

**Einfluss der Kupferbindung
an der Aminosäureposition 95 im Prionprotein
auf den Krankheitsverlauf nach Prioninfektion**

Madeleine Eickhoff

Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Ehem. Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hans A. Kretzschmar

Komm. Leiter: Prof. Dr. Armin Giese

**Einfluss der Kupferbindung
an der Aminosäureposition 95 im Prionprotein
auf den Krankheitsverlauf nach Prioninfektion**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Madeleine Eickhoff

aus

Freiburg/Breisgau

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hans A. Kretzschmar/

Prof. Dr. med. A. Giese

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Frank Weber

.....

.....

Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiter: Dr. Sabina Eigenbrod

Dekan: Prof. Dr.med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2014

Für meine Familie

I	EINLEITUNG	1
I.1	Prionerkrankungen – ein Überblick	2
I.1.1	Ätiologie	2
I.1.2	Diagnostik und neuropathologische Befunde	4
I.2	Das physiologische Prionprotein: das PrP ^c	8
I.2.1	Definition	8
I.2.2	Bildung und Struktur	8
I.2.3	Endozytose und Proteinabbau	9
I.2.4	Physiologische Funktion des PrP ^c	10
I.3	Die pathologische Isoform des Prionproteins: das PrP ^{sc}	12
I.3.1	PrP ^{sc} – der Erreger der Prionerkrankungen	12
I.3.2	Infektion	12
I.3.3	Unterschiede des PrP ^{sc} im Vergleich zu PrP ^c	12
I.4	Prionerkrankungen und Kupfer	13
I.4.1	Die Bindung von Kupfer an das PrP und Einfluss auf die Pathologie	13
I.4.2	Einfluss der einzelnen Kupferbindungsstellen	14
II	Fragestellung und Zielsetzung	16
III	MATERIAL UND METHODEN	17
III.1	Versuchstiere	17
III.1.1	Kontrollgruppen	17
III.1.2	H95G-Mäuse	17
III.1.3	Infektion der Mäuse	18
III.1.4	Monitoring der Symptome und Beurteilung der Überlebenszeit nach Infektion	20
III.2	Herstellung von Organlysaten	20
III.2.1	Herstellung der Lysepuffer	20
III.2.2	Protokoll der Organlyse	21
III.2.3	Nachweis von Proteinen mittels Western Blot	21
III.2.4	Histologie und Immunhistochemie	30
III.2.5	Formalin-Fixierung	30

III.2.6	Paraffin-Einbettung	30
III.2.7	Färbung der Schnitte.....	32
III.2.8	Untersuchung des pathologischen Musters	33
IV	ERGEBNISSE	37
IV.1	Analyse des potentiellen Effektes der H95G-Mutation in nicht infizierten Mäusen.....	38
IV.1.1	Phänotyp und Symptomatik	38
IV.1.2	Histologische und immunhistochemische Aspekte	38
IV.1.3	Analyse von biochemischen Eigenschaften, Expression und Struktur des H95G-PrP ^c	47
IV.2	Analyse des Einflusses der H95G-Mutation auf Überlebenszeit und Phänotyp nach Infektion.....	53
IV.2.1	Symptomatik von infizierten H95G-Mäusen.....	53
IV.2.2	Überlebenszeit nach Infektion.....	54
IV.3	Analyse des Einflusses der H95G-Mutation auf typische neuropathologische Aspekte nach Infektion.....	57
IV.3.1	Überblick über histologische und immunhistochemische Ergebnisse.....	57
IV.3.2	Semiquantitative Untersuchung des pathologischen Musters	64
IV.4	Analyse des Einflusses der H95G-Mutation auf biochemische Eigenschaften des PrP ^{sc}	78
IV.4.1	Untersuchung des <i>Full-Length</i> -H95G-PrP ^{sc}	78
IV.4.2	Einfluss der H95G-Mutation auf den zellulären Abbau des PrP ^{sc}	79
IV.4.3	Analyse des Einflusses der H95G-Mutation auf die Proteaseresistenz des PrP ^{sc}	82
V	DISKUSSION.....	85
V.1	Einfluss der Kupferbindung an der Aminosäure Histidin 95 auf die Überlebenszeit nach Infektion	85
V.2	Einfluss der H95G-Mutation auf physiologisch und pathologisch relevante Sequenzen	87
V.2.1	Untersuchung des <i>Full-Length</i> -PrP ^c	87
V.2.2	Wahl des geeigneten Primär-Antikörpers und Untersuchung der Spaltprodukte.....	88
V.3	Einfluss der Kupferbindungsstelle am Histidin 95 auf die zelluläre Konzentration und Proteaseresistenz des Prionproteins.....	89
V.3.1	Einfluss der Kupferbindungsstelle Histidin 95 auf die zelluläre PrP ^c - und PrP ^{sc} -Konzentration... ..	89
V.3.2	Einfluss der Kupferbindungsstelle Histidin 95 auf den zellulären Abbau des Prionproteins	90
V.3.3	Einfluss der Kupferbindungsstelle Histidin 95 auf die Proteaseresistenz	91
V.4	Einfluss der Kupferbindungsstelle am Histidin 95 auf neuropathologische Veränderungen nach Infektion.....	92

V.4.1	Einfluss auf spongiforme Veränderungen	92
V.4.2	Einfluss auf plaqueartige PrP ^{sc} -Ablagerungen	93
V.4.3	Einfluss auf die synaptische Akkumulierung von PrP ^{sc}	95
V.4.4	Reaktive Astrozytose und H95G-PrP ^{sc}	98
VI	Zusammenfassung	100
VII	Literaturverzeichnis	101
VIII	Danksagung	109
IX	Lebenslauf	Error! Bookmark not defined.
X	Abkürzungsverzeichnis.....	110

Legenden

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiel von synaptischen (A) und plaqueartigen (B) PrP ^{sc} -Ablagerungen in erkrankten Maushirnen	4
Abbildung 2: Spongiforme Veränderungen [54]	6
Abbildung 3: Reaktive Astrozytose	7
Abbildung 4: Struktur des posttranslationalen PrP ^c (angelehnt an [68, 73])	8
Abbildung 5: Deglykosylierung durch PNGaseF und schematische Darstellung im Western Blot	22
Abbildung 6: Schema Behandlung der Proben: Denaturierung, PK-, PNGaseF- und Doppelverdau	24
Abbildung 7: Definierte Schnitthöhen der Maushirne	30
Abbildung 8: Beurteilte Hirnregionen im Koronarschnitt	31
Abbildung 9: Scoring der spongiformen Veränderungen in der grauen Substanz, Bilder aus [182, 185]	34
Abbildung 10: Scoring der spongiformen Veränderungen in der weißen Substanz nach Infektion	34
Abbildung 11: Scoring der Ausprägung von Astrozytose nach Infektion	35
Abbildung 12: Scoring der Ausprägung von PrP ^{sc} -Ablagerungen (synaptisch und plaqueartig)	36
Abbildung 13: Beurteilte murine Hippocampus-Region	39
Abbildung 14: Liniencharakterisierung – Beispielhafte Darstellung histologischer und immunhistochemischer Befunde der Hippocampus-Region der H95G-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp vor Infektion	40
Abbildung 15: Beurteilte murine Kleinhirn-Region	41
Abbildung 16: Liniencharakterisierung - Beispielhafte Darstellung histologischer und immunhistochemischer Befunde der Kleinhirn-Region der H95G-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp vor Infektion	42
Abbildung 17: Beurteilte murine zerebrale Cortex-Region	43
Abbildung 18: Liniencharakterisierung - Beispielhafte Darstellung histologischer und immunhistochemischer Befunde der zerebralen Cortex-Region der H95G-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp	44
Abbildung 19: Liniencharakterisierung - Beispielhafte Darstellung immunhistochemischer Befunde von verschiedenen Organen	46
Abbildung 20: Liniencharakterisierung: Antikörper-Mapping	48
Abbildung 21: Western Blot zur Liniencharakterisierung - nach Denaturierung	49
Abbildung 22: Liniencharakterisierung – Verdünnungsreihen	51
Abbildung 23: Western Blot zur Liniencharakterisierung - nach Deglykosylierung	52
Abbildung 24: Analyse der Überlebenszeit von H95G-Mäusen vs. Wildtyp-Mäusen nach RML-Infektion mittels Kaplan-Meier-Kurve	55
Abbildung 25: Analyse der Überlebenszeit der Mäuse zweiter Passage nach Infektion mittels Kaplan-Meier-Kurve	56
Abbildung 26: Beispielhafte Darstellung der immunhistochemischen Ergebnissen bei den RML-infizierten Mäusen in Bereich der Cortex-Hirnregion auf Höhe des Septums: PrP ^{sc} - und GFAP-Färbung	59

