neuronale Vergleichszelllinie verwendet. Murine L929 Fibroblasten (Vorberg *et al.*, 2004a) und Pheochromocytom Zellen aus der Ratte PC12 (Rubenstein *et al.*, 1984) sind weitere Beispiele für nicht-neuronale Zellkulturmodelle in der Prionforschung. Diese Vorkenntnisse im Bereich der Zellklonierung machten es möglich in dieser Arbeit die Fibroblastenzelllinie L929 mit den Prionstämmen 22L, RML und ME7 akut und persistent zu infizieren (Abb. 26, 31). Der 3F3-Epitop exprimierende MHM2-Klon K21, der in eigenen Vorarbeiten subkloniert wurde, konnte zudem mit den zwei Prionstämmen 22L und RML effizient infiziert werden. Die Ergebnisse einer vorangegangenen Diplomarbeit zeigten, dass *de novo* produziertes PrP^{Sc} im MHM2-Klon K21 bereits nach 96 h nachzuweisen war. Im Unterschied zu Studien von

Vorberg *et al.* war die Infektion zudem persistent in den Zellen etabliert (Vorberg *et al.*, 2004b). Die Frage bezüglich der Empfänglichkeit spezieller Zelllinien für bestimmte Prionstämme ist bislang nicht hinreichend geklärt. Jedoch könnten Unterschiede in der Zellbiologie während der Replikation der Prionstämme ausschlaggebend für dieses Phänomen sein. Ziel dieser Arbeit war durch die Verwendung solcher neuer Zellkultursysteme die Vorgänge während der akuten Infektion insbesondere mit unterschiedlichen Prionstämmen genauer zu charakterisieren (Abb. 27, 28).

6.3 Die Wirkung von Nystatin zeigt eine ausgeprägte Prionstammspezifität

Viele der bereits in Zellkulturversuchen verwendeten Inhibitoren beeinflussen auf unterschiedliche Weise die Prion-Akkumulierung. Unter anderem wurden bereits Substanzen untersucht, die die Cholesterolsynthese beeinflussen. Beispielsweise Lovastatin, das in ScN2a Zellen, die persistent mit RML-Prionen infiziert sind, die PrP^{Sc} Bildung verhindern konnte (Taraboulus *et al.*, 1995). Da sowohl PrP^C als auch PrP^{Sc} in N2a Zellen in cholesterolhaltigen *Lipid Rafts* lokalisieren, sind Inhibitoren, welche auf jegliche Art auf den Cholesterolfstoffwechsel einwirken, interessant für die Erforschung eines möglichen Konversionsortes. Nystatin, ein Antimykotikum, entfernt das Cholesterin aus der Membran, komplexiert es und zerstört so zudem Caveolae (Shyng *et al.*, 1994). Dies führt primär zu einer Erhöhung der Membranpermeabilität (Gross & Gross, 1972). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass es bei Behandlung mit Nystatin zur Ansammlung von glykolipidverankerten Rezeptoren an der Oberfläche von Epithelzellen kommt (Rothberg *et al.*, 1990). Diese Blockierung der Caveolae resultiert ebenso in einer verminderten Aufnahme von PrP^C in neuronalen Zellen (Kang *et al.*, 2009). Pelkmans *et al.* konnten mittels Nystatin in Kombination mit Progesteron die Infektionsrate des Simian Virus 40 (SV40) bis zu 95% minimieren (Pelkmans *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nystatin bei der Behandlung von persistent RML-infizierten ScMHM2 Zellen eine PrP^{Sc} Akkumulierung bewirkt, jedoch keine Effekte auf persistent 22L-infizierte ScMHM2 Zellen hat (5.1.3, Abb. 31). Deutlicher wird diese Prionstammspezifität, wenn man die Wirkung von Nystatin in

L929 Zellen betrachtet. Wird in den neuronalen MHM2 Zellen die RML-PrP^{Sc} Akkumulierung noch verstärkt, weisen 22L-infizierte L929 Zellen kaum eine Reaktion auf. Dagegen wird die PrP^{Sc} Akkumulierung in der ME7-Infektion fast völlig unterbunden (5.1.3, Abb. 30). Auch während der akuten Infektion scheint Nystatin eine Prionstammspezifität zu zeigen. In L929 Zellen kommt es durch Nystatin während der akuten Infektion zur Reduktion der PrP^{Sc} Akkumulierung, wobei der deutlichste Effekt beim Prionstamm ME7 zu erkennen ist (5.1.2, Abb. 26). Die RML-PrP^{Sc} Akkumulierung wird in MHM2 Zellen vermindert, dagegen wird die akute 22L-Infektion nicht beeinträchtigt (5.1.2, Abb. 27). Aufgrund dieser Daten kann vermutet werden, dass Nystatin nicht zelltypspezifisch agiert, jedoch sowohl während akuter als auch persistenter PrP^{Sc} Akkumulierung eine Wirkung erzielen kann. Im Vergleich zu den anderen verwendeten Inhibitoren, stellt es die einzige pharmakologische Substanz dar, welche neben der akuten RML-Infektion in MHM2 Zellen, akute und persistente ME7-Infektionen in L929 Zellen hemmen kann (Abb. 27 B, 26 A und 30 A). Des Weiteren fallen die entgegengesetzten Effekte von Nystatin bezüglich akuter und persistenter RML-Infektion auf. Im Gegensatz hierzu ist die Wirkungsweise auf den PrP^{Sc} Gehalt in der 22L-Infektion im akuten oder persistenten Fall immer die gleiche (Tabelle 8).

Aus vorangegangenen Ergebnissen ergibt sich daher die folgende Hypothese. Eine akute RML-Infektion kann innerhalb der Zelle nur entstehen, wenn die Endozytose über intakte und funktionsfähige *Rafts* möglich ist. Sobald sich eine persistente RML-Infektion in der Zelle etablieren konnte, scheint das Entfernen des Cholesterins aus der Membran für eine Endozytose nicht mehr von entscheidender Bedeutung zu sein, da es zu einer PrP^{Sc} Akkumulierung durch den Einsatz von Nystatin in dieser Phase der Infektion kommt. Dagegen scheinen für die 22L-Infektion funktionsfähige, cholesterolreiche *Lipid Rafts*, welche durch den Einsatz von Nystatin zerstört wurden, für die Endozytose nicht essentiell zu sein. ME7 scheint sehr stark abhängig von intakten *Lipid Rafts* zu sein, da durch die Zugabe von Nystatin die effektivste Inhibierung der PrP^{Sc} Akkumulierung des ME7-Prionstammes erkennbar ist.

6.4 Progesteron wirkt in Abhängigkeit von Zelltypen sowie von akuter und persistenter Infektion in L929 Zellen

Progesteron inhibiert die Cholesterolsynthese, indem es die Cholesterolveresterung im rauhen ER blockiert und zudem den Cholesteroltransport zwischen Plasmamembran und internen Membranen wie Lysosomen und dem ER erschwert (Lange, 1994; Smart *et al.*, 1996; Sviridov *et al.*, 2001). Durch den Einsatz von Progesteron löst sich Caveolin-1 aus der Membran und akkumuliert in der Zelle, wobei auch das mit Caveolae-assoziierte Cholesterin reduziert wird (Thomas & Smart, 2008). Daher verringert sich die Menge an Caveolae und *Rafts*. Neu synthetisiertes Cholesterin kann durch die Blockierung des Cholesteroltransports nicht in den Caveolae eingebaut werden, was zu einem Rückgang des Cholesterins in den Caveolae, jedoch nicht in der restlichen Plasmamembran, führt (Thomas & Smart, 2008). Fu *et al.* zeigten, dass durch die Überexpression von Caveolin-1 in Hepatozyten der Cholesterolefflux durch den erhöhten Transfer des Cholesterols zu cholesterolreichen Domänen in der Plasmamembran stimuliert wird. Progesteron unterbindet diesen Cholesterolefflux (Fu *et al.*, 2004). Klingenstein *et al.* konnten zudem Anti-Prion Effekte des Progesterons dokumentieren (Klingenstein *et al.*, 2006). Sie zeigen, dass Progesteron zum einen zu einer Cholesterolanhäufung im endosomalen/lysosomalen System in RML-infizierten ScN2a Zellen führt. Zum anderen kann Progesteron in diesen Zellen eine Reduktion des PrP^{Sc}-Gehalts bewirken (Klingenstein *et al.*, 2006). Des Weiteren inhibiert Progesteron in RML-infizierten ScN2a Zellen die PrP^{Sc} Akkumulierung in vergleichbaren Konzentrationen, die pharmakologisch zur Induzierung von einer zellulären „*lipid storage disease*“ führen (Butler *et al.*, 1992).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Progesteron weder in persistent infizierten 22L- noch in persistent infizierten RML-ScMHM2 Zellen eine PrP^{Sc} Akkumulierung zulässt (5.1.3, Abb. 31), was die Ergebnisse von Klingenstein *et al.* bestätigt. Auch während der akuten Infektion mit 22L in MHM2 Zellen kann eine inhibitorische Wirkung von Progesteron nachgewiesen werden (5.1.2, Abb. 27). Interessanterweise konnte in L929 Zellen während der akuten Infektion mit den Prionstämmen 22L, RML und ME7 eine erhöhte PrP^{Sc} Akkumulierung nach Progesteronzugabe nachgewiesen werden (5.1.2, Abb. 26). In Anbetracht dieser

Daten, scheint Progesteron keine Prionstammsspezifität zu besitzen. Jedoch weisen die Unterschiede in der PrP^{Sc} Akkumulierung während der Inkubation mit Progesteron auf einen zelltypabhängigen Einfluss hin. Des Weiteren scheint Progesteron nur in akut infizierten L929 Zellen zu wirken, nicht in persistent infizierten L929 Zellen.

MHM2 Zellen scheinen sehr sensitiv auf die Cholesterolumverteilung in der Zelle und auf die Blockade des Cholesteroltransports vom ER und den Lysosomen zur Zellmembran zu reagieren. Denn die PrP^{Sc}-Akkumulierung in den MHM2 Zellen, bis auf eine Ausnahme der akuten RML-Infektion, wird durch die Inkubation von Progesteron verringert. Im Gegensatz dazu weisen L929 Zellen durch die Neuverteilung des Cholesterols eine stark erhöhte PrP^{Sc} Akkumulierung während der akuten Infektion aller drei Stämme auf. Es liegt die Vermutung nahe, dass nach der Etablierung einer persistenten Infektion in L929 Zellen, der Einfluss der intrazellulären Cholesterolmenge auf die PrP^{Sc}-Konversion geringer wird. Denn die persistente Infektion in L929 Zellen wird nicht von Progesteron beeinträchtigt. Insbesondere wäre die Zugabe von Progesteron während einer akuten ME7-Infektion, welche erfahrungsgemäß *in vitro* sehr schwierig durchzuführen ist, eine Möglichkeit, eine persistente ME7-Infektion zu erreichen. Da sich der Progesteroneffekt bezüglich des Cholesterols nach dem Entfernen der Substanz normalisieren müsste, wäre dies ein hilfreiches Mittel für akute und persistente Infektionen *in vitro* und sollte weiter untersucht werden.

6.5 Filipin inhibiert die PrP^{Sc} Akkumulierung nur in persistent infizierten Zellen

Eine weitere Substanz, die bekannt dafür ist, die Aufnahme über Caveolae zu inhibieren (Rejman *et al.*, 2005), ist das Polyenantibiotikum Filipin. Filipin bildet Komplexe mit Cholesterin, wobei das Cholesterol aus der Zellmembran herausgelöst wird. Hierdurch wird eine Endozytose über *Rafts* in diesen Bereichen unterbunden. Experimente von Peters *et al.* wiesen darauf hin, dass die PrP^C-Assoziation mit Caveolae cholesterolabhängig ist, da Filipin die PrP-Immunoreaktivität in Caveolae erniedrigen kann (Peters *et al.*, 2003). Bei der Zugabe von Filipin konnten Marella *et al.* in N2a und humanen Mikrogliazellen einen erhöhten Efflux von PrP^C von der

Plasmamembran in das Zellkulturmedium nachweisen (Marella *et al.*, 2002). Des Weiteren erbrachten sie einen Beweis für die Effektivität des Filipins als PrP^{Sc} Inhibitor in persistent RML-infizierten N2a Zellen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Filipin die PrP^{Sc}-Akkumulierung in persistent RML-infizierten ScMHM2 Zellen effektiv unterbindet. Dagegen sind keine Effekte in 22L-infizierten ScMHM2 Zellen oder während akuter Infektion der neuronalen Zellen erkennbar (Abb. 28, 32). Die Wirkung des Filipins auf persistent RML-infizierte ScMHM2 Zellen bestätigt die Ergebnisse von Marella *et al.* (Marella *et al.*, 2002). Diese Prionstammspezifität zeigt sich jedoch nicht in L929 Zellen. Der PrP^{Sc} Gehalt in persistent RML-infizierten L929 Zellen wird durch die Zugabe von Filipin, im Gegensatz zu den MHM2 Zellen, erhöht (5.1.3, Abb. 31 C, 32 B). Diese vermehrte PrP^{Sc}-Akkumulierung zeigt sich ebenso bei akuter Infektion von 22L- und ME7-Prionen in L929 Zellen (5.1.2, Abb. 27 A, B). Für die persistente RML- und 22L-Infektion scheint die Filipinbehandlung in L929 Zellen sogar von Vorteil für die Konversion zu sein (5.1.3, Abb. 31 B, C). Interessanterweise zeigt sich während der Komplexbildung mit Cholesterin durch Filipin nur in persistent infizierten ScMHM2 (RML) und L929 Zellen (22L) eine inhibierende Wirkung auf die PrP^{Sc}-Anhäufung (5.1.3, Abb. 31 B, 32 B). Filipin hat daher möglicherweise nicht nur einen prionstammspezifischen Effekt, sondern auch eine zelltypabhängige Wirkung. Wie bereits erwähnt, reagieren die verwendeten neuronalen Zellen sensitiver auf den jeweiligen Verlust des Cholesterols (Tabelle 8).

Zusammenfassend konnten verschiedene Aussagen über persistente und akute Infektionen, über stammspezifische und zellartspezifische Phänomene gemacht werden. Mit Hilfe der verwendeten cholesterolreduzierenden Substanzen, die die Endozytose auf unterschiedliche Arten manipulieren, könnte folgende Hypothese aufgestellt werden. Verschiedene Endozytosewege scheinen wichtig für die Etablierung einer persistenten Infektion zu sein. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung bekräftigt, dass die PrP^{Sc}-Aufnahme unabhängig von verschiedenen Prionstämmen auch in Zellen zu detektieren war, in denen keine persistente Infektion etabliert werden konnte. Eine transiente, akute Infektion führt *in vitro* nicht automatisch zu persistent infizierten Zellen (Vorberg *et al.*, 2004b). Diese Erkenntnisse zeigen nicht nur die Relevanz solcher Inhibitorentests auf, sondern machen sehr deutlich, dass die Erforschung der Zellbiologie der Prioninfektion

essentiell für das Verständnis des Zusammenspiels zwischen Zellen und verschiedenen Prionenstämmen ist.

6.6 Die Rolle der Rab-GTPasen in Bezug auf die PrP^{Sc}

Akkumulierung

Um möglicherweise unbekannte Wirkungsweisen der chemischen Substanzen zu umgehen und klare Aussagen über die Internalisierung und den Transportweg von PrP^{Sc} unterschiedlicher Prionstämmen während akuter und persistenter Infektionen treffen zu können, wurde in dieser Arbeit ein weiterer großer Fokus auf die Möglichkeit einer transienten Blockierung diverser Rabproteine gelegt.