Abbildung 27: Beispielhafte Darstellung der Immunhistochemie bei den RML-infizierten Mäusen in Bereich der Cortex-Hirnregion auf Höhe des Septums: HE-Färbung	60
Abbildung 28: Beispielhafte Darstellung der immunhistochemischen Ergebnissen bei den Mäusen nach Infektion zweiter Passage in Bereich der Cortex-Hirnregion auf Höhe des Septums: PrP ^{sc} - und GFAP-Färbung	62
Abbildung 29: Beispielhafte Darstellung der Immunhistochemie bei den Mäusen nach Infektion zweiter Passage in Bereich der Cortex-Hirnregion auf Höhe des Septums: HE-Färbung	63
Abbildung 30: Auswertung Ausprägung der spongiformen Veränderungen nach RML-Infektion je nach Hirnregion	65
Abbildung 31: Auswertung Ausprägung der spongiformen Veränderungen nach Infektion zweiter Passage je nach Hirnregion	67
Abbildung 32: Auswertung Ausprägung der Astrozytose nach RML-Infektion je nach Hirnregion	69
Abbildung 33: Auswertung Ausprägung der Astrozytose nach Infektion zweiter Passage je nach Hirnregion	71
Abbildung 34: Auswertung Ausprägung der plaqueartigen PrP ^{sc} -Ablagerungen nach RML-Infektion	73
Abbildung 35: Auswertung Ausprägung der plaqueartigen PrP ^{sc} -Ablagerungen nach Infektion zweiter Passage je nach Hirnregion	74
Abbildung 36: Auswertung Ausprägung der synaptischen PrP ^{sc} -Ablagerungen nach RML-Infektion je nach Hirnregion	76
Abbildung 37: Auswertung Ausprägung der synaptischen PrP ^{sc} -Ablagerungen nach Infektion zweiter Passage je nach Hirnregion	77
Abbildung 38: Western Blot nach Denaturierung – Beurteilung des H95G-FL-PrP ^{sc} nach RML-Infektion	78
Abbildung 39: Western Blot nach Denaturierung - Beurteilung des FL-PrP ^{sc} bei den Mäusen nach Infektion zweiter Passage	79
Abbildung 40: Western Blot nach PNGaseF-Verdau - RML-infizierte Mauslinien	80
Abbildung 41: Auswertung Western Blot nach PNGaseF-Verdau - RML-infizierte Mauslinien	81
Abbildung 42: Auswertung Western Blot nach PNGaseF-Verdau - Mauslinien nach Infektion zweiter Passage ..	81
Abbildung 43: Auswertung Western Blot nach PNGaseF-Verdau – Mäuse nach Infektion zweiter Passage	82
Abbildung 44: Western Blot nach PK-Verdau - RML-infizierte Mauslinien	83
Abbildung 45: Western Blot - Mäuse zweiter Passage nach PK-Verdau	84
Abbildung 46: Infektion zweiter Passage zur Untersuchung der stabilen Inkubationszeit	86
Abbildung 47: Antikörperbindungsstellen und wichtige physiologische und PK-Spaltstellen des murinen PrP ^c und PrP ^{sc}	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht RML-infizierte Mauslinien	19
Tabelle 2: Übersicht Mausgruppen nach Infektion zweiter Passage.....	19
Tabelle 3: Zusammensetzung von HL-Puffer	20
Tabelle 4: Herstellung von 5x-Lämmli-Puffer	25
Tabelle 5: Zusammensetzung von Trenngel- und Sammelgelpuffer.....	25
Tabelle 6: Zusammensetzung Trenngel und Sammelgel.....	26
Tabelle 7: Zusammensetzung von 10x Laufpuffer	27
Tabelle 8: Zusammensetzung Blotting-Puffer	27
Tabelle 9: Zusammensetzung von PBST und Milchpulver-Lösung.....	28
Tabelle 10: Zusammensetzung Alkalische-Phosphatase-Puffer	28
Tabelle 11: Eingesetzte Antikörper	29

I EINLEITUNG

Aufgrund der demografischen Veränderungen unserer Gesellschaft treten in Europa zunehmend neurodegenerative Erkrankungen auf. Aktuelle Daten belegen, dass gegenwärtig über sieben Millionen Menschen in Europa von neurodegenerativen Erkrankungen betroffen sind – eine Zahl, die sich in den kommenden zwanzig Jahren voraussichtlich noch verdoppeln wird [1]. Zu ihnen gehören neben den Prionerkrankungen unter anderem auch Taupathien und Synukleopathien. Diesen Erkrankungen ist ein progressiver Neuronenverlust gemeinsam, der im klinischen Verlauf meist mit einer fortschreitenden Demenz einhergeht. Über M. Alzheimer, die häufigste Form der neurodegenerativen Erkrankungen, schrieb PF Chapman:

"[It] is a devastating illness that robs humans of their ability to remember, to think and to understand – all the things we cherish most about being human." [2]

In den letzten Jahren wurden neben diesen klinischen Gemeinsamkeiten zudem zahlreiche gemeinsame neuropathologische Charakteristika zwischen diesen Erkrankungen, insbesondere zwischen M. Alzheimer und Prionerkrankungen [3-7], dargestellt, die auch im Tiermodell reproduziert werden konnten [8, 9]. Prionerkrankungen sind infektiöse neurodegenerative Erkrankungen insgesamt geringer Inzidenz. Sie sind, wie der spätere Nobelpreisträger Stanley Prusiner zeigte, durch das sog. PrP^{sc} - die pathologische Scrapie Isoform des physiologischen, zellulären (englisch: *cellular*) Prionoproteins (PrP^c) - bedingt [10]. Hier finden sich extrazelluläre Ablagerungen des PrP^{sc}, spongiforme Veränderungen sowie Astrogliose und Mikrogliaaktivierung.

M. Alzheimer betrifft weltweit ca. 24 Millionen Menschen [11] und ist insbesondere durch die Bildung von extrazellulären β -Amyloid-Ablagerungen und intrazellulären Ablagerungen von Tau-Protein, einem Strukturprotein, gekennzeichnet. Weiterhin treten auch hier granulovakuoläre Degeneration sowie eine reaktive Astrozytose und Mikrogliaaktivierung auf [12]. Die genaue Ursache der Erkrankung ist bisher noch ungeklärt, aktuelle Ergebnisse lassen jedoch ähnliche Ausbreitungsmuster der neuropathologischen Veränderungen vermuten [13, 14]. Auffällig ist ebenfalls, dass im Rahmen beider Erkrankungen häufig Metallen, wie insbesondere Kupfer, eine krankheitsmodulierende Rolle zugeschrieben wurde [15-18]. Möglicherweise können Erkenntnisse über Prionerkrankungen, neben Informationen über einen bisher einzigartigen Pathomechanismus, bei dem ein Protein als infektiöser Erreger agiert, auch eine Hilfe im Verständnis von weiteren neurodegenerativen Erkrankungen bringen.

Anhand eines genetischen Konstruktes des murinen PrP^c mit einer Mutation des Histidins an der Aminosäureposition 95 (H95G-PrP^c) haben wir im Rahmen dieser Arbeit untersucht, in wie weit die Kupferbindung an dieser Stelle einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf und auf neuropathologische Aspekte nach Infektion besitzt.

Einführung in die Thematik

I.1 Prionerkrankungen – ein Überblick

Prionerkrankungen sind neurodegenerative Erkrankungen, im Allgemeinen TSE (*Transmissible Spongiform Encephalopathies* – „Übertragbare Spongiforme Enzephalopathien“) genannt. Sie verlaufen bis heute ausschließlich tödlich, eine symptomatische Therapie besteht bisher nur teilweise.

I.1.1 Ätiologie

Prionerkrankungen können sowohl nach Kontakt unterschiedlicher Art mit bereits pathologischen Prionproteinen (PrP^{sc}) erworben als auch vererbt werden, sowie nach spontaner genetischer Mutation des PRNP-Gens [19] entstehen. In den meisten Fällen bleibt die Ursache jedoch ungeklärt (idiopathisch). Die Prävalenz dieser Erkrankungen entspricht aktuell insgesamt etwa 1,0-1,5/1.000.000 Einwohner [20]. Aufgrund der raschen Krankheitsentwicklung mit letalem Ausgang sind Prävalenz und Inzidenz vergleichbar. Insbesondere der Genotyp am Kodon 129 scheint sich dabei auf die unterschiedliche Ausprägung der Symptome und die Prognose auszuwirken [21, 22].

I.1.1.1 Erworbene Prionerkrankungen

Es werden die Kuru-Erkrankung, die iatrogene und die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (CJD) zu dieser Form gezählt. Die Übertragungswege dieser Erkrankungen sind dabei unterschiedlich.

Die Kuru-Erkrankung, die vor allem in Papua-Neuguinea auftrat, steht in Verbindung mit dort praktizierten kannibalischen Ritualen mancher Stämme bis in die 1950er Jahre [23, 24]. Diese Erkrankung ist durch eine - nach einer teilweise sehr langen Inkubationszeit (bis zu über 50 Jahre) - progressive zerebelläre Ataxie gekennzeichnet. Klassischerweise treten später im Krankheitsverlauf zusätzlich dementielle Symptome auf [25-27]. Seit Verzicht auf Kannibalismus ist diese Erkrankung heute sehr selten. Die iatrogene CJD (iCJD) hingegen entspricht heute etwa 5% aller CJDs [28] und wurde z.B. nach neurochirurgischen Eingriffen, wie z. B. nach Dura-Mater-Transplantationen, oder als Folge einer Therapie mit humanen Wachstumshormonen, beschrieben [19]. Großes Aufsehen erregte die neue Variante von CJD (vCJD), die erstmals 1995/96 in Großbritannien auftrat. Sie wird als Folge der Übertragung von BSE (*Bovine Spongiforme Enzephalopathy* – „spongiose Rinder-Enzephalopathie“) auf den Menschen zurückgeführt [29]. Seit 1996 sind weltweit ca. 225 Fälle bekannt [19]. Man nimmt an, dass BSE eine Zoonose ist, die erst von Schafen, die mit Scrapie befallen waren, auf Rinder und anschließend durch den Verzehr von Fleisch infizierter Tiere auf den Menschen übertragen wurde [19]. Die vCJD äußert sich klinisch durch früh einsetzende, progressive psychiatrische Störungen über einen Zeitraum von über

Einleitung

sechs Monaten, sowie persistierende und schmerzhafte Parästhesien und motorische Störungen (Ataxie, Chorea, Dystonie, Myoklonus). Im Endstadium tritt gehäuft Demenz auf [30].

I.1.1.2 Genetische Prionerkrankungen

Zu den genetischen Prionerkrankungen gehören die Familiäre CJD, das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und die *Fatal Familial Insomnia* (FFI, „Tödliche Familiäre Schlaflosigkeit“). Sie sind autosomal-dominant vererbbar, die Penetranz ist fast 100% [31].

Die Familiäre CJD ist durch das Auftreten von neuropsychiatrischen Symptomen (entsprechend den Symptomen einer sporadischen CJD, s.u.) und eine positive Familienanamnese gekennzeichnet [19].

Das GSS hingegen tritt bei etwa 1 von 1.000.000 Menschen als Folge bestimmter Mutationen im PRNP-Gen auf. Eine Mutation am menschlichen Kodon 102, die zur Substitution von Prolin durch Leucin führt, wurde hier als häufigste Ursache von GSS beschrieben [32, 33]. Es wurde erstmals 1928 von Josef Gerstmann und seinen Mitarbeitern beschrieben und äußert sich durch eine prominente, langsam fortschreitende Ataxie, sowie durch kognitiven Abbau und Pseudobulbärparalyse mit Dysphagie und Dysarthrie [34].

Die FFI ist eine Prionerkrankung mit besonderer Ausprägung im Bereich des Thalamus [35]. Sie wird in Zusammenhang mit der sogenannten E200K-Mutation am PRNP-Gen gebracht, die am Kodon 200 den Austausch von Glutamat durch Lysin zur Folge hat [36]. Die FFI ist hauptsächlich durch folgende Symptome charakterisiert: Schlafstörungen, autonome Hyperaktivierung und motorische Störungen wie Myoklonus, Ataxie, Dysarthrie, Dysphagie [37, 38]. Weltweit sind aktuell etwa 100 Fälle bekannt [38].

I.1.1.3 Idiopathische (sporadische) Prionerkrankung

Die idiopathische bzw. sporadische CJD (sCJD) ist mit 85% aller Prionerkrankungen (ca. 1/1.000.000 Menschen) die häufigste Form [28]. Sie wurde 1920 von Hans Gerhard Creutzfeldt (1885–1964) und 1921 von Alfons Maria Jakob (1884–1931) als eine seltene, schnell progrediente und fatale Enzephalopathie beschrieben [39, 40]. Bei einer sCJD entwickeln die Patienten eine rasch progrediente Demenz innerhalb von zwei Jahren. Zusätzlich treten häufig Myoklonus, visuelle oder zerebelläre Störungen, (extra-)pyramidale Dysfunktionen und akinetischer Mutismus auf [41].

Einleitung

I.1.2 Diagnostik und neuropathologische Befunde

Zur Diagnostik können neben der oben beschriebenen Kombination aus Symptomen und Anamnese [31] verschiedene Parameter zur Diagnose herangezogen werden, wie z.B. EEG-Veränderungen, Liquoranalysen oder Bildgebungsverfahren. Die sichere Diagnose von Prionerkrankungen kann allerdings erst anhand von molekulargenetischen, histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen gestellt werden. In histologischen und immunhistochemischen Färbungen werden typische Veränderungen, wie insbesondere Ablagerungen von PrP^{sc}, spongiforme Veränderungen, reaktive Mikroglia-Aktivierung und Astrozytose, sowie neuronaler Zellverlust [41], beurteilt. Die Lokalisation dieser pathologischen Merkmale scheint dabei stark abhängig von Glykosylierung [42], Kodon 129 des PRNP-Gens [43] und CJD-Typ zu sein [44].

I.1.2.1.1 PrP^{sc}- Ablagerungen

Es werden mehrere Formen der PrP^{sc}-Ablagerungen unterschieden. Die verschiedenen Formen können parallel auftreten, am häufigsten sind die synaptische sowie die plaqueartige Form (Abbildung 1). Der Polymorphismus am Kodon 129 scheint einen wichtigen Einfluss auf den Ablagerungstyp und klinischen Phänotyp zu besitzen [21, 45].

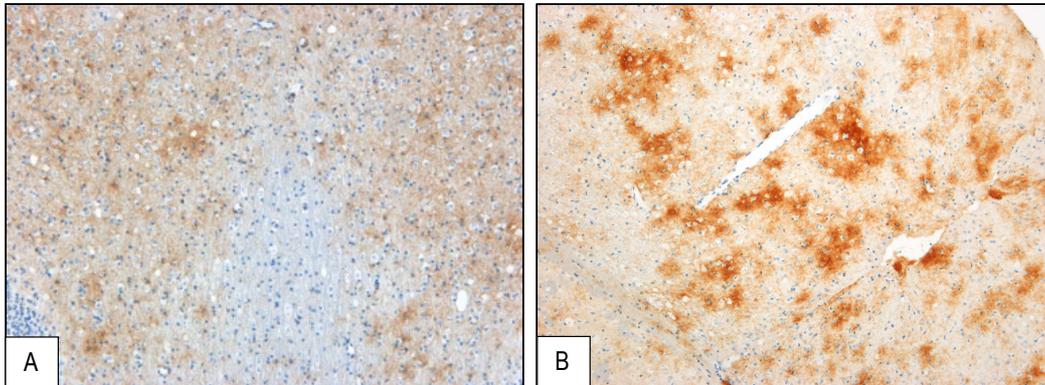


Abbildung 1: Beispiel von synaptischen (A) und plaqueartigen (B) PrP^{sc}-Ablagerungen in erkrankten Maushirnen

A: Synaptische PrP^{sc}-Ablagerungen entstehen um Neurone und Dendriten. Sie korrelieren häufig mit dem neuronalen Verlust, sowohl im zerebralen als auch im cerebellären Cortex [46, 47], sowie mit der Proliferation von Astrozyten und Mikroglia [46]. Es wird angenommen, dass sie für die Neurodegeneration bei CJD verantwortlich sind [48].

B: Plaqueartige PrP^{sc}-Ablagerungen Plaqueartige PrP^{sc}-Ablagerungen sind nur durch Immunhistochemie nachzuweisen und treten extrazellulär und vor allem in Kleinhirn, Basalganglien, Thalamus oder Großhirn auf [41].

Einleitung

➤ Synaptische PrP^{sc}-Ablagerungen

Synaptische Ablagerungen entsprechen der häufigsten PrP^{sc}-Ablagerungsform [49]. Sie entstehen um Neurone und Dendriten (Abbildung 1), die immunhistochemisch nachgewiesen werden und deren Lokalisation mit der des synaptischen Vesikelproteins Synaptophysin korreliert [48]. Sie werden im Rahmen von Prionerkrankungen vor allem in der Molekular- und Körnerzellschicht des Kleinhirns, sowie auch häufig im Neocortex immunhistochemisch dargestellt [48].

Da im Verlauf von CJDs Synaptophysin vermindert nachgewiesen wird, während die Akkumulation von PrP^{sc} zunimmt, wird angenommen, dass dieser Ablagerungstyp möglicherweise für die Neurodegeneration bei CJD verantwortlich ist [48]. Die synaptischen Ablagerungen korrelieren häufig mit dem neuronalen Verlust, sowohl im zerebralen als auch im cerebellären Cortex [46, 47], sowie mit der Proliferation von Astrozyten und Mikroglia [46].

➤ PrP^{sc}-Plaques und plaqueartige PrP^{sc}-Ablagerungen

PrP^{sc}-Plaques sind runde eosinophile Strukturen, die bei etwa 10% der CJD-Fälle in der HE-Färbung dargestellt werden können [41] und kompakten PrP^{sc}-Ablagerungen entsprechen [50]: Sie werden unterteilt in Kuru-Plaques, multizentrische (typisch bei GSS) und floride Plaques mit Ummantelung durch spongiforme Veränderungen (v.a. vCJD) [50].

Plaquareartige PrP^{sc}-Ablagerungen sind nur durch Immunhistochemie nachzuweisen (Abbildung 1). Sie treten extrazellulär und vor allem in Kleinhirn, Basalganglien, Thalamus oder Großhirn auf [41].

I.1.2.1.2 Spongiforme Veränderungen und neuronaler Zellverlust

➤ Spongiforme Veränderungen

Spongiforme Veränderungen sind ein weiteres wichtiges pathologisches Merkmal von Prionerkrankungen. Sie werden in unterschiedlicher Ausprägung bei allen Prionerkrankungen in der HE-Färbung dargestellt und werden definiert als „blasenartige Gebilde im Neuropil, etwa 2 bis 10µm im Durchmesser, die im Wesentlichen Hohlrumbildungen in Nervenzellfortsetzen entsprechen“ [51] (Abbildung 2). Bei Tieren können sie im Rahmen von TSE ebenfalls intrazellulär auftreten. Sie sind vor allem Zeichen zellulärer Prozesse in Neuriten und enthalten Membranfragment und amorphes Material [52]. Spongiforme Veränderungen treten fast immer im zerebralen Kortex auf, häufig sind auch Basalganglien, Thalamus und zerebellärer Kortex befallen [41]. Sie können entweder diffus oder lokal auftreten sowie eventuell konfluieren. Der Mechanismus, der zu ihrer Bildung führt, ist bisher noch nicht geklärt worden. Eine Assoziation mit neuronalem Zellverlust und Astrozytose ist häufig [41, 53].

Einleitung

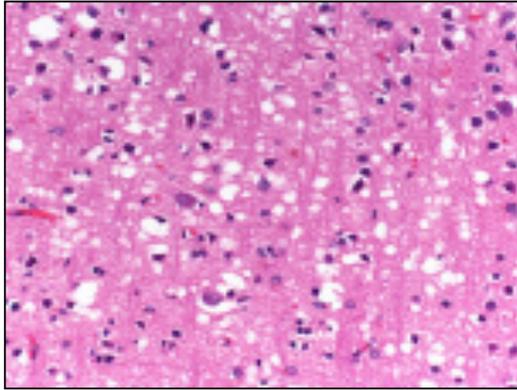


Abbildung 2: Spongiforme Veränderungen [54]

Spongiforme Veränderungen sind Hohlrumbildungen in Nervenzellfortsetzen, die in unterschiedlicher Ausprägung bei Prionerkrankungen in der HE-Färbung dargestellt werden.

➤ Neuronaler Zellverlust

Neuronaler Zellverlust bei TSEs entsteht am ehesten im Rahmen apoptotischer Vorgänge [55-57]. Hirnregionen mit gehäuft auftretenden apoptotischen Zellarealen sind bei an Scrapie erkrankten Mäusen insbesondere Kleinhirn, Hippocampus und zerebraler Cortex [56]. Der Mechanismus, der zur Induktion apoptotischer Vorgänge in den Zellen führt, ist noch nicht vollständig geklärt. Es ist unklar, ob der neuronale Zellverlust durch die Neurotoxizität des PrP^{sc} bedingt ist [52, 58] oder möglicherweise durch den Verlust einer physiologischen Funktion des PrP^c entsteht [59]. Insgesamt hängt er mit Astrogliose, Mikrogliaaktivierung und axonalem Schaden zusammen [52, 59]. Insbesondere im Kleinhirn wurde gezeigt, dass der neuronale Zellverlust mit dem Grad der Atrophie korreliert [60].