Massignan *et al.* zeigten in den letzten Jahren einen Zusammenhang zwischen der PrP-Mutation D178N/M129 - eine Mutation der FFI - und einem Rabprotein (Massignan *et al.*, 2009). Das mutierte PrP sammelte sich im Golgi-Apparat und dem ER in uninfizierten N2a Zellen an, was zu einer Verringerung der Rab11-Funktion, dem Vesikeltransport an der Grenze zwischen TGN und RE und dem endosomalen Recycling, führte. Experimente von Bèranger *et al.* gaben bereits Hinweise auf die Beteiligung der Endozytose bzw. des intrazellulären Transports an der Konversion von PrP^{Sc} in persistent infizierten Zellen (Bèranger *et al.*, 2002). In diesen Studien wurden dominant-positive und dominant-negative Mutanten von Rabproteinen, welche in spezifischen subzellulären Kompartimenten lokalisiert sind, exprimiert. Deren Effekte auf PrP^{Sc} der N2a Zellen und mögliche Konversionsorte von PrP^C zu PrP^{Sc} zu definieren, war ein Ziel deren Arbeit. Sie konnten zeigen, dass durch die Expression einer dominant-negativen Rab4-Mutante oder einer konstitutiv aktivierten Rab6-Mutante eine Erhöhung des PrP^{Sc} Gehalts in 22L und RML infizierten ScN2a Zellen zu detektieren war. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der retrograde Transport von PrP^C durch das ER zu einer PrP^{Sc} Akkumulierung führt und daher vermutlich eine wichtige Rolle in der PrP^{Sc} Bildung einnimmt (Bèranger *et al.*, 2002). Durch Verwendung solcher Rab-Mutanten oder einer transienten siRNA-Transfektion diverser Rabproteine lassen sich bestimmte Transportwege inhibieren und deren Rolle für die Konversion näher betrachten.

Um zu untersuchen, auf welche Vesikeltransportwege der Erreger während einer akuten Infektion der Zelle angewiesen ist, sollte die Rolle der Endozytose und des zellulären Vesikeltransports genauer betrachtet werden. In den Abbildungen 48, 49, 50 ist der zelluläre Vesikeltransport und die Lokalisation verschiedener Rabproteine dargestellt, welche in dieser Arbeit durch die Blockierung mittels siRNA untersucht wurden. Durch die Etablierung der Methode, ein transientes Ausschalten ausgesuchter Rabproteine mittels siRNA mit einer akuten Infektion drei verschiedener Prionstämme in L929 Zellen zu kombinieren, war es möglich, neue Einblicke in die frühen Phasen einer Prioninfektion zu bekommen. Zudem konnte der Vesikeltransport der unterschiedlichen Prionstämme 22L, RML und ME7 bezüglich der PrP^{Sc} Akkumulierung genauer betrachtet werden.

Die akute ME7-Infektion unterscheidet sich von den anderen Prionstämmen 22L und RML bezüglich der frühen Phase der Endozytose. Denn der direkte Rücktransport von den EEs über Rab4 scheint einen essentiellen Schritt in der ME7-Infektion darzustellen. Durch die Blockierung der Expression von CHC konnte gezeigt werden, dass der Clathrin-vermittelte Endozytoseweg für eine ME7-Infektion relevant ist (Abb. 40 A). Der Transportweg in LEs ist für ME7-Prionen nicht von großer Bedeutung, da die Inhibierung des Rab7-Transportwegs zu keiner signifikanten Reduzierung der PrP^{Sc} Akkumulierung führt. ME7-Prionen scheinen zudem die Wege ins TGN und den REs für PrP^{Sc} Ansammlung nicht zu benötigen, da die akute PrP^{Sc} Akkumulierung nach dem KO der GTPasen Rab9 und Rab11 interessanterweise im Vergleich zur Kontrollreaktion erhöht ist (Abb. 44 A, 45 A). In Versuchen von Gilch *et al.*, konnte durch eine Überexpression des Rab9-Proteins zum einen der PrP^{Sc} Gehalt neuronaler Zellen verringert werden. Zum anderen konnte die verminderte PrP^{Sc} Anreicherung, die durch eine Cholesterollakkumulierung im späten endozytotischen Systems durch die Inkubation von U18666A induziert wurde, durch Rab9 Überexpression vermindert werden (Gilch *et al.*, 2009). Diese Experimente könnten Hinweise auf die PrP^{Sc} Akkumulierung von ME7 und 22L während des Ausschaltens der Rab9 Expression in dieser Arbeit sein.

Zusammenfassend kann man sagen, dass ME7 als einziger getesteter Prionstamm besonders auf den Rab4-vermittelten Transport angewiesen ist. Ob ME7-Prionen auch in den verschiedensten Zellorganellen, insbesondere in EEs und LEs, replizieren, bleibt unklar. In einem ersten Schritt könnten in Ko-Lokalisierungsstudien

mit speziellen Vesikelmarkerproteinen durchgeführt werden, dass PrP^{Sc} direkt in den Organellen enthalten ist. Im Falle von ME7 könnte man beispielsweise GFP-markierte Rab4-Konstrukte transfizieren oder spezielle Marker für frühe Endosomen, wie den EEA1-Antikörper, einsetzen, um die betreffenden Organelle nach der akuten ME7-Infektion zu markieren.

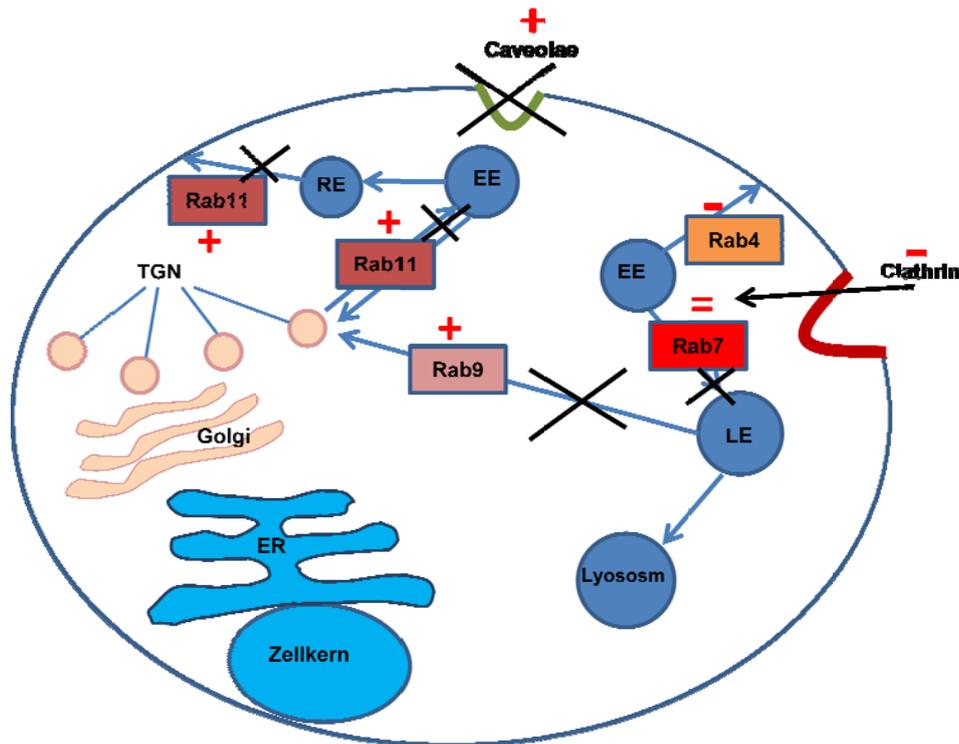


Abb. 48: Akute ME7-Infektion von L929 Zellen. +, – und = zeigen die PrP^{Sc} Akkumulierung während des KOs des jeweiligen Rab- oder Endozytose-Proteins. Durchgestrichene Wege stehen für eine PrP^{Sc} Akkumulierung trotz Inhibierung der speziellen Proteine. Daher scheinen diese Transportwege für die PrP^{Sc} Akkumulierung nach einer ME7-Infektion nicht essentiell zu sein. frühe Endosomen (EE), späte Endosomen (LE), Recycling Endosomen (RE), Trans-Golgi Netzwerk(TGN), endoplasmatisches Retikulum (ER)

Im Vergleich hierzu scheint eine akute RML-PrP^{Sc} Ansammlung in L929 Zellen durch eine Endozytose von Caveolae abzuhängen (Abb. 41 C, 49). Interessanterweise bewirkt eine Reduzierung der CHC Expression sogar eine Zunahme der RML-PrP^{Sc} Menge. Zudem ist der Transport in LEs mittels Rab7 essentiell für die PrP^{Sc}-Akkumulierung (Abb. 43 C). Der Recyclingprozess, ob über Rab4 oder Rab11, scheint keinerlei Einfluss auf die Anhäufung von PrP^{Sc} während der RML-Infektion in L929 Zellen zu haben. Dies würde im Widerspruch zu den von Bèranger publizierten Daten stehen, die eine verstärkte PrP^{Sc} Akkumulierung während Expression einer

dominant-negativen Rab4-Mutante beschreiben (Béranger *et al.*, 2002). Da diese Versuche jedoch in neuronalen Zellen durchgeführt wurden, könnte dies der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Die Verwendung von neuronalen Zellen könnte auch bei Marijanovic *et al.* die Erklärung für die abweichenden Daten bezüglich des ERC Kompartiments sein. Deren Studien zeigten in drei Zelllinien unterschiedlichen neuronalen Ursprungs, dass der Rab22-abhängige Transport von den EEs zum ERC wichtig für die PrP^{Sc}-Produktion ist. Die höchste PrP^{Sc}-Menge wurde in allen drei neuronalen Zelllinien, die jeweils mit einem anderen Prionstamm stabil infiziert waren, im ERC detektiert. Daher weist die Lokalisierung des PrP^{Sc} in der persistenten Prioninfektion auf einen zelltyp-unabhängigen Konversionsort bezüglich neuronaler Zellen unterschiedlichen Ursprungs hin (Marijanovic *et al.*, 2009). Rab11-siRNA Versuche zeigten in den Experimenten dieser Arbeit keine Reduzierung in der PrP^{Sc}-Akkumulierung. Da Rab11 jedoch auch Transportwege in das endosomale Recycling Kompartiment vermittelt, hätte man eine Reduzierung im PrP^{Sc}-Gehalt erwarten können. Ein Grund könnte, wie bereits erwähnt, die Verwendung neuronaler Zelllinien sein. Da in dieser Arbeit für die Rabproteinanalysen nicht-neuronale L929 Zellen verwendet worden sind, können diese Daten nur schwer verglichen werden. Des Weiteren könnte der Rab22-vermittelte Transportweg zum ERC unabhängig von Rab11 reguliert werden. Zudem haben Marijanovic *et al.* zwar unterschiedliche Prionstämme verwendet, jedoch waren die neuronalen Zellen mit diesen bereits persistent infiziert. Dies stellt einen großen Unterschied zur vorliegenden Arbeit dar, in welcher die Studien während akuter Infektionen vorgenommen wurden. Dass deutliche Unterschiede in persistent infizierten Zellen im Vergleich zur akuten Infektion existieren, wurde durch die Inhibitorentests dieser Arbeit verdeutlicht. Der Transportweg zum TGN scheint nicht wichtig für die PrP^{Sc}-Akkumulierung der RML-Prionen zu sein, da eine Blockierung von Rab9 keinen Effekt auf die PrP^{Sc} Menge hat (Abb. 44 C). Da bei einer akuten RML-Infektion in L929 Zellen besonders das späte endosomale System essentiell zu sein scheint, könnte in einem weiteren Ko-Lokalisierungsversuch, eine RML-PrP^{Sc} Akkumulierung in LEs und Lysosomen nachgewiesen werden. Eine Ko-Färbung mit Antikörpern gegen den Mannose-6-Phosphat Rezeptor (MRP), einem Marker des späten endosomalen Systems, oder LAMP-1, ein Protein, das zudem in Lysosomen exprimiert wird, könnten zu einem direkten Nachweis herangezogen werden.

DISKUSSION

blockiert wird. So wäre es möglich, dass endozytierte 22L-Prionen länger in den EEs verbleiben, was zu einer erhöhten PrP^{Sc}-Akkumulierung führen würde (Abb. 42 B). Diese Daten bestätigen die Experimente von Bèranger *et al.* bezüglich der PrP^{Sc} Akkumulierung bei der Verwendung von dominant-negativen Rab4-Mutanten. Des Weiteren scheint der Weg über Rab7 zu den LE und den Lysosomen die PrP^{Sc} Ansammlung zu begünstigen, da eine Blockierung der Rab7 Expression zu einer erheblichen Verminderung des infektiösen Agens der 22L-Infektion führt (Abb. 43 B). Da das Unterbinden des Transport von den LEs hin zum TGN durch Rab9 zu einer Erhöhung der PrP^{Sc}-Menge führt (Abb. 44 B), liegt die Vermutung nahe, dass es durch einen längeren Aufenthalt der 22L-Prionen im endosomalen Kompartiment der EEs und LEs zu einer erhöhten Akkumulierung von PrP^{Sc} kommen könnte. Eine direkte Interaktion von Rab7 und PrP^C konnte bereits in neuronalen HpL3-4 Zellen mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Hierbei konnte durch das Ausschalten der Rab7 Expression ebenso eine erhöhte PrP^C-Akkumulierung in Rab9-positiven Vesikeln gezeigt werden (Zafar *et al.*, 2011.) Dies könnte den vermehrten PrP^{Sc} Gehalt nach der Rab9 Blockierung in dieser Arbeit erklären. Das endosomale Recycling durch Rab11 hat keinen Einfluss auf eine akute 22L-Infektion (Abb. 45 B). Um die 22L-PrP^{Sc}-Akkumulierung direkt im späten endosomalen System zu lokalisieren, wäre eine Ko-Färbung mit Antikörpern wie MPR oder LAMP-1, ein Protein das neben späten Endosomen auch in Lysosomen zu finden ist, möglich.

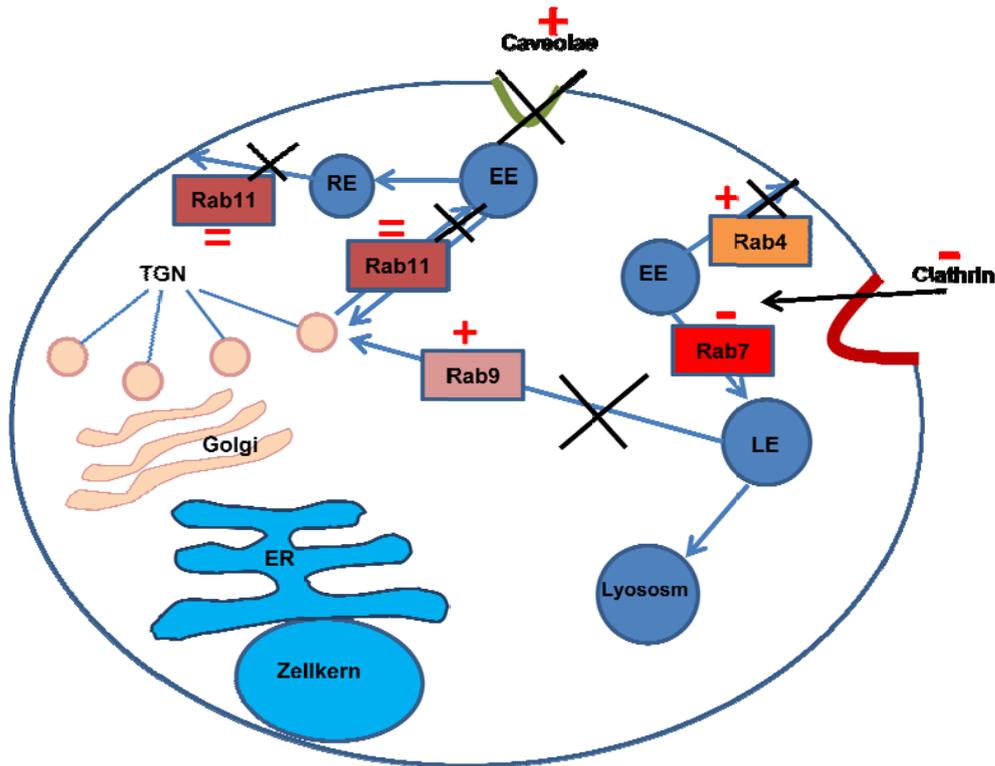


Abb. 50: Akute 22L-Infektion von L929 Zellen. +, – und = zeigen die PrP^{Sc} Akkumulierung während des KOs des jeweiligen Rab- oder Endozytose-Proteins. Durchgestrichene Wege stehen für eine PrP^{Sc} Akkumulierung trotz Inhibierung der speziellen Proteine. Daher scheinen diese Transportwege für die PrP^{Sc} Akkumulierung nach einer 22L-Infektion nicht essentiell zu sein. frühe Endosomen (EE), späte Endosomen (LE), Recycling Endosomen (RE), Trans- Golgi Netzwerk(TGN), endoplasmatisches Retikulum (ER)

Wenn man diese Ergebnisse zusammenfassend betrachtet, scheint die 22L-Infektion in L929 Zellen, ebenso wie der Prionstämme RML, insbesondere das Rab7-vermittelte, späte endosomale System zu nutzen. Der Prionstamm ME7 scheint den Recyclingprozess, der über Rab4 reguliert wird, ausgehend von den EEs zur PrP^{Sc} Akkumulierung zu benötigen. 22L- und ME7-Prionen scheinen eher den Clathrin-vermittelten Weg zu bevorzugen. Dagegen ist die RML-Infektion eher von Caveolin abhängig. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Inhibierung der Transportwege durch das Ausschalten der Expression der Rabproteine, Einfluss auf die PrP^{Sc}-Akkumulierung nach der Infektion in L929 Zellen hat. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Blockierung der Rabproteine zusätzlich einen Einfluss auf PrP^C, den Transport unterschiedlichster Kofaktoren oder auch der Cholesterolverteilung

innerhalb der Zellen hat. Ebenso könnten diese Faktoren auch zusammen mit den Rab- und Endozytoseproteinen Einfluss auf die PrP^{Sc}-Akkumulierung haben. Diese Punkte werden im folgenden Kapitel näher betrachtet.