I.1.2.1.3 Astrozytäre Gliose und Mikrogliaaktivierung

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurde nachgewiesen, dass die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten ein häufiger und früher Aspekt bei Prionerkrankungen ist [61]. Mikrogliaaktivierung und reaktive astrozytäre Gliose erfolgen meist parallel [62].

Einleitung

➤ Reaktive Mikrogliaaktivierung

Mikroglia sind mononukleäre Phagozyten des ZNS, eine wichtige Funktion ist ihre Fähigkeit zur Phagozytose von geschädigten Zellen. Die Mikroglia-Proliferation korreliert positiv mit dem Auftreten von PrP^{sc}-Ablagerungen [63]. Eine chronische Aktivierung, wie im Rahmen von Prionerkrankungen, kann außerdem zu neuronalem Schaden, z.B. durch die Freisetzung von Zytokinen oder Sauerstoffradikalen, führen [59]. Das könnte eine Erklärung dafür darstellen, dass die reaktive Mikrogliaaktivierung meist bereits vor dem eigentlichen neuronalen Zellverlust und dem Auftreten von Symptomen nachweisbar ist [64, 65].

➤ Reaktive Astrozytose

Die Astrozytose, eine Hypertrophie und Hyperplasie von Astrozyten, wird durch eine direkte oder indirekte Folge der lokalen Konzentration von PrP^{sc} induziert [66]. Die Astrozytose führt zu einer Hochregulierung des Proteins GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*, „Saures Gliafaserprotein“), einem Bestandteil des Zellgerüsts von Astrozyten, das durch eine immunhistochemische Färbung im Lichtmikroskop dargestellt werden kann [67] (Abbildung 3). Auch die reaktive Astrozytose ist im Rahmen von Prionerkrankungen bereits vor dem neuronalen Zellverlust nachweisbar [64].

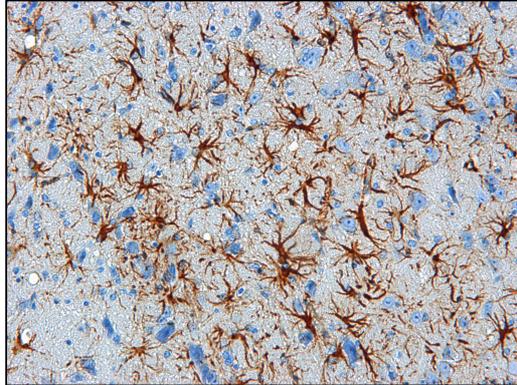


Abbildung 3: Reaktive Astrozytose

Eigenes Bild, GFAP-Färbung. Die reaktive Astrozytose wird immunhistochemisch anhand der Färbung des GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*, „Saures Gliafaserprotein“), einem Bestandteil des Zellgerüsts von Astrozyten, nachgewiesen.

I.2 Das physiologische Prionprotein: das PrP^c

I.2.1 Definition

Das physiologische, sogenannte PrP^c (vom engl. *cellular*, zellulär) ist ein 33 bis 35 kDa großes, ubiquitär vorkommendes Protein der Zelloberfläche und ist nicht infektiös [68]. Hauptsächlich wird es in neuronalen Zellen, insbesondere an Synapsen (sowohl prä- als auch postsynaptisch [69, 70]), exprimiert [71].

I.2.2 Bildung und Struktur

Das PrP^c wird durch das PRNP-Gen (Chromosom 20 beim Menschen und Chromosom 2 bei der Maus [72]) kodiert. Nach der Synthese im endoplasmatischen Retikulum erfolgt die Prozessierung im Golgi-Apparat. Nach posttranslationalen Veränderungen besteht das reife PrP^c aus den Aminosäuren 23-231 [68]. Allgemein wird das PrP^c in einen N- und einen C-Terminus gegliedert (Abbildung 4). Diese Abschnitte spielen eine unterschiedliche Rolle im Rahmen der Pathogenese (s.u.).

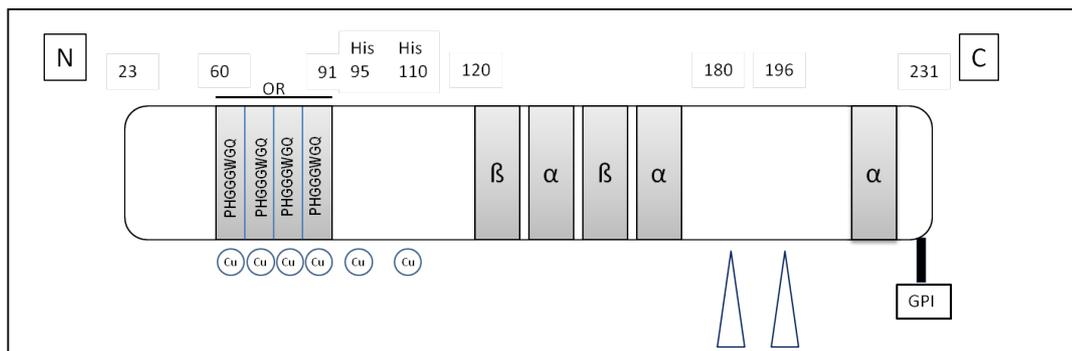


Abbildung 4: Struktur des posttranslationalen PrP^c (angelehnt an [68, 73])

Die Nummern beschreiben die jeweilige Aminosäureposition. N: Amino (NH₂)-Terminus (Aminosäuresequenz 23-120). C: Carboxy(COOH)-Terminus (Aminosäuresequenz 121-231). OR: Oktarepeatsequenz bestehend aus vier PHGGGWGQ-Sequenzen. GPI: GPI-Anker. α: α-Helix-Regionen. β: β-Faltblattregionen.

Das PrP^c kann bis zu sechs Kupferionen (Cu) binden, etwa vier in der Oktarepeatregion (OR) und jeweils ein Kupferion an den Aminosäuren Histidin 95 (His 95) und 110 (His110). Es besitzt zwei Glykosylierungsorte an den Aminosäuren Asparagin 180 und 196.

Einleitung

➤ Der *N-Terminus* (Aminosäure 23-120) ist unstrukturiert [74] und besitzt eine hohe Flexibilität [75]. Er enthält wichtige Kupferbindungsstellen wie die Oktarepeatsequenz (Aminosäure 60-90 [76]), das Histidin 95 und das Histidin 110 [73]. Die Region zwischen der Oktarepeatsequenz und dem C-Terminus (Aminosäure 90-112) spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Prionerkrankungen [77]. Insbesondere die Sequenz 106-126 ist vermutlich essentiell für die Infektiosität des PrP^{sc} und die Bildung von Amyloid [78, 79]. Die Oktarepeatsequenz (Aminosäure 60 bis 90) ist eine der am besten konservierten Regionen des PrP^c und besteht aus vier PHGGGWGQ-Sequenzen, in welchen HGGGW die fundamentale kupferbindende Region darstellt [80, 81]. Jede dieser vier Sequenzen kann jeweils ein Kupferion kooperativ binden [82, 83]. Auf die Oktarepeatregion als kupferbindende Region wird nachfolgend noch genauer eingegangen (s. I.4.2.1).

➤ Der *C-Terminus* (Aminosäure 121-231) des PrP^c besitzt hauptsächlich eine α -Helix-Struktur, beinhaltet jedoch auch zwei kurze β -Faltblattabschnitte [84] (Abbildung 4). Das murine PrP^c besitzt an den Aminosäuren Asparagin 180 und 196 zwei N-Glykosylierungsorte [85, 86]. Über den GPI-(Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol) Anker ist es mit der Zelloberfläche verbunden [87].

I.2.3 Endozytose und Proteinabbau

Es wurden bisher zwei Endozytosewege von PrP^c beschrieben: ein Clathrin-abhängiger (Clathrin - ein Protein, das an der Einstülpung von Membranen und Vesikelbildung beteiligt ist) sowie ein Clathrin-unabhängiger Weg, mit über die Lipid Rafts vermittelter Internalisierung. Der Endozytoseweg scheint vom Zelltyp abzuhängen [87], in Neuronen scheint der häufigere Weg Clathrin-abhängig zu sein [88]. Diese Endozytose erfolgt hier nach der Translokation des PrP^c aus den Lipid Raft in anliegende Regionen der Plasmamembran [87, 89] und wird durch Kupfer in bereits physiologischen Konzentrationen beeinflusst [90, 91].

Im Rahmen des zellulären Proteinabbaus wird das PrP^c anschließend zwischen den Aminosäuren 111 und 112 und/oder an der Aminosäureposition 96 gespalten – jeweils α - und β -Spaltung genannt [92]. Insbesondere die β -Spaltung kann durch Kupfer induziert werden [93, 94]. Je nach Spaltungsmechanismus entstehen unterschiedliche Spaltprodukte: sog. N1- und C1-Fragmente nach der α -Spaltung und N2- und C2-Fragmente nach der β -Spaltung [92, 95]. C2-Fragmente entsprechen keinen Vorstufen von C1-Fragmenten [96]. Das C1-Fragment (ca. 17 kDa) scheint ein physiologisches Endprodukt des zellulären Metabolismus des Prionproteins zu sein und durch die Hochregulierung der p53-Transkription die Aktivierung der Kaspase 3 zu aktivieren [97]. Das N1-Fragment wirkt *in vivo* und *in vitro* eher neuroprotektiv, indem es die p53-induzierte Apoptose-Kaskade moduliert [98]. Möglicherweise nimmt die α -Spaltung des PrP^c also eine insgesamt eher neuroprotektive Rolle ein [99], wichtig scheint dabei das Zusammenspiel von N1- und C1-Fragment im Rahmen der Regulierung der Apoptose zu sein. Im Gegensatz dazu sind C2-Fragmente (ca. 21 kDa), die wie PrP^{sc} proteaseresistent und in Detergentien unlöslich sind, in CJD-Hirnen und -Zellen vermehrt vorzufinden [100]. Die genaue Funktion von N2- und C2-Fragmenten bleibt bisher noch unklar. Es zeigte sich kein Zusammenhang mit p53-Modulation [96].