6.7 Führen unterschiedliche Transportwege zu einer stabilen Infektion verschiedener Prionstämme?

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass PrP^{Sc} auch von Zellen aufgenommen werden können, die nachweislich keine stabile Prioninfektion etablieren (Horonchik et al., 2005; Gauczynski et al., 2006). Dies führt zu der Annahme, dass notwendige Aufnahmemechanismen und potentielle Rezeptoren auch in nicht infizierbaren Zellen vorhanden sind. Zudem konnte gezeigt werden, dass die PrP^{Sc} Aufnahme von grob verarbeitetem Hirnhomogenat effizienter zu sein scheint, als die Aufnahme von aufgereinigtem PrP^{Sc} (Greil et al., 2009). Dies lässt vermuten, dass auch das Mikromilieu die Prioninfektion zu beeinflussen scheint. Die Effekte, die durch das Ausschalten der Expression diverser Rabproteine auf die PrP^{Sc}-Akkumulierung hervorgerufen wurden, könnten teilweise aus einer Veränderung des PrP^C Transports resultieren. Hinweise hierfür zeigten sich beispielsweise bei der intrazellulären PrP^C Färbung, dass das zelluläre PrP^C durch die Blockierung der CHC Expression leicht erniedrigt war. Hingegen kommt es bei der Ausschaltung der Rab4, 7, 9, 11 und Caveolin Expression zu einer leichten Erhöhung der totalen PrP^C-Menge (Abb. 36, 37). Ein Einfluss auf weitere Kofaktoren, die an der PrP^{Sc}-Konversion oder Akkumulierung beteiligt sind, können ebenfalls nicht von der Hand gewiesen werden. So können z.B. Bestandteile der *Lipid Rafts*, in welchen PrP^C und PrP^{Sc} lokalisieren (Critchley et al., 2004), wie Cholesterol und Sphingolipide durch den *Knockdown* in irgendeiner Art und Weise manipuliert worden sein. Auch Glykosaminglykane (GAG), wie Heparansulfat oder Glypican-1, die ebenfalls an der Zelloberfläche lokalisiert sind und nachweislich an der PrP^{Sc}-Konversion beteiligt sind (Caughey B & Baron GS, 2002), können von der Blockierung der CHC- und Caveolin-Expression beeinflusst worden sein (Hooper M., 2011). PrP^C könnte zudem als Rezeptor bei der PrP^{Sc} Aufnahme dienen. Desweiteren könnte der LRP1 Rezeptor die Bindung und Aufnahme von PrP^{Sc} beeinflussen. Denn Studien in PrP^{0/0}-Neuronen im Vergleich zu WT-Neuronen konnten mit Hilfe von siRNA und inhibitorischen Substanzen gegen

den LRP1 Rezeptor eine verminderte Internalisierung von PrP^{Sc} zeigen (Jen *et al.*, 2010). Des Weiteren sind Proteine wie Tubulin, Aktin, GAPDH und HSP90 bekannte PrP^{Sc}-Interaktionspartner, die praktisch ubiquitär vorhanden sind (Nieznananski *et al.*, 2005; Ramljak *et al.*, 2008; Malaga-Trillo *et al.*, 2009; Giorgi *et al.*, 2009). Diese Proteine regeln den Transport durch die Zelle (Zytoskelett), den Zellmetabolismus und die Proteinfaltung (Zafar *et al.*, 2011). Auch diese Interaktionspartner könnten zum einen durch die Blockierung diverser Transport- oder Endozytoseproteine beeinträchtigt worden sein. All diese Faktoren könnten jedoch auch zusammen mit Caveolin, Clathrin und diversen Rabproteinen eine gemeinsame Wirkung auf die PrP^{Sc} Akkumulierung haben. Da eine PrP^{Sc} Aufnahme in den verschiedensten Zellen eigentlich immer möglich ist, stellt sich die Frage, ob durch die Nutzung unterschiedlicher Transportwege die Möglichkeit gegeben ist, mit verschiedenen Kofaktoren und Rezeptoren zu interagieren, um eine persistente Infektion diverser Prionstämme zu etablieren.

Ein deutlicher Unterschied zwischen dem Prionstamm ME7 und 22L bzw. RML ist die Nutzung des Recyclingsystems über Rab4 zur Zelloberfläche. Dieses Recycling zurück zur Plasmamembran scheint einen positiven Einfluss auf die ME7-PrP^{Sc} Akkumulierung zu haben. Dies könnte auch für eine Interaktion mit speziellen Oberflächenproteinen, Rezeptoren oder *Raft*-Regionen sprechen, die die Bildung von PrP^{Sc} beeinflussen können. Auch eine Konversion direkt an der Zellmembran wäre möglich, da das endogene PrP^C dort als GPI-verankertes Protein vorliegt. Jedoch ist diese auch in allen anderen sekretorischen Kompartimenten der Fall. In dieser Arbeit scheinen RML-Prionen zum Großteil von Caveolae abzuhängen, 22L- und ME7-Prionen bevorzugen dagegen in diesem Fall die Clathrin-abhängige Endozytose. Die Prionstämme 22L und RML scheinen den Rab7-kontrollierten späten, endosomalen Transportweg zu nutzen. Jedoch sollte eine pH-Wert Veränderung durch Proteasen in LEs/Lysosomen auch eine mögliche KO-unabhängige Degradierung von PrP^{Sc} nicht außer Acht gelassen werden, welche so zu einer Veränderung der PrP^{Sc} Akkumulierung führen könnte (Critchley *et al.*, 2004). Die Verwendung verschiedener Endozytosewege wurde in mehreren Studien bereits vermutet (2.4). Auch der Einfluss von diversen wirtseigenen, zellulären Faktoren wurde im Zusammenhang mit dem Infektionsprozess diskutiert (Taylor & Hooper, 2006; Greil *et al.*, 2008; Abid *et al.*, 2010). Es bleibt jedoch unklar, ob sich die Endozytose- und Transportwege

durch die Zelle bei der Etablierung von der transienten zur stabilen Infektion ändern oder prionstamm-abhängig genutzt werden.

Betrachtet man die Daten der Inhibitoren zusammen mit den siRNA-Ergebnissen, kann man folgende Aussagen machen. Nystatin hat während der akuten RML-Infektion die gleiche Wirkung auf PrP^{Sc} wie die Caveolin-siRNA (Abb. 26, 41). Interessanterweise kommt es in persistent infizierten Zellen zu einem Anstieg der RML-PrP^{Sc} Menge durch den Einsatz von Nystatin. Dies könnte auf zelluläre Veränderungen bei der Etablierung einer stabilen RML-Infektion hinweisen. Nystatin zeigt während der akuten Infektion auf den Prionstamm ME7 dieselbe Wirkung wie auf RML. Die Blockierung mittels Caveolin-siRNA hat jedoch keinen Effekt auf die akute ME7-Infektion. Die Reduzierung der PrP^{Sc} Menge ist im Falle von ME7 auch in persistent infizierten L929 Zellen zu detektieren. Da Progesteron und Filipin keine Wirkung auf die PrP^{Sc} Bildung von ME7-Prionen haben, scheint die ME7-PrP^{Sc} Akkumulierung (6.6; Abb. 48) auf eine spezifische Funktion des Nystatins zu reagieren. Die 22L-Infektion scheint sich im Endozytoseprozess auf die *clathrin-coated* Endozytose zu konzentrieren. Dies würde nicht im Widerspruch zur PrP^{Sc}-Akkumulierung durch Filipin während der akuten 22L-Infektion stehen. In persistent infizierten L929 Zellen führt Filipin dagegen zu einer Abnahme der PrP^{Sc}-Menge (5.1.3, Tabelle 8). Dieses Ergebnis würde die Hypothese, dass es bei einer stabil etablierten Infektion möglicherweise zu Veränderungen innerhalb der Zelle kommt, bekräftigen. Zusammenfassend kann man somit sagen, dass deutliche Unterschiede zwischen diversen Prionstämmen in derselben Zelllinie existieren, wenn man den Cholesterolmetabolismus, die Endozytose- oder sekretorischen Transportwege genauer betrachtet.

Eine weitere Möglichkeit, die nicht außer Acht gelassen werden sollte, ist, dass PrP^{Sc} die Wege zur Internalisierung hin zu einer nicht-clathrin, nicht-caveolin Endozytose ändern könnte (Rejman et al., 2005; Nichols, 2003). Conner & Schmid konnten zeigen, dass es neben den bereits genannten Endozytosewegen u.a. auch eine Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose existiert (Conner & Schmid, 2003). Es steht jedoch fest, dass Cholesterol eine wichtige Rolle sowohl in der Aufnahme als auch im Vesikeltransport durch die Zelle spielt. Einen potentiellen Zusammenhang zwischen der Aktivität und der Verteilung von Rabproteinen und zellulärem Cholesterol zeigen Choudhury *et al.* Durch die Überexpression von Rab7

und Rab9 konnte die Cholesterol-Akkumulierung in NP-C (Niemann-Pick type C) Fibroblasten, Zellen einer „*Lipid storage disease*“ reduziert werden (Choudhury *et al.*, 2002). Zudem scheint Cholesterol und/oder das Vesikelrecycling zum TGN wichtig für die PrP^{Sc}-Bildung in RML infizierten N2a Zellen zu sein (Gilch *et al.*, 2009). Gleichzeitig stört ein beeinträchtigter Cholesteroltransport den Vesikeltransport bedingt durch eine Blockierung von Rabproteinen (Ganley & Pfeffer, 2006; Choudhury *et al.*, 2004). Interessanterweise konnte die Substanz U18666A, welche zu einer Cholesterolansammlung in den Zellen führt, eine akute Infektion von 22L und RML in N2a Zellen nicht inhibieren, die Etablierung einer persistenten Infektion dagegen schon (Gilch *et al.*, 2009). Diese Eigenschaften von cholesterolmetabolismus-verändernden Substanzen finden sich auch bei der Betrachtung der Ergebnisse von Progesteron und Filipin in dieser Arbeit. Beide Inhibitoren zeigen nur eine Wirkung in persistent infizierten Zellen.

Durch Behandlung mit siRNAs ist es möglich, in einem gewissen Zeitrahmen die akute Infektion unter Manipulation diverser Transportschritte zu beobachten. Hierbei zeigen sich weniger unspezifische, zelluläre Reaktionen, die durch inhibitorische Substanzen hervorgerufen werden könnten. Da ein nahezu 100%iges Ausschalten der Proteinexpression technisch in diesem System nicht möglich ist, kann fast immer eine Restinfektion detektiert werden. Jedoch sind auch KO-Effizienzen von 70% oft sehr aussagekräftig. Beispielsweise konnten Zafar *et al.* eine deutliche PrP^C Akkumulierung nach einem Rab7-KO (70-75% Effizienz) in HpL3-4 und SH-SY5Y Zellen feststellen (Zafar *et al.*, 2011). Um die KO-Effizienz weiter zu erhöhen, könnten mehrere siRNAs gegen dasselbe Protein gleichzeitig transfiziert oder ein stabiler KO über lentivirale oder retrovirale Transfektion etabliert werden. Diese viralen Transfektionen könnten jedoch den Nachteil haben, unspezifische, zelluläre Reaktionen hervorzurufen. Um eine noch eindeutigere Aussage über die unterschiedlichen Transportwege verschiedener Prionstämme und deren PrP^{Sc}-Akkumulierung von einer akuten Infektion hin zu einer persistent infizierten Zelle zu erhalten, könnten Ko-Lokalisierungsstudien mit spezifischen Markerproteinen der jeweiligen Organelle bzw. Vesikel weiterhelfen.

7 Literaturverzeichnis

Abid K, Morales R, Soto C. (2010) Cellular factors implicated in prion replication. *FEBS Lett.* 2010 Jun 3;584(11):2409-14.

Aguzzi A, Sigurdson CJ. Antiprion immunotherapy: to suppress or to stimulate? *Nat Rev Immunol.* 2004 Sep;4(9):725-36.

Aguzzi A, Polymenidou M. Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):313-27.

Aguzzi A., Baumann F., Bremer J. The prion`s elusive reason for being. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 439-477. 2008.

Ahle S, Mann A, Eichelsbacher U, Ungewickell E. Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane. *EMBO J.* 1988 Apr;7(4):919-29.

Alexandrov K, Horiuchi H, Steele-Mortimer O, Seabra MC, Zerial M: Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *EMBO J* 1994, 13:5262-5273.

Alpers DH, Tomkins GM. Sequential transcription of the genes of the lactose operon and its regulation by protein synthesis. *J Biol Chem.* 1966 Oct 10;241(19):4434-43.

Alpers M., Rail L. (1971). Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease: clinical and aetiological aspects. *Proc. Aust. Assoc. Neurol.* 8:7-15.

Anant JS, Desnoyers L, Machius M, Demeler B, Hansen JC, Westover KD, Deisenhofer J, Seabra MC: Mechanism of Rab geranylgeranylation: formation of the catalytic ternary complex. *Biochemistry* 1998, 37:12559-12568.

Anderson RG, Brown MS, Goldstein JL. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell.* 1977 Mar;10(3):351-64.

Anderson RG, Brown MS, Beisiegel U, Goldstein JL. Surface distribution and recycling of the low density lipoprotein receptor as visualized with antireceptor antibodies. *J Cell Biol.* 1982 Jun;93(3):523-31.

Anderson HA, Chen Y, Norkin LC. MHC class I molecules are enriched in caveolae but do not enter with simian virus 40. *J Gen Virol.* 1998 Jun;79 (Pt 6):1469-77.

Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science.* 1973 Jul 20;181(96):223-30.

Ang AL, Taguchi T, Francis S, Fölsch H, Murrells LJ, Pypaert M, Warren G, Mellman I. Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J Cell Biol.* 2004 Nov 8;167(3):531-43.

Aoki T, Hagiwara H, Matsuzaki T, Suzuki T, Takata K. Internalization of caveolae and their relationship with endosomes in cultured human and mouse endothelial cells. *Anat Sci Int.* 2007 Jun;82(2):82-97.

Arnold JE, Tipler C, Laszlo L, Hope J, Landon M, Mayer RJ. The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J Pathol.* 1995 Aug;176(4):403-11

Bach C, Gilch S, Rost R, Greenwood AD, Horsch M, Hajj GN, Brodesser S, Facius A, Schädler S, Sandhoff K, Beckers J, Leib-Mösch C, Schätzl HM, Vorberg I. Prion-induced activation of cholesterologenic gene expression by Srebp2 in neuronal cells. *J Biol Chem.* 2009 Nov 6;284(45):31260-9. Epub 2009 Sep 11.

Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Wälchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell.* 1986 Aug 1;46(3):417-28.

Bate C, Salmona M, Diomede L, Williams A. Squalestatin cures prion-infected neurons and protects against prion neurotoxicity. *J Biol Chem.* 2004 Apr 9;279(15):14983-90. Epub 2004 Jan 29.

Bate C, Rumbold L, Williams A. Cholesterol synthesis inhibitors protect against platelet-activating factor-induced neuronal damage. *J Neuroinflammation.* 2007 Jan 18;4:5.

Bate C, Tayebi M, Williams A. Cholesterol esterification reduces the neurotoxicity of prions. *Neuropharmacology.* 2008 Jun;54(8): 1247-53.

Baylis M, Goldmann W. The genetics of scrapie in sheep and goats. *Curr Mol Med.* 2004 Jun;4(4):385-96.

Behrens A, Genoud N, Naumann H, Rüllicke T, Janett F, Heppner FL, Ledermann B, Aguzzi A. (2002) Absence of the prion protein homologue Doppel causes male sterility. *EMBO J.* 2002 Jul 15;21(14):3652-8.

Belay ED (1999) Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annual review of microbiology* 53: 283-314

Bellingham SA, Coleman LA, Masters CL, Camakaris J, Hill AF. (2009) Regulation of prion gene expression by transcription factors SP1 and metal transcription factor-1. *J Biol Chem.* Jan 9;284(2):1291-301

Benting JH, Rietveld AG, Simons K. N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol.* 1999 Jul 26;146(2):313-20.

- Bèranger F., Mangè A., Goud B., Lehmann S. (2002). Stimulation of PrP^c retrograde transport toward the endoplasmic reticulum increases accumulation of PrP^{Sc} in prion-infected cells. *J. Biol. Chem.* 277: 38972-38977.
- Bessen RA, Marsh RF. Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J Gen Virol.* 1992 Feb;73 (Pt 2):329-34
- Bessen RA, Marsh RF. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol.* 1994 Dec;68(12):7859-68
- Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, Nandan S, Lansbury PT, Caughey B. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature.* 1995 Jun 22;375(6533):698-700.
- Birkett C.R., Hennion R.M., Bembridge D.A., Clarke M.C., Chree A., Bruce M.E., Bostock C.J. (2001). Scrapie strains maintain biological phenotypes on propagation in a cell line in culture. *EMBO* 20(13): 3351-3358.
- Blatch GL., Lassel M., Zetter BR. And Kundra V. (1997). Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. *Gene* 194, 277-282.
- Bolard J. 1986. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim Biophys Acta.* 864:257-304.
- Bolton D.C., Meyer R.K., Prusiner S.B. (1985). Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein. *J. Virol.* 53, 596-606.
- Bonifacino JS., Lippincott-Schwartz J. (2003). Coat Proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 409-414.
- Borchelt D.R., Scott M., Taraboulos A., Stahl N., Prusiner S.B. (1990). Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J. Cell Biol.* 110(3): 743-52.
- Borchelt D.R., Taraboulos A., Prusiner S.B. (1992), Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 267(23):16188-99.
- Bosque P.J., Prusiner S.B. (2000). Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection. *J. Virol.* 74(9): 4377-4386.
- Bousset L, Melki R. Similar and divergent features in mammalian and yeast prions. *Microbes Infect.* 2002 Apr;4(4):461-9.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, Marino S, Weissmann C, Aguzzi A. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature.* 1996 Jan 25;379(6563):339-43

LITERATURVERZEICHNIS

- Brotherston JG., Renwick CC., Stamp JT., Zlotnik I. and Pattison IH. (1968) Spread and scrapie by contact to goats and sheep. *J Comp Pathol* 78, 9-17.
- 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., Kretzschmar H. (1997). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390, 684-687.
- Brown DA, London E. functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:111-36
- Brown DR, Besinger A. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J.* 1998 Sep 1;334 (Pt 2):423-9.
- Brown D.R., Wong B.S., Hafiz F., Clive C., Haswell S.J., Jones I.M. (1999). Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem. J.* 344(1):1-5.
- Brown LR, Harris DA. Copper and zinc cause delivery of the prion protein from the plasma membrane to a subset of early endosomes and the Golgi. *J Neurochem.* 2003 Oct;87(2):353-63
- Bruce ME. Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull.* 1993 Oct; 49(4):822-38.
- Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCordle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature.* 1997 Oct 2;389(6650):498-501
- Bruce ME, Boyle A, Cousens S, McConnell I, Foster J, Goldmann W, Fraser H. Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *J Gen Virol.* 2002 Mar;83(Pt 3):695-704
- Buchmeier NA, Heffron F. Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun.* 1991 Jul;59(7):2232-8.
- Bueler H., Fischer M., Lang Y., Bluethmann H., Lipp H.P., DeArmond S.J., Prusiner S.B., Aguet M., Weissmann C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577-582.
- Bueler H., Aguzzi A., Sailer A., Greiner R.A., Autenried P., Aguet M., Weissmann C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347.
- Burger D., Hartsough G.R. (1965). Encephalopathy of mink. II. Experimental and natural transmission. *J. Infect. Dis.* 115(4) : 393-9.
- Butler D.A., Scott M.R.D., Bockman J.M., Borchelt D.R., Taraboulos A., Hsiao K.K., Kingsbury D.T., Prusiner S.B. (1988). Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J. Virol.* 62(5): 1558-1564.

LITERATURVERZEICHNIS

Butler JD, Blanchette-Marchie J, Goldin E et al. (1994) Progesterone blocks cholesterol translocation from lysosomes. *J.Biol.Chem* 267, 23 : 797-805.

Byers TJ, Branton D. Visualization of the protein associations in the erythrocyte membrane skeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Sep;82(18):6153-7.

Campana V, Sarnataro D, Zurzolo C. The highways and byways of prion protein trafficking. *Trends Cell Biol*. 2005 Feb;15(2):102-11.

Cancellotti E, Wiseman F, Tuzi NL, Baybutt H, Monaghan P, Aitchison L, Simpson J, Manson JC. Altered glycosylated PrP proteins can have different neuronal trafficking in brain but do not acquire scrapie-like properties. *J Biol Chem*. 2005 Dec 30;280(52):42909-18.

Carp RI, Moretz RC, Natelli M, Dickinson AG. Genetic control of scrapie: incubation period and plaque formation in I mice. *J Gen Virol*. 1987 Feb;68 (Pt 2):401-7

Cashman NR, Caughey B. Prion diseases--close to effective therapy? *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Oct;3(10):874-84.

Castilla J, Saá P, Hetz C, Soto C. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*. 2005 Apr 22;121(2):195-206

Caughey B, Raymond GJ. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem*. 1991 Sep 25;266(27):18217-23

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

Caughey B., Raymond G.J., Ernst D., Race R.E. (1991b). N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J. Virol*. 65, 6597-6603.

Caughey B. (1993). Scrapie associated PrP accumulation and its prevention: insights from cell culture. *Br. Med. Bull* 49(4): 860-72.

Caughey B., Kocisko DA., Raymond GJ. And Lansbury PT. Jr. (1995) Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem. Biol*. 2, 807-17.

Caughey B, Raymond GJ, Bessen RA. Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem*. 1998 Nov 27;273(48):32230-5.

LITERATURVERZEICHNIS

Caughey B, Baron GS. Factors affecting interactions between prion protein isoforms. *Biochem Soc Trans.* 2002. Aug; 30(4):565-9.

Caughey B. (2003). Prion protein conversion: insight into mechanisms, TSE transmission barriers and strains. *Brit. Med. Bull.* 66: 109-120.

Caughey B, Baron GS. Prions and their partners in crime. *Nature.* 2006 Oct 19;443(7113):803-10.

Cerneus DP, Ueffing E, Posthuma G, Strous GJ, van der Ende A. Detergent insolubility of alkaline phosphatase during biosynthetic transport and endocytosis. Role of cholesterol. *J Biol Chem.* 1993 Feb 15;268(5):3150-5.

Chavrier P, Vingron M, Sander C, Simons K, Zerial M. Molecular cloning of YPT1/SEC4-related cDNAs from an epithelial cell line. *Mol Cell Biol.* 1990 Dec;10(12):6578-85.

Chen A., AbuJarour R.J., Draper R.K. (2003). Evidence that the transport of ricin to the cytoplasm is independent of both Rab6A and COPI. *J. Cell Sci.* 116:3503-10

Chernoff YO. Amyloidogenic domains, prions and structural inheritance: rudiments of early life or recent acquisition? *Curr Opin Chem Biol.* 2004 Dec;8(6):665-71.

Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* 2002 Jul 1;21(13):3317-26

Chien P, Weissman JS. Conformational diversity in a yeast prion dictates its seeding specificity. *Nature* 2001 Mar 8;410(6825):223-7

Choudhury A, Dominguez M, Puri V, Sharma DK, Narita K, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE (2002). Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *J. Clin. Inv.* 109: 1541-1550.

Choudhury A, Sharma DK, Marks DL, Pagano RE (2004). Elevated endosomal cholesterol levels in Niemann-Pick cells inhibit Rab4 and perturb membrane recycling. *Mol Biol Cell* 15: 4500-4511.

Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD, Zerial M: The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 1999, 397:621-626.

Cobb NJ, Surewicz WK. Prion diseases and their biochemical mechanisms. *Biochemistry.* 2009 Mar 31;48(12):2574-85

Cohen F.E., Pan K.M., Huang Z., Baldwin M., Fletterick R.J., Prusiner S.B. (1994). Structural clues to prion replication. *Science* 264(5158): 530-1.

Colby DW. & Prusiner S. Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3:a006833

LITERATURVERZEICHNIS

- Colling S.B., Collinge J., Jefferys J.G. (1996). Hippocampal slice from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K⁺ currents. *Neurosci. Lett.* 209, 49-52.
- Collinge J, Palmer MS, Dryden AJ. Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet.* 1991 Jun 15;337(8755):1441-2.
- Collinge J., Whittington M.A., Sidle K.C., Smith C.J., Palmer M.S., Clarke A.R., Jefferys J.G. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370, 295-297.
- Collinge J., Sidle K.C., Meads J., Ironside J., Hill A.F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variante" CJD. *Nature* 370, 685-690.
- Collinge J, Rossor M. A new variant of prion disease. *Lancet* 1996 Apr 6;347(9006):916-7
- Collinge J. (1997). Human prion disease and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Hum. Mol. Genet.* 6(10): 1699-705.
- Collinge J. (1999). Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 353, 183-189.
- Collinge J. (2001). Prion diseases of human and animals: their causes and molecular basis. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 519-50.
- Collinge J. (2005) Molecular neurology of prion disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 76:906–919
- Collinge J., Anthony R. A General Model of Prion Strains and Their Pathogenicity *Science* 318, 930 (2007)
- Collins S.J., Sanchez-Juan P., Masters C.L., Klug G.M., van Duijn C., Pologgi A., Pocchiari M., Almonti S., Cuadrado-Corrales N., de Pedro-Cuesta J., Budka H., Gelpi E., Glatzel M., Tolnay M., Hewer E., Zerr I., Heinemann U., Kretschmar H. A., Jansen G.H., Olsen E., Mitrova E., Alperovitch A., Brandel J.P., Mackenzie J., Murray K. and Will R.G. (2006) Determinants of diagnostic investigation sensitivities across the clinical spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 129, 2278-2287.
- Come J.H., Fraser P.E., Lansbury P.T. Jr. (1993). A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(13): 5959-63.
- Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 2003 Mar 6;422(6927):37-44. Review.
- Cormack B.P., Valdivia R.H., Falkow S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene.* 173: 33-38.
- Cox D, Lee DJ, Dale BM, Calafat J, Greenberg S. A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jan 18;97(2):680-5.

LITERATURVERZEICHNIS

- Cramer A., Whitegorn E.A., Tate E., Stemmer W.P. (1996). Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.* 14(3): 315-9.
- Creutzfeldt HG. On a particular focal disease of the central nervous system (preliminary communication), 1920. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1989 Spring-Summer;3(1-2):3-25
- Critchley P, Kazlauskaitė J, Eason R, Pinheiro TJJ. 2004. Binding of prion proteins to lipid membranes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 313, 559-567.
- Cronier S, Laude H, Peyrin JM. Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 17;101(33):12271-6. Epub 2004 Aug 9.
- Cronier S, Beringue V, Bellon A, Peyrin JM, Laude H. Prion strain- and species-dependent effects of antiprion molecules in primary neuronal cultures. *J Virol.* 2007 Dec;81(24):13794-800. Epub 2007 Oct 3.
- Cuillè J. and Chelle PL. (1939) Experimental transmission of trembling to the goat. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences* 208, 1058-1160.
- Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Apr;80(8):2258-62.
- Davanipour Z, Goodman L, Alter M, Sobel E, Asher D, Gajdusek DC (1984) Possible modes of transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *The New England journal of medicine* 311:1582-1583
- Dawson PA, Hofmann SL, van der Westhuyzen DR, Südhof TC, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-dependent repression of low density lipoprotein receptor promoter mediated by 16-base pair sequence adjacent to binding site for transcription factor Sp1. *J Biol Chem.* 1988 Mar 5;263(7):3372-9.
- de Graaf P, Zwart WT, van Dijken RA, Deneka M, Schulz TK, Geijsen N, Coffey PJ, Gadella BM, Verkleij AJ, van der Sluijs P, van Bergen en Henegouwen PM. Phosphatidylinositol 4-kinasebeta is critical for functional association of rab11 with the Golgi complex *Mol Biol Cell.* 2004 Apr;15(4):2038-47.
- DeArmond SJ. and Prusiner SB. (1995) Etiology and pathogenesis of prion diseases. *The American journal of pathology* 146, 785-811.
- Dickinson AG., Stamp JT. And Renwick CC. (1974) Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *J. Comp. Pathol.* 78, 293-9.
- Diringer H., Ehlers B. (1991). Chemoprophylaxis of scrapie in mice. *J. Gen. Virol.* 72, 457-460.

- Doh-Ura K, Iwaki T, Caughey B. Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol.* 2000 May;74(10):4894-7.
- Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Mohri S, Race R, Iwaki T. Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol.* 2004 May;78(10):4999-5006.
- Dodelet V.C., Cashman N.R. (1998). Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood* 91, 1556-1561.
- Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science.* 2001 Sep 28;293(5539):2449-52. Epub 2001 Aug 9.
- D'Souza-Schorey C, Stahl PD. Myristoylation is required for the intracellular localization and endocytic function of ARF6. *Exp Cell Res.* 1995 Nov;221(1):153-9.
- Dupiereux I, Falisse-Poirrier N, Zorzi W, Watt NT, Thellin O, Zorzi D, Pierard O, Hooper NM, Heinen E, Elmoualij B. Protective effect of prion protein via the N-terminal region in mediating a protective effect on paraquat-induced oxidative injury in neuronal cells. *J Neurosci Res.* 2008 Feb 15;86(3):653-9
- Echard A, Jollivet F, Martinez O, Lacapère JJ, Rousselet A, Janoueix-Lerosey I, Goud B. Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science.* 1998 Jan 23;279(5350):580-5.
- Edenhofer S., Rieger R., Famulok M., Wendler W., Weiss S., Winnacker E.L. (1996). Prion protein PrP^C interacts with molecular chaperons of the Hsp60 family. *J. Virol.* 70, 4724-4728.
- Ertmer A., Gilch S., Yun S.-W., Flechsig E., Klebl B., Stein-Gerlach M., Klein M.A., Schätzl H.M. (2004). The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrP^{Sc} in prion-infected cells. *J. Biol. Chem.* 279(40): 41918-27.
- Farquhar CF, Dickinson AG. Prolongation of scrapie incubation period by an injection of dextran sulphate 500 within the month before or after infection. *J Gen Virol.* 1986 Mar;67 (Pt 3):463-73.
- Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 29;101(26):9683-8.
- Ford MJ., Burton LJ., Li H., Graham DH., Frobert Y., Grassi H., Hall SM. and Morris RJ. (2002) A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. *Neuroscience* 111, 533-551.

LITERATURVERZEICHNIS

Fournier JG., Escaig-Haye F., Bilette de Villemeur T. and Robain O. (1995) Ultrastructural localisation of cellular prion protein (PrP^C) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *Comptes rendus de l'Academie des sciences* 318, 339-344.

Fouraux M.A., Deneka M., Ivan V., van der Heijden A., Raymackers J., van Suylekom D., van der Sluijs P., Pruijn G.J. (2004). Rabip4` is an effector of Rab5 and Rab4 and regulates transport through early endosomes. *Mol. Bio. Cell.* 15(2):611-24.

Fraser H, Dickinson AG. Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol.* 1973 Jan;83(1):29-40.

Fraser H. Phillips report and the origin of BSE. *Vet Rec.* 2000 Dec 16;147(25):724.

Fu Y, Hoang A, Escher G, Parton RG, Krozowski Z, Sviridov D. (2004). Expression of caveolin- 1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. *J.Biol.Chem.* 279(14): 14140-14146.

Fujimoto T, Kogo H, Nomura R, Une T. Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J Cell Sci.* 2000 Oct;113 Pt 19:3509-17.

Fukuda H., Arai M., Kuwajima K. (2000). Folding of green fluorescent protein and the cycle3 mutant. *Biochem.* 39, 12025-12032.