Einleitung

I.2.4 Physiologische Funktion des PrP^c

Die genaue Funktion des hochkonservierten Membranproteins PrP^c ist noch nicht eindeutig geklärt und wird kontrovers diskutiert. Der Vergleich des Phänotyps von PrP^c-Knock-out- und Wildtyp-Mäusen ergab keine wesentlichen Unterschiede in Bezug auf Entwicklung und Verhalten [101]. Neben einem Einfluss auf Schlafregulation [102] und zirkadianen Rhythmus [103] scheint das PrP^c außerdem eine wichtige Rolle im Schutz gegenüber oxidativem Stress und bei der Modulation der Neurotransmission zu spielen.

I.2.4.1 Schutz gegenüber oxidativem Stress

Oxidativer Stress entsteht durch ein Ungleichgewicht von den im Rahmen der zellulären Stoffwechselaktivität gebildeten Sauerstoffradikalen und physiologischen zellulären Entgiftungsmechanismen. Die Folge ist eine Schädigung von Zellbestandteilen, insbesondere der Zellmembran durch Lipidperoxidation. Aktuell deuten verschiedene Ergebnisse auf eine neuroprotektive Funktion des PrP^c gegenüber oxidativem Stress hin, die in Abhängigkeit von der gebundenen Kupfermenge entfaltet wird [104, 105]. Unterstützt wird diese Theorie durch die Beobachtung, dass von PrP^c durch intrazelluläre reaktive Sauerstoffradikale hochreguliert wird [106] und Neurone, die kein PrP^c exprimieren, weniger resistent gegenüber oxidativem Stress sind [107-112]. Weiterhin fällt in diesem Zusammenhang die vorwiegende Lokalisation von PrP^c im ZNS auf, das aufgrund anatomischer und physiologischer Eigenschaften durch oxidativen Stress besonders gefährdet und nach Infektion hauptsächlich Ort pathologischer Veränderungen ist [113]. Der Schutz vor oxidativem Stress kann mit weiteren beschriebenen Funktionen des PrP^c zusammenhängen: Manche Autoren nehmen an, dass PrP^c eine Rolle in der Kupferhomöostase der Zelle spielt [82, 114] und/oder als Kupfer-Reduktase [115] agiert. Kupfer wird in Zusammenhang mit der Produktion von freien Radikalen gebracht, die zur Schädigung von Mitochondrien, DNA und Neuronen führen kann [116].

I.2.4.2 Modulation der synaptischen Neurotransmission

Die vermehrte Lokalisation des PrP^c im Bereich der Synapsen sowie verschiedene beschriebene Funktionen im Zusammenhang mit Verhaltens- und Gedächtnisprozessen führten zu der Annahme, dass das PrP^c eine wichtige Funktion im Rahmen der neuronalen Erregung und/oder von synaptischer Übertragung spielen könnte. Tatsächlich wurde bei PrP^c-Knock-out-Mäusen eine gesteigerte Erregbarkeit der hippocampalen Neurone dargestellt [117].

Unter anderem wurde ein Zusammenhang mit dem exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat sowie mit dem NMDA-Rezeptor beschrieben: Bei Mäusen mit mutiertem, fehlgefaltetem PrP wurde im Kleinhirn eine gestörte Exozytose von Glutamat, am ehesten aufgrund einer veränderten Dynamik von Calcium an der Zellmembran gezeigt. Diese wurde durch die hier gestörte Interaktion von PrP mit dem Calcium-Ionenkanal Ca_v2-1 erklärt [118]. Es wurde weiterhin gezeigt, dass PrP^c-Knock-out-Mäuse gesteigerte Amplituden sowie eine verlangsamte Kinetik

Einleitung

der Ströme am Glutamat-NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat-)Rezeptor aufweisen. Diese veränderte Aktivität am NMDA-Rezeptor führte in dieser Untersuchung zu einer erhöhten neuronalen Aktivität sowie zu einer erhöhten glutamatergen Toxizität [119]. Die hier beschriebene erhöhte neuronale Erregbarkeit stellt eine mögliche Erklärung für die Tatsache dar, dass PrP^c-Knock-out-Mäuse eine deutlich niedrigere Schwelle für die Auslösung epileptischer Anfälle aufweisen [120].

Ein Einfluss von PrP^c wird jedoch nicht nur auf Glutamat-assoziierte Bereiche beschrieben: Insbesondere im Hippocampus wird ein Einfluss auf die Langzeit-Potenzierung und GABA_A-(Gamma-Aminobuttersäure-A)-vermittelten Antwort [121] diskutiert, bleibt bisher allerdings kontrovers. Auch die Hirnregion [122], auch innerhalb des Hippocampus, und das Alter der Maus [123] spielen hier möglicherweise eine Rolle.

PrP^c-Knock-out-Mäuse zeigen auch Störungen der GABA_A-vermittelten Antwort und der Langzeit-Potenzierung. Die Langzeit-Potenzierung besteht bei Neuronen nach mehreren Aktionspotenzialen aus einer ausgeprägteren Reaktion und ist wichtiger Bestandteil der synaptischen Plastizität. Dieser Aspekt wird physiologisch auch im Zusammenhang mit den postsynaptischen Glutamat-Rezeptoren AMPA und NMDA im Hippocampus im Rahmen von Lernprozessen beschrieben.

Auch der Zusammenhang mit der Kupferbindung scheint eine Funktion im Bereich der Synapsen zu unterstreichen: Kupfer wird nach Depolarisation in den synaptischen Spalt entladen [124], sodass möglicherweise PrP^c an der Regulierung von Kupferkonzentration, unter anderem zu Schutz vor oxidativem Stress, beteiligt ist.

I.3 Die pathologische Isoform des Prionproteins: das PrP^{sc}

I.3.1 PrP^{sc} – der Erreger der Prionerkrankungen

Stanley Prusiner belegte, dass die pathologische Isoform des zellulären Prionproteins (PrP^c), das sogenannte PrP^{sc} (**S**crapie Isoform des Prionproteins), für die Prionerkrankungen verantwortlich ist [10, 68]. Der Terminus "Prion" wurde für das kleine **proteinähnliche** und **infektiöse** Partikel gewählt, das keine Nukleinsäuren enthält [10, 125] und dessen Infektiosität durch proteinmodifizierende Mittel beeinflusst wird.

I.3.2 Infektion

Eine PrP^{sc}-Infektion kann über unterschiedliche Infektionswege (s. I.1.1) und von einer Spezies auf die andere übertragen werden. Die PrP^{sc}-Replikation entsteht dabei, indem PrP^{sc} die Konversion von präexistentem PrP^c zu PrP^{sc} triggert [126-129] und sich die Infektion vergleichbar zu einem Dominoeffekt ausbreitet. Diese Konversion entsteht durch eine Konformationsveränderung, die hauptsächlich im Abschnitt der Aminosäuren 90 bis 112 lokalisiert ist [77]. Der genaue Mechanismus, der zu dieser Konversion führt sowie der Ausbreitungsmodus, sind jedoch aktuell weiterhin noch nicht vollständig verstanden.

I.3.3 Unterschiede des PrP^{sc} im Vergleich zu PrP^c

Die Isoformen PrP^c und PrP^{sc} besitzen die gleiche Primärstruktur, unterscheiden sich jedoch in Bezug auf den Gehalt an β -Faltblattstruktur, der bei PrP^{sc} deutlich höher ausfällt [130, 131]. Die genaue Struktur des PrP^{sc} ist aufgrund seiner Unlöslichkeit in Detergentien jedoch bisher nicht eindeutig nachweisbar.

Ein wichtiger Unterschied zwischen PrP^c und PrP^{sc} ist die Teilresistenz von PrP^{sc} gegenüber dem Verdau durch die Proteinase K (PK) [132, 133]. Die Ursache für diese Resistenz ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Der proteaseresistente Kern des PrP^{sc} entspricht einer 27-30 kDa-schweren, bekannten Aminosäuresequenz [134]: das sog. „PrP 27-30“ [135] oder „PrPres“. Die Hauptschnittstellen der PK befinden sich beim Menschen an den Aminosäureresten 82 und 97 [51], also in engem Zusammenhang mit den oben dargestellten amyloido-genen und kupferbindenden Abschnitten.

Die genaue Bedeutung der Glykosylierung beim Prionprotein ist noch nicht ganz verstanden, eine Verbindung mit der Pathologie wurde jedoch nachgewiesen. Die Glykosylierung beeinflusst das Ablagerungsmuster [136, 137]. PrP^c und PrP^{sc} weisen zwar gleiche Glykosylierungsorte auf, an den Aminosäuren Asparagin 180 und 196 [86], jedoch unterschiedliche Glykosylierungsmuster [138]. Beide Isoformen sind empfindlich gegenüber dem Verdau durch PNGaseF [139].

I.4 Prionerkrankungen und Kupfer

Ein möglicher Zusammenhang zwischen physiologischer Funktion des PrP^c und Kupfer wurden bereits dargestellt. Weitere Ergebnisse zeigen weiterhin, dass Kupfer auch in engem Zusammenhang mit Prionerkrankungen zu stehen scheint. Der Einfluss von Kupfer auf PrP^{sc}-typische Merkmale sowie Krankheitsverlauf und Symptome wurde ebenfalls näher untersucht.

I.4.1 Die Bindung von Kupfer an das PrP und Einfluss auf die Pathologie

I.4.1.1 Physiologische Kupferbindung durch das PrP^c

Das PrP^c bindet Kupfer [140, 141], sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [114] an mehreren Kupferbindungsstellen. Innerhalb der physiologischen Kupferkonzentration bindet es bis zu sechs Kupferionen [142]: In der Oktarepeatsequenz besitzt es vier Bindungsstellen [73, 80] und jeweils ein Kupferion kann an den Aminosäuren Histidin 95 und Histidin 110 gebunden werden [73] (Abbildung 4). Fraglich besteht noch eine weitere Kupferbindungsstelle im C-Terminus des Proteins [143], die allerdings bis jetzt nur im Rahmen von sehr hohen, nicht physiologischen Kupferkonzentrationen diskutiert wird [144] und damit bisher keinen relevanten Einfluss *in vivo* auf Funktion oder Struktur zu haben scheint.