Galvan C, Camoletto PG, Dotti CG, Aguzzi A, Ledesma MD. Proper axonal distribution of PrP(C) depends on cholesterol-sphingomyelin-enriched membrane domains and is developmentally regulated in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2005 Nov;30(3):304-15

Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature.* 1966 Feb 19;209(5025):794-6.

Gajdusek DC. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science.* 1977 Sep 2;197(4307):943-60.

Gajdusek DC. (1994) Nucleation of amyloidogenesis in infectious and noninfectious amyloidoses of brain. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 6, 173-90.

Ganley IG, Pfeffer SR (2006). Cholesterol accumulation sequesters Rab9 and disrupts late endosome function in NPC1-deficient cells. *J Biol Chem* 281: 17890-17899.

Garcia-Ranea JA, Valencia A. Distribution and functional diversification of the ras superfamily in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1998 Sep 4;434(3):219-25.

Garnett AP, Viles JH (2003) Copper binding to the octarepeats of the prion protein. Affinity, specificity, folding, and cooperativity: insights from circular dichroism. *J Biol Chem* 278:6795-6802

Gasset M, Baldwin MA, Fletterick RJ, Prusiner SB. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jan 1;90(1):1-5

Gauczynski S., Peyrin J.M., Haik S., Leucht C., Hundt C., Rieger R., Krasemann S., Deslys J.P., Dormont D., Lasmezas C.I., Weiss S. (2001). The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. EMBO 20(21): 5863-75.

Gauczynski S, Nikles D, El-Gogo S, Papy-Garcia D, Rey C, Alban S, Barritault D, Lasmezas CI, Weiss S. The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as a receptor for infectious prions and is inhibited by polysulfated glycanes. J Infect Dis. 2006 Sep 1;194(5):702-9.

Gerstmann J., Sträussler E., Scheinker I. (1936) Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des zentralen Nervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. Z.Ges.Neurol.Psychiat. 154: 736-762

Gilch S., Winklhofer K.F., Groschup M.H., Nunziante M., Lucassen R., Spielhauer C., Muranyi W., Riesner D., Tatzelt J., Schätzl H.M. (2001). Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP^{Sc} and delays onset of prion disease. EMBO 20(15): 3957-3966.

Gilch S, Wopfner F, Renner-Muller I, Kremmer E, Bauer C, Wolf E, Brem G, Groschup MH, Schätzl HM. (2003). Polyclonal anti-PrP auto-antibodies induced with dimeric PrP interfere efficiently with PrP^{Sc} propagation in prion-infected cells. J. Biol. Chem.278(20):18524-31.

Gilch S, Kehler C, Schätzl HM. The prion protein requires cholesterol for cell surface localization. Mol Cell Neurosci. 2005 Feb;31(2):346-53. Epub 2005 Nov 8.

Gilch S., Chitoor N., Taguchi Y., Stuart M., Jewell JE. And Schätzl H. Chronic Wasting disease. Top Curr Chem (2011) 305: 51-78.

Gill AC, Ritchie MA, Hunt LG, Steane SE, Davies KG, Bocking SP, Rhie AG, Bennett AD, Hope J. Post-translational hydroxylation at the N-terminus of the prion protein reveals presence of PPII structure in vivo. EMBO J. 2000 Oct 16;19(20):5324-31

Giorgi A, Di FL, Principe S, Mignogna G, Sennels L, Mancone C, Alonzi T, Sbriccoli M, De PA, Rappsilber J, Cardone F, Pocchiari M, Maras B, Schinina ME. (2009). Proteomic profiling of PrP²⁷⁻³⁰-enriched preparations extracted from the brain of hamsters with experimental scrapie. Proteomics 9(15): 3802-3814.

Greil CS, Vorberg IM, Ward AE, Meade-White KD, Harris DA, Priola SA. (2008) Acute cellular uptake of abnormal prion protein is cell type and scrapie-strain independent. Virology. Sep 30;379(2):284-93.

Griffith JS. Self-replication and scrapie. Nature. 1967 Sep 2;215(5105):1043-4.

Gruenberg J, Stenmark H. The biogenesis of multivesicular endosomes. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 Apr;5(4):317-23. Review.

LITERATURVERZEICHNIS

- Gorodinsky A., Harris D.A. (1995). Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent- resistant complexes without caveolin. *J. Cell Biol.* 129(3): 619-27.
- Ghosh RN, Mallet WG, Soe TT, McGraw TE, Maxfield FR. An endocytosed TGN38 chimeric protein is delivered to the TGN after trafficking through the endocytic recycling compartment in CHO cells. *J Cell Biol.* 1998 Aug 24;142(4):923-36.
- Glatzel M, Aguzzi A (2001) The shifting biology of prions. *Brain Res Brain Res Rev* 36: 241-248
- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 1990 Feb 1;343(6257):425-30. Review.
- Gonzalez L Jr, Scheller RH. Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex. *Cell.* 1999 Mar 19;96(6):755-8.
- Gould R, Rabbanian S, Sutton L, Andre R, Arora P, Moonga J, Clarke AR, Schiavo G, Jat P, Collinge J, Tabrizi SJ. (2011) Rapid cell-surface prion protein conversion revealed using a novel cell system. *Nat Commun*;2:281.
- Gorvel JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell.* 1991 Mar 8;64(5):915-25.
- Govaerts C, Wille H, Prusiner SB, Cohen FE. Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 1;101(22):8342-7.
- Gross U, Gross W. [Action of nystatin]. *Arch Dermatol Forsch.* 1972;242(4):389-97.
- Hac-Wydro K, Kapusta J, Jagoda A, Wydro P, Dynarowicz-Latka P. The influence of phospholipid structure on the interactions with nystatin, a polyene antifungal antibiotic. 2007. *CPL.* 150:125-135
- Hadlow WJ. Neuropathology and the scrapie-kuru connection. *Brain Pathol.* 1995 Jan;5(1):27-31
- Hao M, Maxfield FR. Characterization of rapid membrane internalization and recycling. *J Biol Chem.* 2000 May 19;275(20):15279-86.
- Harmey JH., Doyle D., Brown V., Rogers MS. (1995). The cellular isoform of the prion protein; PrPc is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 753-759.
- Harris DA, Falls DL, Johnson FA, Fischbach GD. (1991) A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 1;88(17):7664-8.

Hartsel S.C., Weiland T.R. (2003). Amphotericin B binds to amyloid fibrils and delays their formation: a therapeutic mechanism? *Biochem.* 42(20): 6228-33.

Hegde RS, Mastrianni JA, Scott MR, DeFea KA, Tremblay P, Torchia M, DeArmond SJ, Prusiner SB, Lingappa VR. A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science.* 1998 Feb 6;279(5352):827-34

Heiseke A., Schobel S., Lichtenthaler SF., Vorberg I., Groschup MH., Kretzschmar H., Schätzl HM. And Nunziante M. (2008). The novel sorting nexin SNX33 interferes with cellular PrP formation by modulation of PrP shedding. *Traffic* 9, 1116-1129.

Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol.* 1998 Apr 6;141(1):85-99.

Herms J., Tings T., Gall S., Madlung A., Giese A., Siebert H., Schurmann P., Windl O., Brose N., Kretzschmar H. (1999). Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J. Neurosci.* 19, 8866-8875.

Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.* 1988 Dec 20;7(13):4119-27.

Hewitt PE, Llewelyn CA, Mackenzie J, Will RG. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: results of the UK Transfusion Medicine Epidemiological Review study. *Vox Sang.* 2006 Oct;91(3):221-30

Hijazi N, Kariv-Inbal Z, Gasset M, Gabizon R. PrPSc incorporation to cells requires endogenous glycosaminoglycan expression. *J Biol Chem.* 2005 Apr 29;280(17):17057-61. Epub 2005 Jan 24.

Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature.* 1997 Oct 2;389(6650):448-50, 526.

Hill A.F., Butterworth R.J., Joiner S., Jackson G., Rossor M.N., Thomas D.J., Frosh A., Tolley N., Bell J. E., Spencer M., King A., Al Sarraj S., Ironside J.W., Lantos P.L.,

Hoepfner S, Severin F, Cabezas A, Habermann B, Runge A, Gillooly D, Stenmark H, Zerial M. Modulation of receptor recycling and degradation by the endosomal kinesin KIF16B. *Cell.* 2005 May 6;121(3):437-50.

Hooper NM. Glypican-1 facilitates prion conversion in lipid rafts. *J Neurochem.* (2011) 116:721-725.

Hopkins CR. The importance of the endosome in intracellular traffic. *Nature.* 1983 Aug 25-31;304(5928):684-5.

Horonchik L, Tzaban S, Ben-Zaken O, Yedidia Y, Rouvinski A, Papy-Garcia D, Barritault D, Vlodavsky I, Taraboulos A. Heparan sulfate is a cellular receptor for purified infectious prions. *J Biol Chem.* 2005 Apr 29;280(17):17062-7. Epub 2005 Jan 24.

Hilmert H, Diring H. A rapid and efficient method to enrich SAF-protein from scrapie brains of hamsters. *Biosci Rep.* 1984 Feb;4(2):165-70

Hinshaw JE, Schmid SL. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature.* 1995 Mar 9;374(6518):190-2.

Hope J., Shearman M.S., Baxter H.C., Chong A., Kelly S.M., Price N.C. (1996). Cytotoxicity of prion protein peptide (PrP106-126) differs in mechanism from the cytotoxic activity of the Alzheimer's disease amyloid peptide, A beta 25-35. *Neurodegeneration.* 5(1): 1-11.

Hörnlimann B., Riesner D., Kretzschmar H., Prionen und Prionkrankheiten, Walter de Gruyter Verlag, Berlin 2001.

Hornshaw M.P., McDermott J.R., Candy J.M., Lakey J.H. (1995). Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214, 993-999.

Hsiao K., Baker H.F., Crow T.J., Poulter M., Owen F., Terwilliger J.D., Westaway D., Ott J., Prusiner S.B. (1989). Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträussler syndrome. *Nature* 338, 342-345.

Hutter G, Heppner FL, Aguzzi A. No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo. *Biol Chem.* 2003 Sep;384(9):1279-85

Jarrett JT. and Lansbury PT. Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell.* 18, 1055-8. Review.

Jen A, Parkyn CJ, Mootoosamy RC, Ford MJ, Warley A, Liu Q, Bu G, Baskakov IV, Moestrup S, McGuinness L, Emptage N, Morris RJ. (2010) Neuronal low-density lipoprotein receptor-related protein 1 binds and endocytoses prion fibrils via receptor cluster 4. *J Cell Sci.* Jan 15;123(Pt 2):246-55.

Jing SQ, Spencer T, Miller K, Hopkins C, Trowbridge I. Role of the human transferrin receptor cytoplasmic domain in endocytosis: localization of a specific signal sequence for internalization. *J Cell Biol.* 1990 Feb;110(2):283-94.

Kaneko K, Vey M, Scott M, Pilkuhn S, Cohen FE, Prusiner SB. COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Mar 18;94(6):2333-8

Kang Y, Zhao X, Lovaas J, Eisenberg E, Greene LE. Clathrin-independent internalisation of normal cellular prion protein in neuroblastoma cells is associated with the Arf6 pathway. 2009. *J Cell Sci.* Nov 15; 122(22):4062-4069.

Kanu N, Imokawa Y, Drechsel DN, Williamson RA, Birkett CR, Bostock CJ, Brookes JP. Transfer of scrapie prion infectivity by cell contact in culture. *Curr Biol.* 2002 Apr. 2; 12(7): 523-30

Kascsak R.J., Rubenstein R., Merz P.A., Tonna-DeMasi M., Fersko R., Carp R.I., Wisniewski H.M., Diringer H. (1987). Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J. Virol.* 61(12): 3688-93.

King CY, Diaz-Avalos R. Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature.* 2004 Mar 18;428(6980):319-23.

Kirchhausen T, Toyoda T. Immunoelectron microscopic evidence for the extended conformation of light chains in clathrin trimers. *J Biol Chem.* 1993 May 15;268(14):10268-73.

Kirkwood JK, Cunningham AA, Wells GA, Wilesmith JW, Barnett JE. Spongiform encephalopathy in a herd of greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*): epidemiological observations. *Vet Rec.* 1993;133:360–364. doi: 10.1136/vr.133.15.360.

Klatzo I, Gajdusek DC, Zigas V. Pathology of Kuru. *Lab Invest.* 1959 Jul-Aug;8(4):799-847.

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

Klöhn P.-C., Stolze L., Flechsig E., Enari M., Weissmann C. (2003). A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *PNAS* 100(20), 11666-11671.

Kondo K, Kuroiwa Y (1982) A case control study of Creutzfeldt-Jakob disease: association with physical injuries. *Ann Neurol* 11: 377-381

Korth C., May B.C., Cohen F.E., Prusiner S.B. (2001). Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(17): 9836-41.

Kocisko DA, Caughey B. (2006) Searching for anti-prion compounds: cell-based high-throughput in vitro assays and animal testing strategies. *Methods Enzymol:* 412:223-34.

Kristiansen M, Messenger MJ, Klöhn PC, Brandner S, Wadsworth JD, Collinge J, Tabrizi SJ. Disease-related prion protein forms aggregates in neuronal cells leading to caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem.* 2005 Nov 18;280(46):38851-61.

Kristiansen M, Deriziotis P, Dimcheff DE, Jackson GS, Ovaa H, Naumann H, Clarke AR, van Leeuwen FW, Menéndez-Benito V, Dantuma NP, Portis JL, Collinge J,

LITERATURVERZEICHNIS

Tabrizi SJ. Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome. *Mol Cell*. 2007 Apr 27;26(2):175-88.

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

Kürschner C., 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.

Ladogana A, Casaccia P, Ingrosso L, Cibati M, Salvatore M, Xi YG, Masullo C, Pocchiari M. Sulphate polyanions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters. *J Gen Virol.* 1992 Mar;73 (Pt 3):661-5.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*.227 (5259): 680-5.

Lange Y. (1994) Cholesterol movement from plasma membrane to rough endoplasmic reticulum. Inhibition by progesterone. *J. Biol. Chem.* 269, 3411-3414.

Lasmézas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Hauw JJ, Dormont D. Strain specific and common pathogenic events in murine models of scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol.* 1996a Jul;77 (Pt 7):1601-9

Lasmézas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Lamoury F, Dormont D, Robain O, Ironside J, Hauw JJ. BSE transmission to macaques. *Nature.* 1996b Jun 27;381(6585):743-4.

Lasmézas CI, Deslys JP, Robain O, Jaegly A, Beringue V, Peyrin JM, Fournier JG, Hauw JJ, Rossier J, Dormont D. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science.* 1997 Jan 17;275(5298):402-5

Lassle M., Blatch GL., Kundra V., Takatori T. and Zetter BR. (1997). Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterisation of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. *J. Biol. Chem.* 272, 1876-1884.

Ledesma MD, Simons K, Dotti CG. Neuronal polarity: essential role of protein-lipid complexes in axonal sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 31;95(7):3966-71.

Lee KS, Magalhães AC, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Prado MA. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *J Neurochem.* 2001 Oct;79(1):79-87.

Lee YJ, Jin JK, Jeong BH, Carp RI, Kim YS. Increased expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the brains of scrapie-infected mice. *Neurosci Lett.* 2006b Dec 27;410(3):178-82

LITERATURVERZEICHNIS

Lee DC, Sakudo A, Kim CK, Nishimura T, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Chen SG, Itohara S, Onodera T. Fusion of Doppel to octapeptide repeat and N-terminal half of hydrophobic region of prion protein confers resistance to serum deprivation. *Microbiol Immunol.* 2006a;50(3):203-9

Legname G., Baskakov I.V., Nguyen H.O., Riesner D., Cohen F.E., DeArmond S.J., Prusiner S.B. (2004). Synthetic mammalian prions. *Science* 305(5684): 589.

Lehmann S, Harris DA. Mutant and infectious prion proteins display common biochemical properties in cultured cells. *J Biol Chem.* 1996 Jan 19;271(3):1633-7

Leopoldt JG. (1759) Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zu der Landwirtschaft, fünf Teile, Vol. 348. Christian Friedrich Günthern, Berlin.

Leucht C, Simoneau S, Rey C, Vana K, Rieger R, Lasmézas CI, Weiss S. The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. *EMBO Rep.* 2003 Mar;4(3):290-5

Lewis V. and Hooper NM. (2011) The role of lipid rafts in prion protein biology. *Front Biosci.* 16, 151-68.

Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. *Physiol Rev.* 2008 Apr;88(2):673-728.

Lindsay A.J., Hendrick A.G., Cantalupo G., Senic-Matuglia F., Goud B., Bucci C., McCaffrey M.W. (2002). Rab coupling protein (RCP), a novel Rab4 and Rab11 effector protein. *J. Biol. Chem.* 277(14): 12190-9.

Llewelyn C.A., Hewitt P.E., Knight R.S., Amar K., Cousens S., Mackenzie J., Will R.G. (2004). Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 363(9407): 417-21.

Lobao-Soares B, Walz R, Carlotti CG, Jr., Sakamoto AC, Calvo F, Terzian AL, da Silva JA, Wichert-Ana L, Coimbra NC, Bianchin MM (2007) Cellular prion protein regulates the motor behaviour performance and anxiety-induced responses in genetically modified mice. *Behavioural brain research* 183: 87-94

Lobao-Soares B, Walz R, Prediger RD, Freitas RL, Calvo F, Bianchin MM, Leite JP, Landemberger MC, Coimbra NC (2008) Cellular prion protein modulates defensive attention and innate fear-induced behaviour evoked in transgenic mice submitted to an agonistic encounter with the tropical coral snake *Oxyrhopus guibei*. *Behavioural brain research* 194: 129-137

Lock JG, Stow JL. Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol Biol Cell.* 2005 Apr;16(4):1744-55. Epub 2005 Feb 2

Lottspeich F., Zorbas H., Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1998.

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. *The new England journal of medicine*. 315, 997-1003.

Madore N., Smith KL., Graham CH., Jen A., Brady K., Hall S. and Morris R. (1999) Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *The EMBO journal* 18, 6917-6926.

Malaga-Trillo E, Solis GP, Schrock Y, Geiss C, Luncz L, Thomanetz V, Stuermer CA. (2009). Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein. *PLOS Biol.* 7(3), e55.

Magalhães AC, Silva JA, Lee KS, Martins VR, Prado VF, Ferguson SS, Gomez MV, Brentani RR, Prado MA. Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J Biol Chem.* 2002 Sep 6;277(36):33311-8.

Magalhães AC, Baron GS, Lee KS, Steele-Mortimer O, Dorward D, Prado MA and Caughey B. Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells. *J. Neurosci.* 2005 May 25(21):5207-5216.

Mallard F, Antony C, Tenza D, Salamero J, Goud B, Johannes L. Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. *J Cell Biol.* 1998 Nov 16;143(4):973-90.

Mallucci GR, Ratté S, Asante EA, Linehan J, Gowland I, Jefferys JG, Collinge J. Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J.* 2002 Feb 1;21(3):202-10

Mallucci GR, White MD, Farmer M, Dickinson A, Khatun H, Powell AD, Brandner S, Jefferys JG, Collinge J. Targeting cellular prion protein reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice. *Neuron.* 2007 Feb 1;53(3):325-35

Mangè A., Crozet C., Lehmann S., Bèranger F. (2004). Scrapie-like prion protein is translocated to the nuclei of infected cells independently of proteasome inhibition and interacts with chromatin. *Cell Sci.* 117, 2411-2416.

Marella M., Lehmann S., Grassi J., Chabry J. (2002). Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *J. Biol. Chem.* 277(28): 25457-64.

Marijanovic Z, Caputo A, Campana V, Zurzolo C (2009) Identification of an Intracellular Site of Prion Conversion. *PLoS Pathog* 5(5): e1000426.

LITERATURVERZEICHNIS

- Massignan T, Biasini E, Lauranzano E, Veglianese P, Pignataro M, Fioriti L, Harris DA, Salmona M, Chiesa R, Bonetto V. Mutant prion protein expression is associated with an alteration of the Rab GDP dissociation inhibitor alpha (GDI)/Rab11 pathway. *Mol Cell Proteomics*. 2010 Apr;9(4):611-22. Epub 2009 Dec 7.
- Matozaki T, Nakanishi H, Takai Y. Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades. *Cell Signal*. 2000 Aug;12(8):515-24. Review.
- Mattei V, Garofalo T, Misasi R, Gizzi C, Mascellino MT, Dolo V, Pontieri GM, Sorice M, Pavan A. Association of cellular prion protein with gangliosides in plasma membrane microdomains of neural and lymphocytic cells. *Neurochem Res*. 2002 Aug;27(7-8):743-9
- Mayor S, Presley JF, Maxfield FR. Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *J Cell Biol*. 1993 Jun;121(6):1257-69.
- McCaffrey M.W., Cantalupo A.B.G., Mora S., Roberti V., Santillo M., Drummond F., Bucci C. (2001). Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. *FEBS* 495: 21-30.
- McGookey DJ, Fagerberg K, Anderson R. 1983. Filipin-cholesterol complexes form in uncoated vesicle membrane derived from coated vesicles during receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein. *J. Cell. Biol.* 96:1273-1278.
- McGowan J.P. (1914). Investigation into the disease of sheep called „scrapie“ with special reference to its association with sarcosporidiosis. Rept. 232.
- McKinley MP, Taraboulos A, Kenaga L, Serban D, Stieber A, DeArmond SJ, Prusiner SB, Gonatas N. Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab Invest*. 1991 Dec;65(6):622-30
- McKnight S, Tjian R. Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell*. 1986 Sep 12;46(6):795-805
- McLennan NF, Brennan PM, McNeill A, Davies I, Fotheringham A, Rennison KA, Ritchie D, Brannan F, Head MW, Ironside JW, Williams A, Bell JE. Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *Am J Pathol*. 2004 Jul;165(1):227-35
- Mead S. (2006) Prion disease genetics. *European Journal of Human Genetics* 14, 273-281.
- Medori R., Tritschler HJ., LeBlanc A., Villare F., Manetto V., Chen HY., Xue R., Leal S., Montagna P., Cortelli P. and et al. (1992) Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *The new England journal of medicine* 326, 444-449.

Méresse S, Steele-Mortimer O, Finlay BB, Gorvel JP. The rab7 GTPase controls the maturation of Salmonella typhimurium-containing vacuoles in HeLa cells. *EMBO J*. 1999 Aug 16;18(16):4394-403.

Miaczynska M, Zerial M. Mosaic organization of the endocytic pathway. *Exp Cell Res*. 2002 Jan 1;272(1):8-14. Review.

Milhavel O., Lehmann S. (2001). Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Res. Rev.* 38, 328-339.

Mironov A Jr, Latawiec D, Wille H, Bouzamondo-Bernstein E, Legname G, Williamson RA, Burton D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Peters PJ. Cytosolic prion protein in neurons. *J Neurosci*. 2003 Aug 6;23(18):7183-93

Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G. Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res*. 1992 Sep;269(3):375-82.

Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C, Karunaratne A, Pasternak SH, Chishti MA, Liang Y, Mastrangelo P, Wang K, Smit AF, Katamine S, Carlson GA, Cohen FE, Prusiner SB, Melton DW, Tremblay P, Hood LE, Westaway D. (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol*. Oct 1;292(4):797-817.

Monari L, Chen SG, Brown P, Parchi P, Petersen RB, Mikol J, Gray F, Cortelli P, Montagna P, Ghetti B, et al. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: different prion proteins determined by a DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Mar 29;91(7):2839-42

Monera OD, Kay CM, Hodges RS. Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interactions. *Prot Sci* (1994), 3:1984-1991.

Morales R, Abid K, Soto C. The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jun; 1772(6):681-91.

Morel E., Andrieu T., Casagrande F., Gauczynski S. Weiss S., Grassi J., Pousset M., Dormont D. and Chambaz J. (2005) Bovine prion is endocytosed by human enterocytes via the 37 kDa/67 kDa laminin receptor. *The American journal of pathology* 167, 1033-1042.

Morris RJ, Parkyn CJ, Jen A. Traffic of prion protein between different compartments on the neuronal surface, and the propagation of prion disease. *FEBS Lett*. 2006 Oct 9;580(23):5565-71.

Mouillet-Richard S., Ermonval M., Chebassier C., Laplanche J.L., Lehmann S., Launay J.M., Kellermann O. (2000). Signal transduction through prion protein. *Science* 289(5486): 1925-8

LITERATURVERZEICHNIS

Mukherjee PK, DeCoster MA, Campbell FZ, Davis RJ, Bazan NG. Glutamate receptor signaling interplay modulates stress-sensitive mitogen-activated protein kinases and neuronal cell death. *J Biol Chem.* 1999 Mar 5;274(10):6493-8.

Mülhardt C., *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 4. Auflage 2003.

Muramoto T, Kitamoto T, Tateishi J, Goto I. Successful transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from human to mouse verified by prion protein accumulation in mouse brains. *Brain Res.* 1992 Dec 25;599(2):309-16

Murphy SC, Hiller NL, Harrison T, Lomasney JW, Mohandas N, Haldar K. Lipid rafts and malaria parasite infection of erythrocytes. *Mol Membr Biol.* 2006 Jan-Feb;23(1):81-8.

Naslavsky N., Stein R., Yanai A., Friedlander G., Taraboulos A. (1997), Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J. Biol. Chem.* 7;272(10):6324-31.

Naslavsky N, Shmeeda H, Friedlander G, Yanai A, Futerman AH, Barenholz Y, Taraboulos A. Sphingolipid depletion increases formation of the scrapie prion protein in neuroblastoma cells infected with prions. *J Biol Chem.* 1999 Jul 23;274(30):20763-71.

Nichols B. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci.* 2003 Dec 1;116(Pt 23):4707-14. Review.

Niezananski K, Niezananski H, Skowronek KJ, Osiecka KM, Stepkowski D (2005). Direct interaction between prion protein and tubulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 334(2), 403-411.

Nishida N., Harris D.A., Vilette D., Laude H., Frobert Y., Grassi J., Casanova D., Milhavet O., Lehmann S. (2000). Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. *J. Virol.* 74(1): 320-5.

Niv H, Gutman O, Kloog Y, Henis YI. Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells. *J Cell Biol.* 2002 May 27;157(5):865-72. Epub 2002 May 20.

Nobes CD, Hall A. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans.* 1995 Aug;23(3):456-9. Review.

Novick P, Zerial M. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Aug;9(4):496-504.

Nunziante M, Gilch S, Schätzl HM. Essential role of the prion protein N terminus in subcellular trafficking and half-life of cellular prion protein. *J Biol Chem.* 2003 Feb 7;278(6):3726-34.

Nunziante M, Kehler C, Maas E, Kassak MU, Groschup M, Schätzl HM (2005). Charged bipolar suramin derivatives induce aggregation of the prion protein at the cell surface and inhibit PrPSc replication. *J Cell Sci* 118:4959-4973.

Nuvolone M., Aguzzi A. and Heikenwalder M. (2009) Cells and prions: A license to replicate. *FEBS Letter* 583: 2674-2684.

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., et al. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*. 40(4) : 735-46.

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

Olkkonen V.M., Stenmark H. (1997). Role of the Rab GTPases in membrane traffic. *Int. Rev. Cytol.* 176: 1-85.

Owen F., Poulter M., Lofthouse R., Collinge J., Crow T.J., Ribsby D., Baker H.F., Ridley R.M., Hsiao K., Prusiner S.B. (1989). Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1, 51-52.

Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, Collinge J. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature*. 1991 Jul 25;352(6333):340-2.

Pan K.M., Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Huang Z., Fletterick R.J., Cohen F.E., et al. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 90(23): 10962-6.

Paquet S., Sabuncu E., Delaunay J-L., Laude H., Vilette D. (2004). Prion infection of epithelial rove cells is a polarized event. *J. Virol.* 7148-7152.

Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG, Farlow M, Dickson DW, Sima AA, Trojanowski JQ, Petersen RB, Gambetti P. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol*. 1996 Jun;39(6):767-78

Parchi P, Capellari S, Chen SG, Petersen RB, Gambetti P, Kopp N, Brown P, Kitamoto T, Tateishi J, Giese A, Kretzschmar H. Typing prion isoforms. *Nature*. 1997 Mar 20;386(6622):232-4.

Parkin ET., Watt NT., Turner AJ. and Hooper NM. (2004). Dual mechanism for shedding of the cellular prion protein. *The Journal of biological chemistry* 279, 11170-11178.

Parkyn CJ, Vermeulen EG, Mootosamy RC, Sunyach C, Jacobsen C, Oxvig C, Moestrup S, Liu Q, Bu G, Jen A, Morris RJ. LRP1 controls biosynthetic and trafficking of neuronal prion protein. *J Cell Sci.* 2008 Mar 15;121 (Pt 6):773-83

Parton RG. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol.* 1996 Aug;8(4):542-8.

Pattison IH, Millson GC. Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J Comp Pathol.* 1961 Apr;71:101-9.

Pattison I.H., Jones KM. (1968). Modification of a strain of mouse-adapted scrapie by passage through rats. *Res. Vet. Sci.* 9(5) : 408-10.

Pearson G.R., Wyatt J.M., Henderson J.P., Gruffydd-Jones T.J. (1993). Feline spongiform encephalopathy: a review. *Vet. Annual* 33:1-10.

Peden A.H., Head M.W., Ritchie D.L., Bell J.E., Ironside J.W. (2004). Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* 364(9433): 527-9.

Pelkmans L, Helenius A. Endocytosis via caveolae. *Traffic.* 2002 May;3(5):311-20. Review.

Pelkmans L, Püntener D, Helenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science.* 2002 Apr 19;296(5567):535-9.

Pelkmans L. Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Dec 30;1746(3):295-304.

Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, Prusiner SB. Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature.* 2001 Aug 16;412(6848):739-43

Peretz D, Williamson RA, Legname G, Matsunaga Y, Vergara J, Burton DR, DeArmond SJ, Prusiner SB, Scott MR. A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain. *Neuron.* 2002 Jun 13;34(6):921-32.

Pergami P, Jaffe H, Safar J. Semipreparative chromatographic method to purify the normal cellular isoform of the prion protein in nondenatured form. *Anal Biochem.* 1996 Apr 5;236(1):63-73

Perera WS, Hooper NM. Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr Biol.* 2001 Apr 3;11(7):519-23.

Perret E, Lakkaraju A, Deborde S, Schreiner R, Rodriguez-Boulan E. Evolving endosomes: how many varieties and why? *Curr Opin Cell Biol.* 2005 Aug;17(4):423-34.

LITERATURVERZEICHNIS

Peters PJ, Hsu VW, Ooi CE, Finazzi D, Teal SB, Oorschot V, Donaldson JG, Klausner RD. Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *J Cell Biol.* 1995 Mar;128(6):1003-17

Peters PJ, Mironov A Jr, Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, Prusiner SB. Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol.* 2003 Aug 18;162(4):703-17

Pfeffer SR. Motivating endosome motility. *Nat Cell Biol.* 1999 Oct;1(6):E145-7.

Pike LJ. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res.* 2006 Jul;47(7):1597-8.

Porto-Carreiro I, Février B, Paquet S, Vilette D, Raposo G. Prions and exosomes: from PrP^C trafficking to PrP^{Sc} propagation. *Blood Cells Mol Dis.* 2005 Sep-Oct;35(2):143-8

Presley JF, Mayor S, Dunn KW, Johnson LS, McGraw TE, Maxfield FR. The End2 mutation in CHO cells slows the exit of transferrin receptors from the recycling compartment but bulk membrane recycling is unaffected. *J Cell Biol.* 1993 Sep;122(6):1231-41.

Prince LA, Mann D, Reilly T (2006) Creutzfeldt-Jakob disease: an emergency department presentation of a rare disease. *The Journal of emergency medicine* 31: 41-44

Priola SA, Caughey B. Inhibition of scrapie-associated PrP accumulation. Probing the role of glycosaminoglycans in amyloidogenesis. *Mol Neurobiol.* 1994 Apr-Jun;8(2-3):113-20.

Priola SA, Caughey B, Race RE, Chesebro B. Heterologous PrP molecules interfere with accumulation of protease-resistant PrP in scrapie infected murine neuroblastoma cells. *J Virol* 1994; 68:4873-8.

Proske D., Gilch S., Wopfner F., Schätzl HM, Winnacker EL, Famulok M (2002). Prion-Protein-Specific Aptamer Reduces PrP^{Sc} Formation. *CemBioChem.* 3, 717-725.