Es ist bekannt, dass Kupfer und PrP^c-Konzentrationen miteinander korrelieren: Einerseits wird die Expression von PrP^c durch Kupfer stimuliert [145]; andererseits weisen Hirnextrakte von PrP^c-Knockout-Mäusen deutlich geringere Kupferkonzentrationen als Wildtyp-Mäuse auf [114]. Insbesondere an den Synapsen von PrP^c-Knockout-Mäusen ist die Kupferkonzentration um bis zu 50% reduziert [146]. Es ist weiterhin bekannt, dass Kupfer die Struktur des PrP^c beeinflusst, indem es die Sekundärstruktur des PrP^c stabilisiert [75, 141]. Weiterhin wird auch die Endozytose durch Kupfer, bereits in physiologischer Konzentration, beeinflusst [87, 89-91]. Dieser stimulierende Einfluss auf die Endozytose wurde vor allem anhand der Bindung an die Oktarepeat-Region dargestellt [89, 91, 147]. Der Einfluss der anderen bekannten kupferbindenden Regionen auf die Endozytose ist aktuell nur unzureichend geklärt. Zudem kann Kupfer die β -Spaltung im Rahmen des zellulären Abbaus fördern [93, 94].

I.4.1.2 Einfluss der Bindung von Kupfer auf PrP^{sc}-typische Merkmale

Kupfer ist ein Kation, das häufig die Aggregation und Ausfällung von Proteinen fördert [148]. Ein Einfluss auf die PrP^{sc}-typischen Merkmale zeigt sich bereits beim PrP^c: Es konnte gezeigt werden, dass bei niedrigem pH (pH 7,0) die Bindung von Kupfer sowohl die Bildung von β -Faltblatt-Anteilen [16] als auch eine rasch eintretende und reversible Proteaseresistenz im PrP^c [149, 150] induzieren kann. Allerdings scheint ein struktureller Unterschied zwischen dieser proteaseresistenten Form und PrP^{sc} zu bestehen [149]. Weiterhin bildet PrP^c zunehmend eine reversible Unlöslichkeit in Detergentien in Abhängigkeit von der hinzugefügten Kupferkonzentration aus [149].

Einleitung

Beim rekombinanten *Full-Length* Prionprotein (rPrP 23-230) induziert es in bereits bestehenden Amyloidfibrillen eine gesteigerte PK-Resistenz und führt zu einer gesteigerten Verklumpung [151]. Ebenso zeigte sich ein Einfluss von Kupfer auf die Proteaseresistenz des PrP^{sc}: In kupferarmem Milieu sowie nach Hinzufügen von Kupferchelatoren zeigt PrP^{sc} eine bis zu zwanzigfach erhöhte Sensitivität hinsichtlich des Proteinase-K-Verdau, die durch Hinzufügen von Kupfer teilweise reversibel ist [152, 153].

1.4.1.3 Einfluss der Kupferbindung auf den Krankheitsverlauf und die Symptome

Hier wurden verschiedene Ergebnisse beschrieben: Unter anderem wurde gezeigt, dass Kupfer eine hemmende Wirkung auf die Entwicklung von Prionerkrankungen hat: Bei Scrapie-infizierten Hamstern führte Kupfer zu einer signifikanten Verzögerung des Auftretens von Krankheitszeichen [154], was auch bei Mäusen beschrieben wurde [155]. Im Rahmen einer Kupferreduktion durch kupferarme Diät entwickelten diese Mäuse zudem eine signifikant kürzere Überlebenszeit nach Infektion [155].

1.4.2 Einfluss der einzelnen Kupferbindungsstellen

Das Prionprotein besitzt mehrere Kupferbindungsstellen, die im Rahmen der Physiologie sowie der Pathologie möglicherweise unterschiedliche Rollen spielen. Bisher ist noch nicht eindeutig geklärt, inwiefern sie sich insbesondere hinsichtlich des Einflusses auf die Erkrankungen unterscheiden.

1.4.2.1 Die Oktarepeatsequenz

Die Oktarepeatsequenz (Aminosäure 60 bis 90) ist eine der am besten konservierten Regionen des PrP^c und besteht aus vier PHGGGWGQ-Sequenzen, in welchen HGGGW die fundamentale kupferbindende Region darstellt [80, 81]. Jede dieser vier Sequenzen kann jeweils ein Kupferion kooperativ binden [82, 83]; die Bindung erfolgt in Abhängigkeit des pH-Wertes [156] sowie der bereits gebundenen Kupfermenge [157] und verändert dabei die N-terminale Struktur [156]. Bei physiologischem pH scheint Kupfer erst an die Bindungsstellen außerhalb der Oktarepeatsequenz zu binden [158].

Die Bindung von Kupfer sowie die Tatsache, dass eine erhöhte Anzahl an Oktarepeats bei Menschen eine Ursache für die genetische Form von CJD darstellt [159], zeigt, dass die Oktarepeat-Sequenz essentiell für die Propagation der Prioninfektion ist. Mäuse mit Deletion der Aminosäuren 32 bis 93 im PrP^c - also ohne Oktarepeatsequenz - sind nach wie vor anfällig für Scrapie. Sie weisen allerdings längere Inkubationszeiten, sowie bis zu 30mal geringere Priontitern und weniger protease-resistentes PrP im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf [160]. Nach bisherigen Erkenntnissen scheint die Oktarepeatsequenz dementsprechend eher eine modulierende Rolle in Bezug auf den Krankheitsverlauf einzunehmen.

Einleitung

I.4.2.2 Kupferbindungsstellen außerhalb der Oktarepeatsequenz

Sowohl die Aminosäure Histidin an der Position 95 bei der Maus (His95) bzw. 96 beim Menschen, als auch Histidin an der Position 110 (His110) bei der Maus bzw. 111 beim Menschen binden Kupfer [73, 161, 162]. Diese Bindungsstellen besitzen eine pH-abhängige Affinität für Kupfer, die höher ist als die der Oktarepeatregion [73, 162, 163]. Es ist außerdem auffällig, dass die bisher bekannten Punktmutationen, die zu Prionerkrankungen führten, in der Sequenz C-terminal der Aminosäure 90 gefunden wurden [164]. Die jeweilige Affinität dieser beiden Histidin-Bindungsstellen scheint untereinander vergleichbar zu sein [73, 144, 162, 163]. Im murinen PrP^c bindet Kupfer jedoch vorrangig an His95 [158]. Weiterhin wurde auch eine mögliche weitere Kupferbindungsstelle an der Aminosäure Histidin 186 und ihr Einfluss untersucht [165].

Spektroskopisch konnte dargestellt werden, dass Kupfer vorrangig an diese unstrukturierte Region im Bereich der Aminosäuren 90 bis 115 bindet [162], im murinen PrP^c vorrangig an His95 [158]. Tatsächlich ist insbesondere die Bindungsstelle am murinen Histidin 95 von besonderem Interesse, da sie sich innerhalb der Sequenz befindet, von der angenommen wird, dass hier die Konversion des PrP^c zu PrP^{sc} stattfindet [77]. Außerdem steht sie in engem örtlichem Zusammenhang mit einer der Hauptschnittstellen der Proteinase K an der menschlichen Aminosäure 97 [51] sowie mit der physiologischen β -Spaltungsstelle an der menschlichen Aminosäure 96 [92] und murinen Aminosäure 90 [166]. Anhand von verschiedenen Modellen wurde gezeigt, dass die Bindung von Kupfer an das Histidin 95 am wahrscheinlichsten eine protektive Wirkung hinsichtlich der Konversion von PrP^c zu PrP^{sc} entfaltet [167], diese Theorie ist aufgrund gegenteiliger Ergebnisse zur Kupferbindung in der N-terminalen Sequenz jedoch weiterhin kontrovers.

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Propagation von Prionerkrankungen scheint jedoch insgesamt sehr wahrscheinlich.

II Fragestellung und Zielsetzung

In der hier beschriebenen Doktorarbeit soll der Einfluss der Kupferbindung an der Aminosäure Histidin 95 des Prionproteins bei Infektion mit Scrapie auf Pathologie, typische neuropathologische Aspekte und Merkmale des PrP^{sc} im Western Blot untersucht werden. Hierzu wurden in Vorarbeiten mittels Pronukleusinjektion (PNI) sog. H95G-PrP transgene Mauslinien generiert, die ein mutiertes PrP mit einem Aminosäure-Austausch von Histidin zu Glycin an Position 95 des Prionproteins exprimieren.

Im ersten Teil der Arbeit wird der potentielle Einfluss der Mutation vor Infektion auf die Mäuse untersucht und mit den Ergebnissen von Kontroll-Mäusen verglichen.

Im zweiten Teil werden die H95G-Mäuse sowie Wildtypkontrollen mit dem RML-Scrapie-Stamm infiziert und hinsichtlich Inkubationszeit und Pathologie untersucht. Hier soll außerdem anhand von histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen geklärt werden, inwiefern sich die Mutation auf die Neuropathologie auswirkt. Anschließend werden H95G-Mäuse sowie Wildtypkontrollen mit infektiösem Hirnhomogenat von Mäusen der RML-Passage infiziert, um den Einfluss der Spezies-/Strain-Barriere auf die Ergebnisse auszuschließen und die histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse auf Reproduzierbarkeit zu prüfen.

Im dritten Teil wird untersucht, inwiefern der Verlust der Kupferbindungsstelle an der Aminosäure Histidin 95 zu Änderungen wichtiger Merkmale des PrP^{sc} im Western Blot bei RML-infizierten Mäusen und anschließend bei Mäusen zweiter Passage geführt hat.

Die Ergebnisse sollen helfen, die potentielle Rolle der Interaktion zwischen Kupfer und Prionprotein während Infektion und Pathogenese zu verstehen. Da die Erreger von Scrapie und CJD im Vergleich eine ähnlich Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur [51, 168] aufweisen, ist anzunehmen, dass die meisten Ergebnisse aus Tiermodellen auf die menschlichen Prionproteine übertragbar sind.