Prusiner SB, McKinley MP, Groth DF, Bowman KA, Mock NI, Cochran SP, Masiarz FR. Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Nov;78(11):6675-9

Prusiner SB. Research on scrapie. *Lancet.* 1982a Aug 28;2(8296):494-5.

Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB, Hood LE. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell.* 1984 Aug;38(1):127-34

Prusiner S.B. (1982b). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 252, 1515-1522.

Prusiner S.B. (1987). On the biology of prions. *Acta Neuropathol.* 72(4) 299-314.

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

Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. *Science.* 1991 Jun 14;252(5012):1515-22.

Prusiner S.B. (1997). Prion diseases and the BSE Crisis. *Science* 278, 245-351.

Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998a Nov 10;95(23):13363-83.

Prusiner SB. The prion diseases. *Brain Pathol.* 1998b Jul;8(3):499-513.

Race R.E., Fadness L.H., Chesebro B. (1987). Characterisation of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells. *J. Gen. Virol.* 68, 1391-1399.

Race R.E., Caughey B., Graham K., Ernst D., Chesebro B. (1988). Analysis of frequency of infection, specific infectivity and prion protein biosynthesis in scrapie-infected neuroblastoma cells. *J. Virol.* 62, 2845-2849.

Rambold AS, Müller V, Ron U, Ben-Tal N, Winklhofer KF, Tatzelt J (2008) Stress-protective activity of prion protein is corrupted by scrapie-prions. *Embo J* 27: 1974-1984

Ramljak S, Asif AR, Armstrong VW, Wrede A, Groschup MH, Buschmann A, Schulz-Schaeffer W, Bodemer W, Zerr I. (2008). Physiological role of the cellular prion protein (PrP^c): protein profiling study in two cell culture systems. *J Proteome Res.* 7(7): 2681-2695.

Rangel A, Burgaya F, Gavin R, Soriano E, Aguzzi A, Del Rio JA (2007) Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: Role of AMPA/kainate receptors. *J Neurosci Res* 85: 2741-2755

Rehm Hubert, *Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 3. Auflage 2000.

Rejman J, Bragonzi A, Conese M. Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol Ther.* 2005 Sep;12(3):468-74.

Ren M, Xu G, Zeng J, De Lemos-Chiarandini C, Adesnik M, Sabatini DD. Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar

LITERATURVERZEICHNIS

recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 26;95(11):6187-92.

Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wüthrich K. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.* 1997 Aug 18;413(2):282-8

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

Rietveld A, Neutz S, Simons K, Eaton S. Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol- linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains. *J Biol Chem.* 1999 Apr 23;274(17):12049-54.

Rivera-Milla E, Stuermer CA, Málaga-Trillo E. An evolutionary basis for scrapie disease: identification of a fish prion mRNA. *Trends Genet.* 2003 Feb;19(2):72-5

Robakis N.K., Devine-Gage E.A., Jenkins E.C., Kascsak R.J., Brown W.T., Krawczun M.S., Silverman W.P. (1986). Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the p arm of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140(2): 758-65.

Robertson C, Booth SA, Beniac DR, Coulthart MB, Booth TF, McNicol A. Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets. *Blood.* 2006 May 15;107(10):3907-11.

Rogers M., Serban D., Gyuris T., Scott M., Torchia T. and Prusiner S.B. (1991) Epitope mapping of the Syrian hamster prion protein utilizing chimeric and mutant genes in a vaccinia virus expression system. *J Immunol.* 147, 3568-3574.

Ross ED, Minton A, Wickner RB. Prion domains: sequences, structures and interactions. *Nat Cell Biol.* 2005 Nov;7(11):1039-44.

Rossi D, Cozzio A, Flechsig E, Klein MA, Rüllicke T, Aguzzi A, Weissmann C. (2001) Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *EMBO J.* Feb 15;20(4):694-702.

Rothberg KG, Ying YS, Donzell WC, Kamen DA, Anderson RGW. Cholesterol controls the clustering of the glycosphospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J. Cell. Biol.* 1990 111:2931-2938.

Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 1992 Feb 21;68(4):673-82.

Rothman JE, Schmid SL. Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. *Cell.* 1986 Jul 4;46(1):5-9.

LITERATURVERZEICHNIS

Rubenstein R, Carp RI, Callahan SM. In vitro replication of scrapie agent in a neuronal model: infection of PC12 cells. *J Gen Virol.* 1984 Dec;65 (Pt 12):2191-8.

Safar J., Roller PP., Gajdusek DC. and Gibbs CJ. Jr. (1993) Conformational transitions, dissociation and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *The Journal of biological chemistry* 268, 20276-20284.

Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med.* 1998 Oct;4(10):1157-65

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY USA Second Edition 1989

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74(12): 5463-7.

Sarnataro D, Campana V, Paladino S, Stornaiuolo M, Nitsch L, Zurzolo C. PrP(C) association with lipid rafts in the early secretory pathway stabilizes its cellular conformation. *Mol Biol Cell.* 2004 Sep;15(9):4031-42

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

Schätzl H.M., Laszlo L., Holtzman D.M., Tatzelt J., De Armond S., Weiner R.I., Mobley W.C., Prusiner S.B. (1997) A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J. Virol.* 71(11): 8821-8831.

Schätzl H.M. (2002). Therapeutische und prophylaktische Ansätze bei Prion-Erkrankungen. *Nova Acta Leopoldina* 327: 65-79.

Schätzl H.M. (2003). Der aktuelle Erkenntnisstand bei BSE und der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung. *Gesundheitswesen* 65(1): 13-19.

Scheiffele P, Roth MG, Simons K. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J.* 1997 Sep 15;16(18):5501-8.

Schmid SL, Carter LL. ATP is required for receptor-mediated endocytosis in intact cells. *J Cell Biol.* 1990 Dec;111(6 Pt 1):2307-18.

Schmitt-Ulms G., Legname G., Baldwin MA., Ball HL., Bradon N., Bosque PJ et al. (2001). Binding of neural cell adhesion molecules (N-Camsa) to the cellular prion protein. *J Mol Biol* 314, 1209-1225.

Schroeder RJ, Ahmed SN, Zhu Y, London E, Brown DA. Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored

proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *J Biol Chem.* 1998 Jan 9;273(2):1150-7.

Schuck S, Simons K. Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci.* 2004 Dec 1;117(Pt 25):5955-64

Scott M., Foster D., Mirenda C., Serban D., Coufal F., Walchli M., Torchia M., Groth D., Carlson G., DeArmond S.J. et al. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59, 847-857.

Scott M.R., Köhler R., Foster D., Prusiner S.B. (1992). Chimeric prion protein expression in cultured cells and transgenic mice. *Protein Sci.* 79, 986-997.

Scott M., Groth D., Foster D., Torchia M., Yang S.L., DeArmond S.J., Prusiner S.B. (1993). Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell.* 73(5):979-88.

Seabra M.C., Wasmeier C. (2004). Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Cell Biol.* 16:451-457.

Serio TR, Cashikar AG, Kowal AS, Sawicki GJ, Lindquist SL. Self-perpetuating changes in Sup35 protein conformation as a mechanism of heredity in yeast. *Biochem Soc Symp.* 2001;(68):35-43.

Shyng SL, Heuser JE, Harris DA. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol.* 1994 Jun;125(6):1239-50

Shyng SL, Lehmann S, Moulder KL, Harris DA. Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrPC, in cultured cells. *J Biol Chem.* 1995 Dec 15;270(50):30221-9.

Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Ding DC, Li KW, Chen SF, Yang HI, Li H (2005) Overexpression of PrPC by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model. *J Neurosci* 25: 8967-8977

Sieczkarski S.B., Whittaker G.R. (2003). Dissecting virus entry via endocytosis. *J. Gen. Virol.* 83, 1535-1545.

Sigurdson CJ, Miller MW. Other animal prion diseases. *Brit Med Bull.* 2003;66:199–212. doi: 10.1093/bmb/66.1.199.

Sigurdson C, Polymenidou M, Aguzzi A. Reconstructing prions: fibril assembly from simple yeast to complex mammals. *Neurodegener Dis.* 2005;2(1):1-5.

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct;1(1):31-9. Review. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Mar;2(3):216.

Simons M, Krämer EM, Thiele C, Stoffel W, Trotter J. Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *J Cell Biol.* 2000 Oct 2;151(1):143-54.

Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 1997 Jun 5;387(6633):569-72. Review.

Smart EJ, Ying Y, Donzell WC, Anderson R. A Role for Caveolin in Transport of Cholesterol from Endoplasmic Reticulum to Plasma Membrane. 1996. *Biol.Chem.* 271 (46): 29427-29435.

Soto C, Estrada L, Castilla J. Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. *Trends Biochem Sci.* 2006 Mar;31(3):150-5.

Spencer MD., Knight RS., Will RG. First hundred cases of variant CJD: Retrospective cases note review of early psychiatric and neurological features. *BMJ* 324: 1479-1482. 2002.

Sparkes RS, Simon M, Cohn VH, Fournier RE, Lem J, Klisak I, Heinzmann C, Blatt C, Lucero M, Mohandas T, et al. Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986 Oct;83(19):7358-62

Spielhauer C., Schätzl H.M. (2001). PrP^C directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 276(48): 44604-44612.

Spudich A, Frigg R, Kilic E, Kilic U, Oesch B, Raeber A, Bassetti CL, Hermann DM. Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1. *Neurobiol Dis.* 2005 Nov;20(2):442-9

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

Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner SB. Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry.* 1993 Mar 2;32(8):1991-2002

Steele-Mortimer O, Méresse S, Gorvel JP, Toh BH, Finlay BB. Biogenesis of Salmonella typhimurium-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol.* 1999 Jul;1(1):33-49.

Stenmark H, Parton RG, Steele-Mortimer O, Lütcke A, Gruenberg J, Zerial M: Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J* 1994, 13:1287-1296.

Stenmark H, Vitale G, Ullrich O, Zerial M: Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell* 1995, 83:423-432.

Stenmark H., Olkkonen V.M. (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biology* 2(5), 3007.1-3007.7.

LITERATURVERZEICHNIS

Stewart RS, Piccardo P, Ghetti B, Harris DA. Neurodegenerative illness in transgenic mice expressing a transmembrane form of the prion protein. *J Neurosci.* 2005a Mar 30;25(13):3469-77

Stewart RS, Harris DA. A transmembrane form of the prion protein is localized in the Golgi apparatus of neurons. *J Biol Chem.* 2005b Apr 22;280(16):15855-64.

Stöckel J., Safar J., Wallace A.C., Cohen F.E., Prusiner S.B. (1998). Prion protein selectively binds Copper(II) ions. *Biochem.* 37(20): 7185-93.

Sumudhu W, Perera S, Hooper NM (2001) Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Cur Biol* 11:519-523

Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R. The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J.* 2003 Jul 15;22(14):3591-601

Suzuki T, Kurokawa T, Hashimoto H, Sugiyama M. cDNA sequence and tissue expression of *Fugu rubripes* prion protein-like: a candidate for the teleost orthologue of tetrapod PrPs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jun 21;294(4):912-7

Sviridov D, Fidge N, Beaumier-Gallon G, Fielding C. Apolipoprotein A-I stimulates the transport of intracellular cholesterol to cell-surface cholesterol-rich domains (caveolae). *Biochem.J.*(2001) 358,79-86.

Takei K, McPherson PS, Schmid SL, De Camilli P. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature.* 1995 Mar 9;374(6518):186-90.

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 2001 Jan;81(1):153-208. Review.

Tamgüney G., Miller MW., Wolfe LL., Sirochman TM., Glidden DV., Palmer C., Lemus A., DeArmond SJ., Prusiner SB. Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces. *Nature* 461: 529-532. 2009

Tanaka M, Chien P, Naber N, Cooke R, Weissman JS. Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature.* 2004 Mar 18;428(6980):323-8

Taraboulos A., Rogers M., Borchelt D.R., McKinley M.P., Scott M., Serban D., Prusiner S.B. (1990a). Acquisition of protease resistance by prion proteins in scrapie-infected cells does not require asparagine-linked glycosylation. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 87(21): 8262-6.

Taraboulos A., Serban D., Prusiner S.B. (1990b). Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. *J Cell Biol* 110, 2117-2132.

LITERATURVERZEICHNIS

- Taraboulos A., Raeber A.J., Borchelt D.R., Serban D., Prusiner S.B. (1992). Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol. Biol. Cell.* 3(8): 851-63.
- Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Prusiner SB. Biosynthesis of the prion proteins in scrapie-infected cells in culture. *Braz J Med Biol Res.* 1994 Feb;27(2):303-7.
- Taraboulos A., Scott M., Semenov A., Avrahami D., Laszlo L., Prusiner S.B. (1995). Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J. Cell Biol.* 129(1): 121-32.
- Taylor DR, Watt NT, Perera WS, Hooper NM. Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci.* 2005 Nov 1;118(Pt 21):5141-53.
- Taylor DR, Hooper NM. The prion protein and lipid rafts. *Mol Membr Biol.* 2006 Jan-Feb;23(1):89-99. Review.
- Taylor DR, Hooper NM. Role of lipid rafts in the processing of the pathogenic prion and Alzheimer's amyloid-beta proteins. *Semin Cell Dev Biol.* 2007 Oct;18(5):638-48.
- Telling G.C., Scott M., Mastrianni J., Gabizon R., Torchia M., Cohen F.E., DeArmond S.J., Prusiner S.B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell.* 83(1): 79-90.
- Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Mastrianni J, Lugaresi E, Gambetti P, Prusiner SB. Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science.* 1996 Dec 20;274(5295):2079-82
- Tejerizo G, Domenech A, Illera JC, Collado VM, Gomez-Lucia E. Effect of 17beta-estradiol and progesterone on the expression of FeLV in chronically infected cells. *Vet Microbiol.* 2005 Aug 30;109(3-4):191-9.
- Thomas CM, Smart EJ. Caveolae structure and function. *J Cell Mol Med.* 2008 Jun;12(3):796-809. Epub 2008 Feb 27. Review.
- Tobler I., Gaus S.E., Deboer T., Achermann P., Fischer M., Rulicke T., Moser M., Oesch B., McBride P.A., Manson J.C. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380, 639-642.
- Touchot N, Chardin P, Tavitian A: Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84:8210-8214.

LITERATURVERZEICHNIS

Ullrich O, Stenmark H, Alexandrov K, Huber LA, Kaibuchi K, Sasaki T, Takai Y, Zerial M: Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *J Biol Chem* 1993, 268:18143-18150.

Ullrich O, Horiuchi H, Bucci C, Zerial M. Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature*. 1994 Mar 10;368(6467):157-60.

Ullrich O, Reinsch S, Urbé S, Zerial M, Parton RG. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol*. 1996 Nov;135(4):913-24.

Urbé S, Huber LA, Zerial M, Tooze SA, Parton RG. Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells. *FEBS Lett*. 1993 Nov 15;334(2):175-82.

Urrutia R, Henley JR, Cook T, McNiven MA. The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jan 21;94(2):377-84. Review.

Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*. 1997 Sep 15;11(18):2295-322. Review.

Van der Goot FG, Harder T. Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Semin Immunol*. 2001 Apr;13(2):89-97.

Van Der Sluijs P, Hull M, Zahraoui A, Tavitian A, Goud B, Mellman I. The small GTP-binding protein rab4 is associated with early endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jul 15;88(14):6313-7.

Van der Sluijs P., Hull M., Webster P., Male P., Goud B., Mellman I. (1992). The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell*. 70(5): 729-40.

Van Deurs B, Holm PK, Kayser L, Sandvig K, Hansen SH. Multivesicular bodies in HEp-2 cells are maturing endosomes. *Eur J Cell Biol*. 1993 Aug;61(2):208-24.

Vassallo N, Herms J (2003) Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J Neurochem* 86: 538-544

Veith NM, Plattner H., Stuermer CA, Schulz-Schaeffer WJ, Bürkle A. (2009). Immunolocalisation of PrP^{Sc} in scrapie-infected N2a mouse neuroblastoma cells by light and electron microscopy. *Eur.J.Cell.Biol*. Jan; 88(1): 45-63.

Vella LJ, Sharples RA, Lawson VA, Masters CL, Cappai R, Hill AF. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol*. 2007 Apr;211(5):582-90.

Vey M., Pilkuhn S., Wille H., Nixon R., DeArmond S.J., Smart E.J., Anderson R.G., Taraboulos A., Prusiner S.B. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and

scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93(25): 14945-9.

Vilette D, Androletti O, Archer F, Madelaine MF, Vilotte JL, Lehmann S, Laude H. Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar 27;98(7):4055-9. Epub 2001 Mar 20.

Villmann C, Becker CM (2007) On the hypes and falls in neuroprotection: targeting the NMDA receptor. Neuroscientist 13: 594-615

Vorberg I., Raines A., Story B., Priola S.A. (2004a). Susceptibility of common fibroblast cell lines to transmissible spongiform encephalopathy agents. J. Infect. Dis. 189: 431-9.

Vorberg I., Raines A., Priola S.A. (2004b). Acute formation of protease-resistant prion protein does not always lead to persistent scrapie infection in vitro. J. Biol. Chem. 279(28): 29218-25.

Wadsworth D.J., Jackson G.S., Hill A.F., Collinge J. (1999). Molecular biology of prion propagation. Curr. Opin. Genet. Dev. 9, 338-345.

Wadsworth JD, Joiner S, Fox K, Linehan JM, Desbruslais M, Brandner S, Asante EA, Collinge J. Prion infectivity in variant Creutzfeldt-Jakob disease rectum. Gut. 2007 Jan;56(1):90-4.

Wadsworth JD, Joiner S, Linehan JM, Desbruslais M, Fox K, Cooper S, Croiner S, Asante EA, Mead S, Brandner S, Hill AF, Collinge J. Review: The origin of the prion agent of kuru: molecular and biological strain typing. 2008 Mar; 105(10):3885-90.

Watts C.J., Balachandran A., Westaway D. (2006). The expanding universe of prion diseases. PLOS Pathog. 2, e26.

Watts JC, Drisaldi B, Ng V, Yang J, Strome B, Horne P, Sy MS, Yoong L, Young R, Mastrangelo P, Bergeron C, Fraser PE, Carlson GA, Mount HT, Schmitt-Ulms G, Westaway D. (2007) The CNS glycoprotein Shadoo has PrP(C)-like protective properties and displays reduced levels in prion infections. EMBO J. Sep 5;26(17):4038-50.

Weise J, Crome O, Sandau R, Schulz-Schaeffer W, Bähr M, Zerr I. Upregulation of cellular prion protein (PrPc) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. Neurosci Lett. 2004 Nov 30;372(1-2):146-50

Weissmann C. The state of the prion. Nat Rev Microbiol. 2004 Nov;2(11):861-71.

Weissmann C., Fischer M., Raeber A., Bueler H., Sailer A., Shmerling D., Rulicke T., Brandner S. And Aguzzi A.(1996) The use of transgenic mice in the investigation of transmissible spongiform encephalopathies. Int J Exp Pathol 77, 283-293.

LITERATURVERZEICHNIS

Wells G.A., Scott A.C., Johnson C.T., Gunning R.F., Hancock R.D., Jeffrey M., Dawson M., 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 GA, Prusiner SB. Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jul 5;91(14):6418-22

Westergard L, Christensen HM, Harris DA. (2007) The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta.* Jun;1772(6):629-44.

White J., Johannes L., Mallard F., Girod A., Grill S., Reinsch S., Keller P., Tzschaschel B., Echard A., Goud B., Stelzer E.H.K. (1999). Rab6 coordinates a novel golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *Cell Biol.* 147(4): 743-759.

Wickner RB, Edskes HK, Shewmaker F, Nakayashiki T, Engel A, McCann L, Kryndushkin D. Yeast prions: evolution of the prion concept. *Prion.* 2007 Apr;1(2):94-100.

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

Will RG. Acquired prion disease: Iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. *Br Med Bull* 66: 255-265. 2003.

Wille H, Michelitsch MD, Guenebaut V, Supattapone S, Serban A, Cohen FE, Agard DA, Prusiner SB. Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar 19;99(6):3563-8.

Williams ES, Young S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.* 16(1): 89-98.

Williams ES. Chronic wasting disease. *Vet Pathol.* 2005 Sep;42(5):530-49.

Williams ES & Miller MW. Chronic wasting disease in deer and elk in North America. *Rev Sci Tech* 21: 305-316. 2002

Willingham MC, Rutherford AV, Gallo MG, Wehland J, Dickson RB, Schlegel R, Pastan IH. Receptor-mediated endocytosis in cultured fibroblasts: cryptic coated pits and the formation of receptosomes. *J Histochem Cytochem.* 1981 Sep;29(9):1003-13.

Wilson GM, Fielding AB, Simon GC, Yu X, Andrews PD, Hames RS, Frey AM, Peden AA, Gould GW, Prekeris R. The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis. *Mol Biol Cell.* 2005 Feb;16(2):849-60. Epub 2004 Dec 15.

LITERATURVERZEICHNIS

- Windl O, Dempster M, Estibeiro P, Lathe R. A candidate marsupial PrP gene reveals two domains conserved in mammalian PrP proteins. *Gene*. 1995 Jul 4;159(2):181-6.
- Wiseman F, Cancellotti E, Manson J. Glycosylation and misfolding of PrP. *Biochem Soc Trans*. 2005 Nov;33(Pt 5):1094-5
- Wong B.S., Pan T., Lin T., Li R., Gambetti P., Sy M.S. (2000). Differential contribution of superoxide dismutase activity by prion protein in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 273(1): 136-9.
- Wopfner F., Weidenhofer G., Schneider R., von Brunn A., Gilch S., Schwarz T.F., Werner T., 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(5): 1163-78.
- Wroe SJ, Pal S, Siddique D, Hyare H, Macfarlane R, Joiner S, Linehan JM, Brandner S, Wadsworth JD, Hewitt P, Collinge J. Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet*. 2006 Dec 9;368(9552):2061-7
- Wyatt JM., Pearson GR., Smerdon TN., Gruffydd-Jones TJ., Wells GA. Ans Wilesmith JW. (1991) Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Vet Rec* 129, 233-326.
- Yamada E. The fine structure of the renal glomerulus of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol*. 1955 Nov 25;1(6):551-66.
- Yamashiro DJ, Maxfield FR. Acidification of morphologically distinct endosomes in mutant and wild-type Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol*. 1987 Dec;105(6 Pt 1):2723-33.
- Zafar S, Ahsen N, Oellerich M, Zer I, Schulz-schaeffer WJ, Armstrong VW and Asif AR. Proteomics approach to identify the interacting partners of cellular prion protein and characterization of Rab7a interaction in neuronal cells. *J. Proteome Res*. 2011, 10, 3123-3135
- Zhang B, Chernoff J, Zheng Y. Interaction of Rac1 with GTPase-activating proteins and putative effectors. A comparison with Cdc42 and RhoA. *J Biol Chem*. 1998 Apr 10;273(15):8776-82.
- Zerial M, McBride H: Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, 2:107-117.
- Zigas V. Kuru in New Guinea: discovery and epidemiology. *Am J Trop Med Hyg*. 1970 Jan;19(1):130-2.

8 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
α	anti
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ACAT	Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase
AMPA	a-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid
AP1	Aktivierendes Protein 1
AP2	Adaptorprotein 2
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BHK	baby hamster kidney
BSA	Rinderserumalbumin
BSE	bovine spongiforme encephalopathy
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
c	cellular
CaCl_2	Calciumchlorid
CCL	certified cell line
CCP	Clathrin-coated pits
CD	circular dichroism
CGN	cerebellar granular cells
CHO	Chinese ovary cells
CJD	Creutzfeldt-Jakob disease
CLD	Caveloae-like domains
cm	Zentimeter
CME	Clathrin-vermittelte Endozytose
CO_2	Kohlendioxid
CTxB	Choleratoxin
Cu^{2+}	Kupfer
CWD	cronic wasting disease
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholsäure
Dpl	Doppel
dsDNA	doppelsträngige DNA

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

DY	<i>drowsy</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EE	early endosomes
EEA1	early endosomal antigen 1
EEG	Elektroenzephalographisch
ELISA	enzyme linked immuno sorbant assay
Engl.	Englisch
EPR	electron paramagnetic resonance
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Et al.	und andere
EU	europäische Union
EUE	exotic ungulate encephalopathy
ERC	Endocytisches Recycling Kompartiment
EtOH	Ethanol
fCJD	Familliäre CJD
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FKS	Fötales Kälberserum
FFI	fatale familiäre Insomnie
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FSE	feline spongiform encephalopathy
FTIR	transform infrared spectroscopy
g	Gramm
GAG	Glukosaminoglykane
GAP	GTPase aktivierende Proteine
GAPDH	glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase
GC	Guanosin Cytosin
GDI	G-Nukleotid-Dissoziationsinhibitoren
GDP	Guanidindiphosphat
GEF	G-Nukleotid-Austauschfaktoren
GFP	green fluorescent protein
GndHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GPI-Anker	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker
Grb2	glycine rich RNA binding protein 2
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
GT-1	hypothalamic cell line
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HC	heavy chain
H ₂ O ^{bidest}	destilliertes, entionisiertes Wasser
HMGCoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HPLC	high performance liquid chromatography
Hu/Mo	human/mouse
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP	heat shock protein
HTB	human tumor cell bank
HY	<i>hyper</i>
iCJD	iatrogene CJD
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KIF16B	kinesin superfamily 16B
konj.	konjugiert
l	Liter
LAMP	Lysosomen-assoziierte Membranproteine
LDL	Low-Density-Lipoproteine
LE	late endosomes
LR	Lamininrezeptor
LRP	Lamininrezeptor precursor
LRP1	Lipoprotein receptor-related Protein 1
Lsg.	Lösung
M	Molar
mA	Milliampere
MHM2	neuronale chimäre Maus-Hamster Zellen
mM	Millimolar
max.	maximal
MDCK	Madin-Darby Canine-Kidney
MEM	minimal essential medium
MetOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mind.	Mindestens
ml	Milliliter
MPRs	Mannose6-Phosphat-Rezeptoren
MVB	Multi-vesicular-bodies
mRNA	Messenger RNA
MTF-1	metal transcription factor
N2a	Neuroblastomzellen
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NCAM	neural cell-adhesion molecule
nm	Nanometer
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
NMR	nuclear mass resonance
OR	Octarepeats
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered Saline
PCMA	protein misfolding cyclic amplification reaction
pH	pondus Hydrogenii
PIP-LC	Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C
PS	Penicillin-Streptomycin
PK	Proteinase K
PPS	Pentosepolyphosphate
<i>PRND</i>	Gen kodiert für Protein Doppel
<i>PRNP</i>	Prionprotein-Gen
PrP	Prionprotein
Prnp ^{0/0}	PrP Knockout
PrP ^C	zelluläres Prionprotein (nicht pathogen)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PrP ^{sc}	mutiertes Prionprotein (pathogen)
PVDF	Polyvinylidin-Difluorid-Membran
Rab	Ras-related in brain
RC	Recycling-Kompartiment
RE	Recycling-Endosomen
REP	Rab escort protein
rpm	rounds per minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAF	scrapie-associated fibrils
Sc	Scrapie
sCJD	Sporadische CJD
S.D.	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDSL	side-directed spin labeling
Sho	Shadoo
SN56	neuronale septum cell line
SOD	Superoxid-Dismutase
Sog.	Sogenannt
SP1	specificity protein 1
<i>SPRN</i>	Gen kodiert für das Protein Shadoo
ssDNA	einzelsträngige DNA
STI1	stress-inducible protein 1
Tab.	Tabelle
TBST	Tris- buffered saline Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TfR	Endozytosemarkers Transferrin
TG	transgen
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
TME	transmissible mink encephalopathy
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) amino-methan
TSE	Transmissible spongiforme Enzephalopathie
U	Unit
u.a.	unter anderem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
UV	ultraviolett
V	Volt
vCJD	neue Variante von CJD
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrale Nervensystem
z. T.	zum Teil

Publikationen

Lutzny G, Kocher T, Schmidt-Supprian M, Rudelius M, Klein-Hitpass L, Finch AJ, Dürig J, Wagner M, Haferlach C, Kohlmann A, Schnittger S, Seifert M, Wanninger S, Zaborsky N, Oostendorp R, Ruland J, Leitges M, Kuhnt T, Schäfer Y, Lampl B, Peschel C, Egle A, Ringshausen I. Protein kinase C- β dependent activation of NF- κ B in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vivo. *Cancer Cell*. 2013 Jan;23:77-92.

Huber S, Oelsner M, Decker T, zum Büschenfelde CM, Wagner M, Lutzny G, Kuhnt T, Schmidt B, Oostendorp RA, Peschel C, Ringshausen I. Sorafenib induces cell death in chronic lymphocytic leukemia by translational downregulation of Mcl-1. *Leukemia*. 2011 May;25(5):838-47.

Gädtke L, Lutzny G, Krammer C, Rost R and Vorberg I. The importance of the PrP primary sequence in prion disease transmission. *The Cellular and Molecular Biology of Prion Disease*, 2011: 00-00 ISBN: 978-81-308-0446-0, Research Signpost 37/661 (2)

zum Büschenfelde CM, Wagner M, Lutzny G, Oelsner M, Feuerstacke Y, Decker T, Bogner C, Peschel C, Ringshausen I. Recruitment of PKC-beta11 to lipid rafts mediates apoptosis-resistance in chronic lymphocytic leukemia expressing ZAP-70. *Leukemia*. 2010 Jan;24(1):141-52.

Bogner C, Dechow T, Ringshausen I, Wagner M, Oelsner M, Lutzny G, Licht T, Peschel C, Pastan I, Kreitman RJ, Decker T. Immunotoxin BL22 induces apoptosis in mantle cell lymphoma (MCL) cells dependent on Bcl-2 expression. *Br J Haematol*. 2010 Jan;148(1):99-109.

Gilch S, Bach C, Lutzny G, Vorberg I, Schätzl HM. Inhibition of cholesterol recycling impairs cellular PrP(Sc) propagation. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Dec;66(24):3979-91.

PUBLIKATIONEN

Stengel A, Bach C, Vorberg I, Frank O, Gilch S, Lutzny G, Seifarth W, Erfle V, Maas E, Schätzl H, Leib-Mösch C, Greenwood AD. Prion infection influences murine endogenous retrovirus expression in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 May 12;343(3):825-31.

Greenwood AD, Horsch M, Stengel A, Vorberg I, Lutzny G, Maas E, Schädler S, Erfle V, Beckers J, Schätzl H, Leib-Mösch C. Cell line dependent RNA expression profiles of prion-infected mouse neuronal cells. *J Mol Biol.* 2005 Jun 10;349(3):487-500.

Danksagung

Professor Dr. Hermann Schätzl für die Möglichkeit in seinem Labor als Doktorandin zu arbeiten und für die stetige konstruktive Betreuung.

Dr. Ina Vorberg für die Vergabe eines interessanten Themas und die ständige Betreuung.

Meinem Doktorvater Professor Dr. Bauer für die offizielle und unkomplizierte Betreuung.

Claudia Kehler, die mir egal wie und wo immer als beste Freundin zur Seite steht.
Gunnar Schulz, der auch nach der gemeinsamen Laborzeit immer ein offenes Ohr hat.

Der kompletten Prionen-Arbeitsgruppe für viele Diskussionen, Anregungen und ein tolles Arbeitsklima.

Martha und Yasmine für ihre Zeit und konstruktive Kritik.

Meinen Kickboxmädeln, die mir auf die eine oder andere Weise immer eine Möglichkeit gegeben haben, wieder einen klaren Kopf zu bekommen.

Meinen Eltern, die in jeder Lebenslage immer hinter mir stehen.

Meinen beiden Brüdern, David und Philipp.

Axel, der mir immer den Rücken freihält.

Lebenslauf

Name	Gloria Vanessa Ingrid Lutzny
Geburtstag	04. März 1980
Geburtsort	Erding
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig
Schulbildung	09. 1996- 07. 1990: Grundschule in Erding 09. 1990- 07. 1999: Gymnasium Erding Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Studium	10. 1999- 04. 2005: Diplom-Biologiestudium, TU München Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Virologie, Zoologie 06. 2004- 04. 2005: Diplomarbeit (Institut für Virologie, TUM): „Die Rolle der Endozytose bei der Infektion von Zellen mit Erregern der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien“ 06. 2005- 07. 2008: Promotion in der Arbeitsgruppe von Dr. Vorberg und Prof. Dr. Schätzl am Institut für Virologie, TUM Betreuung durch Prof. Bauer am Lehrstuhl für Tierhygiene, WZW der Technischen Universität München
Erwerbstätigkeit	seit 07. 2008: Postdoc in der III. Medizinischen Klinik des Klinikum rechts der Isar, München (Hämatologische Forschung)