III MATERIAL UND METHODEN

III.1 Versuchstiere

Zur Untersuchung des Einflusses der Kupferbindung an der Aminosäure Histidin 95 wurden vor Beginn der Arbeit transgene Mäuse hergestellt, bei denen das Histidin durch Glycin ausgetauscht worden war und als H95G-Mäuse bezeichnet wurden. Alle Tierversuche erfolgten in Übereinstimmung mit gesetzlichen Tierschutzstandards und wurden als Folge durch die Regierung Oberbayerns genehmigt (Protokoll-Nummer 209.1-2531-31/02). Es wurde Wert darauf gelegt, die Anzahl an Versuchstieren so gering wie möglich zu halten und die Schmerzfreiheit der Tiere zu garantieren.

Alle Mäuse wurden unter SPF-Bedingungen mit geschlossenem Barriersystem gehalten. Die Reinigung der Käfige erfolgte ein Mal wöchentlich durch Autoklavieren (1h bei 134°C), Auswaschen mit 80°C heißem Wasser. Das Käfigsystem entsprach einer Gruppengröße von maximal fünf Tieren. Die Mäuse erhielten Futter und Wasser *ad libitum*.

III.1.1 Kontrollgruppen

Als Kontrollmäuse dienten Wildtypmäuse (Prn-p^{+/+}, C57/BL6-129/Sv) und Mäuse ohne PrP^c, sog. Knock-out-Mäuse (% Prn-p^{0/0}) [101].

III.1.2 H95G-Mäuse

Es wurden drei H95G-Mauslinien etabliert. Zu diesen war bereits ein transgenes Produkt etabliert worden, das die kodierende Sequenz für das jeweilige mutierte Prionprotein trug: In dieser Sequenz wurde die Histidin-Aminosäure an der Position 95 durch Glycin ersetzt (sog. H95G-PrP). Das transgene Produkt diente der Pronukleusinjektion in befruchtete Oozyten, durch die die drei unabhängigen transgenen Mauslinien entstanden (Linie 4,11 und 13 – L.4, L.11 und L.13), die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

Material und Methoden

III.1.3 Infektion der Mäuse

III.1.3.1 RML-Infektion

Es wurden sechs bis acht Wochen alte homozygote HG95^{+/+}-Mäuse (L. 4 n=8, L.11 n=12, L.13 n=8) mit *Pmp*^{-/-} Hintergrund und *Pmp*^{+/+}-129/Sv-C57/Bl6-Kontrollmäuse (im Folgenden Wildtypmäuse genannt, n=9) mit vergleichbarem genetischem Hintergrund für die Infektion gewählt.

Die Infektion der Mäuse erfolgte durch intrazerebrale Inokulation mit je 30µl eines 10%igen Homogenates (in 1x PBS) von terminal kranken, mit *RML Scrapie Strain* infizierten Mäusen [169]. Als zusätzliche Kontrolle wurden acht *Pmp*^{+/+}-129/Sv-C57/Bl6-Kontrollmäuse intrazerebral mit je 30µl 10% Hirnhomogenat von gesunden Mäusen inokuliert. Nach einer zweiminütigen Betäubung mit Diethylether (Einleitungskonzentration 15-20%) wurde eine Luer-Lock-Kanüle (0,6x4mm) über die Fontanelle im Bereich des Frontalhirns eingeführt. In den ersten drei Tagen nach Inokulation gab man den Mäusen je nach Allgemeinzustand Analgesiemittel (Buprenorphin und Prednisolon). Die Gewichtskontrolle erfolgte ein Mal wöchentlich. Die Kontrolle des allgemeinen Zustands erfolgte zwei Mal täglich.

III.1.3.2 Zweite Passage

Die Mäuse der zweiten Passage (2P-Mäuse), die sogenannten Gruppen 5 (n=6) und 6 (n=8), wurden ebenfalls wie oben beschrieben durch intrazerebrale Inokulation infiziert: Die Mäuse der Gruppen 5 bzw. 6 waren H95G-Mäuse, die durch jeweils 10% Homogenat (in 1x PBS) der Mäuse 304 bzw. 305 (Linie 13), infiziert wurden. Die Mäuse der Gruppen 7 (n=6) bzw. 8 (n=6) waren Wildtyp-Mäuse, die ebenfalls jeweils mit 10% Homogenat (in 1x PBS) der Mäuse 304 bzw. 305 (Linie 13), inokuliert wurden. Hier dient hier die Infektion zweiter Passage mit dem Hirnhomogenat von RML-infizierten H95G-Mäusen der Untersuchung der Ergebnisse, ohne den Einfluss der Spezies-/Strain-Einflusses bzw. der stabilen Inkubationszeit.

Material und Methoden

III.1.3.3 Übersicht Mausgruppen

III.1.3.3.1 Mausgruppen nach RML-Infektion

Name	Infektion	Zuordnung H95G/Wildtyp	Anzahl (n=)
1 -Wildtyp	RML	Wildtyp	8
2- Linie 4	RML	H95G	12
3- Linie 11	RML	H95G	8
4- Linie 13	RML	H95G	9

Tabelle 1: Übersicht RML-infizierte Mauslinien

III.1.3.3.2 Mausgruppen zweiter Passage

Name	Infektion	Zuordnung H95G/Wildtyp	Anzahl (n=)
Gruppe 5	Inokulation mit Hirnhomogenat der RML-infizierten Maus 304 der Linie 13	H95G	6
Gruppe 6	Inokulation mit Hirnhomogenat der RML-infizierten Maus 305 der Linie 13	H95G	8
Gruppe 7	Inokulation mit Hirnhomogenat der RML-infizierten Maus 304 der Linie 13	Wildtyp	6
Gruppe 8	Inokulation mit Hirnhomogenat der RML-infizierten Maus 305 der Linie 13	Wildtyp	6

Tabelle 2: Übersicht Mausgruppen nach Infektion zweiter Passage

Material und Methoden

III.1.4 Monitoring der Symptome und Beurteilung der Überlebenszeit nach Infektion

III.1.4.1 Definition der terminalen Phase

Wenn zwei der Parameter Hypersensitivität mit nachfolgender Lethargie, Gewichtsverlust, Kyphose, Tremor, Ataxie an drei aufeinanderfolgenden Tagen nachzuweisen waren, wurde dies als der Beginn des terminalen Stadiums definiert [170] und die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet.

III.1.4.2 Laufversuche

Um die Ataxie bzw. das Laufmuster der Mäuse zu dokumentieren, wurden die Füße der Mäuse mit Tinte bedeckt und die hinterlassenen Muster der Tiere auf dem Papier untersucht. Dadurch konnte durch Tinten-Schleifspuren dargestellt werden, ob die Tiere ein Bein nachzogen oder eine sonstige Asymmetrie im Laufmuster nach der Infektion entwickelt hatten.

III.1.4.3 Film und Fotografie

Zum Festhalten der anderen Symptome, insbesondere auftretender Auffälligkeiten im Laufen (unsicherer Gang etc.), des Fells und/oder des Verhaltens (Zusammenkauern, Antriebslosigkeit etc.), wurden die Mäuse gefilmt und fotografiert.

III.2 Herstellung von Organlysaten

III.2.1 Herstellung der Lysepuffer

Die Organe von nicht infizierten Mäusen wurden in HL-Puffer (Tabelle 3) homogenisiert. Das Wasser wurde hier mit Hilfe einer Filteranlage (Millipore, Schwalbach, Deutschland) gereinigt, wie auch in den folgenden Abschnitten.

Lösung	Zusammensetzung	Menge	Hersteller
HL-Puffer	NaCl	0,438g	Merck, Darmstadt, Deutschland
	Tris-HCl 7,5	2,5ml	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
	DOC	0,25g	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
	0,5% IGEPAL-CA-630	0,25ml	Merck, Darmstadt, Deutschland
	dH ₂ O	47,25ml	-

Tabelle 3: Zusammensetzung von HL-Puffer

Material und Methoden

III.2.2 Protokoll der Organlyse

Nachdem das zu untersuchende Organ gewogen worden war, wurde das entsprechende Lysepuffervolumen berechnet und hinzugefügt. Das nötige Volumen an Lysepuffer wurde in milliliter (ml) berechnet, und entsprach dem Neunfachen des Organgewichtes. Das Organ wurde anschließend mit Hilfe eines 10ml-Glas-Potter-Homogenisators (Novodirect, Kehl, Deutschland), mechanisch homogenisiert. Die Proben wurden mit dem Enzym Benzonase (1µl/ml Probe, Merck, Darmstadt, Deutschland) während 30 Minuten bei 37°C verdaut. Die Benzonase ist eine gentechnisch veränderte Endonuklease, die spezifisch DNA und RNA abbaut sowie keine proteolytische Aktivität aufweist und sich somit zur Reinigung von Proteinen, wie z.B. PrP^c, eignet. Anschließend wurde das Lysat fünf Minuten zentrifugiert (3000 rpm, 4°C) und die Proteinmenge des Überstands bestimmt.

III.2.3 Nachweis von Proteinen mittels Western Blot

III.2.3.1 Proteinbestimmung mittels *Bicinchonic acid solution* -Test

Die Proteinkonzentration in den verschiedenen Proben wurde mittels *Bicinchonic acid solution*-(BCA)-Test (Thermo Scientific, München, Deutschland) gemessen. Beim BCA-Test wird durch Chelatbildung mit Proteinen in alkalischer Lösung Cu²⁺ zu Cu¹⁺ reduziert (sog. Biuret-Reaktion). Letzteres wird durch eine Farbreaktion nachgewiesen.

Zur Quantifizierung der H95G-PrP^c-Menge nach Auswertung der Banden im Western Blot mit der tatsächlichen Proteinmenge wurden Verdünnungsreihen mit 100µg, 50µg, 25µg und 12,5µg *Full-Length*-(FL)-PrP^c bei allen H95G-Mauslinien vor Infektion erstellt und mit den Ergebnissen von Wildtypmäusen verglichen. Das FL-PrP^c entspricht der Aminosäuresequenz 23-231. Zum Vergleich mit der allgemeinen zellulären Proteinkonzentration erfolgte bei allen Mauslinien ebenfalls die Untersuchung des Protein β-Aktin, einem gleichmäßig exprimierten Zellprotein.

Die Vorbereitung der Proben für diese Methode sowie der Standardkurve erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers.

III.2.3.2 Methoden zur Vorbehandlung der Proben

Um die biochemischen Eigenschaften des PrP^c/PrP^{sc} in Wildtyp- und H95G-Mauslinien zu vergleichen, wurden je nach Fragestellung folgende Methoden angewandt: Denaturierung, Deglykosylierung, Proteinase K-Verdau oder kombinierte Verfahren.

Material und Methoden

III.2.3.2.1 Denaturierung

Die Proben wurden mit 5x-SDS-Lämmli-Puffer behandelt. Das Beta-2-mercaptoethanol des Puffers reduziert intra- und intermolekulare Disulfidbrücken des Proteins, das SDS-Detergenz bindet alle positiven Ladungen des Proteins und denaturiert es. Dadurch wird eine Auftrennung des Proteins ausschließlich nach Größe ermöglicht. Bromophenolblau hebt das Ergebnis durch Färbung hervor und dient hier somit als farblicher Indikator [171].

III.2.3.2.2 Deglykosylierung

Das Enzym PNGaseF ([Peptide-N4-(acetyl- β -glucosaminy)-Asparagin-Amidase] ist eine Amidase, die durch Hydrolyse die Bindung zwischen Asparagin (Asn) und N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) in Oligosacchariden von N-Glykoproteinen spaltet (BioLabs New England, Frankfurt a.M., Deutschland).

Beide murinen Wildtyp-PrP-Isoformen besitzen zwei potentielle Glykolisierungslokalisationen (Aminosäurereste 180 und 196 [85, 86]), sodass im Western Blot drei unterschiedliche Banden sichtbar gemacht werden können: die di-, mono- oder unglykosylierte Form des Proteins (Abbildung 5). Das Bandenmuster ist ohne Deglykosylierung häufig komplex, sodass der Verdauung mit PNGaseF zur Reduktion der Komplexität der Banden eingesetzt wird: Nach Verdauung verlaufen *FL-PrP^c* und *FL-PrP^{sc}* bei 25 kDa [172], C1- und C2-Fragmente jeweils ca. bei 17 und ca. 20 kDa [96].

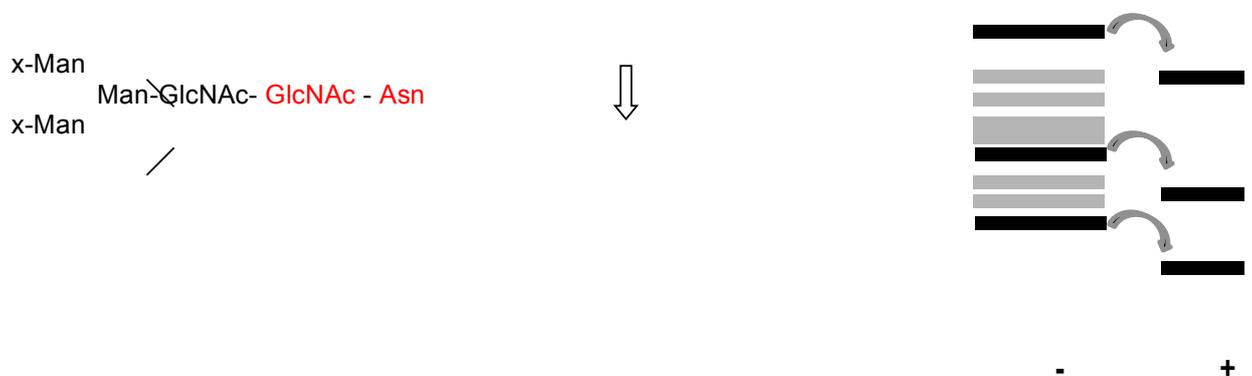


Abbildung 5: Deglykosylierung durch PNGaseF und schematische Darstellung im Western Blot

Material und Methoden

III.2.3.2.3 Proteaseresistenz

Um die Proteaseresistenz zu untersuchen, erfolgte der Verdau der murinen Hirnhomogenate mit Proteinase K (PK, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), um die Proteaseresistenz zu untersuchen. Die Ergebnisse wurden mit dem Befund des Wildtyp-PrP^{sc} verglichen, das zwei Hauptschnittstellen der Proteinase K, an den menschlichen Aminosäureresten 82 und 97 [51] des PrP^{sc} und den Aminosäureresten 81 – 89 bei Scrapie [173], besitzt. Die C-terminale Region weist meist eine Resistenz gegenüber dem Enzym auf, sodass die PK ein N-terminales Peptid von ca. 68 Aminosäuren abspaltet und entsprechend das Molekulargewicht des *FL*-PrP von ca. 33–35 kDa auf ca. 27-30 kDa reduziert [174]. Auch hier nimmt die Glykosylierung einen Einfluss auf die Molekülgröße ein.

III.2.3.2.4 Doppel-Verdau

Zur Reduktion der Komplexität im Bandenmuster nach Protease-Verdau, erfolgte zu Teil zusätzlich eine Behandlung mit PNGaseF.

III.2.3.3 Protokoll zur Behandlung der Proben

PrP^c-Proben von nicht infizierten Tieren wurden unverdaut und PNGaseF-verdaut verglichen, da alle Proben vollständig durch PK verdaut wurden. Proben von infizierten Tieren wurden unverdaut, PK-verdaut, PNGaseF-verdaut und im Doppelverdau (Abbildung 6) dargestellt.

Material und Methoden

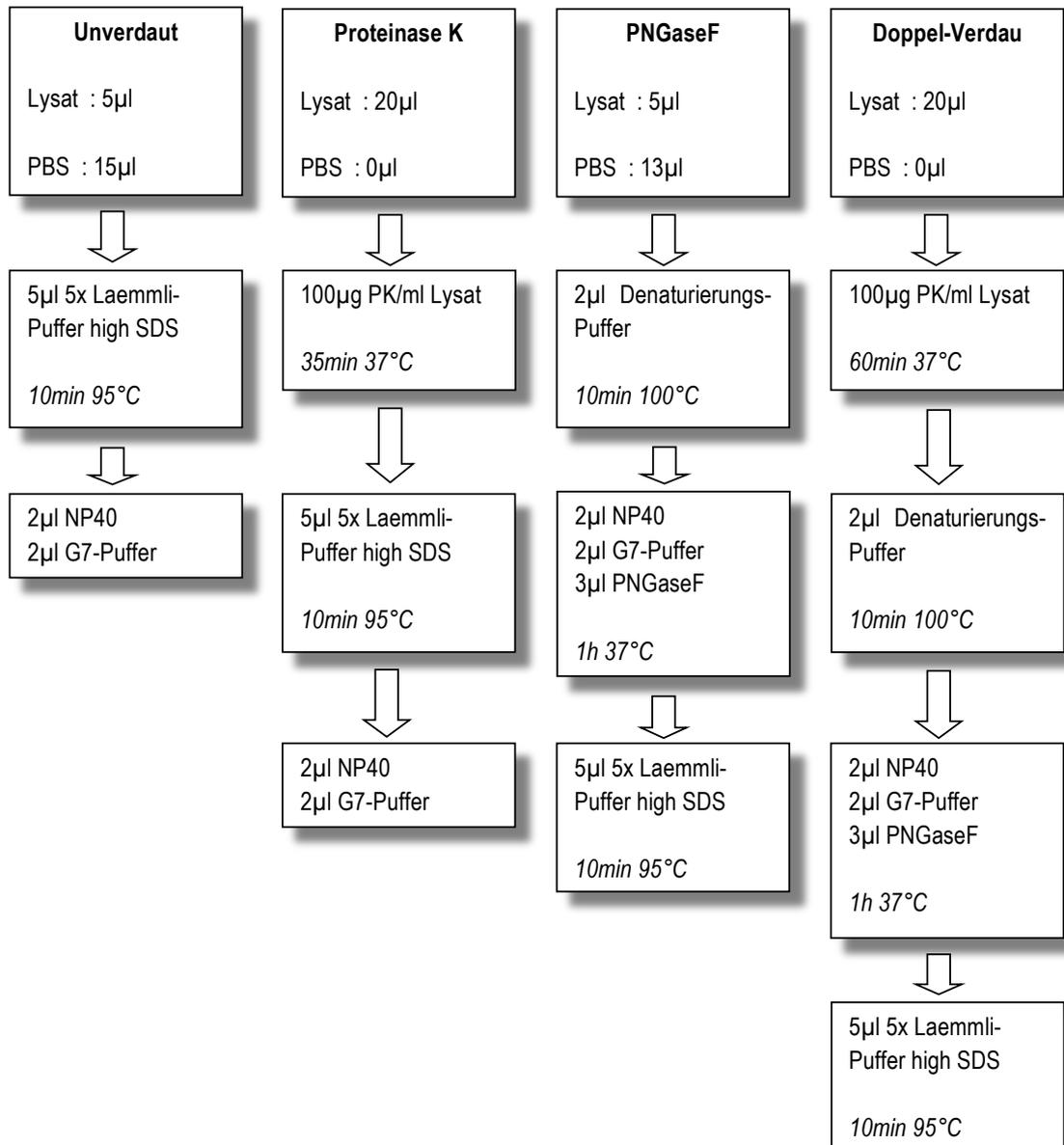


Abbildung 6: Schema Behandlung der Proben: Denaturierung, PK-, PNGaseF- und Doppelverdau

Alle Puffer, bis auf den 5x-Lämmli-Puffer (aus eigener Herstellung, Tabelle 4), wurden von BioLabs New England (Frankfurt a.M., Deutschland) hergestellt.

Material und Methoden

Lösung	Zusammensetzung	Menge	Hersteller
5x Lämmli-Puffer (1ml)	10% SDS	0,1g	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	40% Saccharose	0,4g	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	1mM EDTA	0,3mg	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
	50mM TrisHCl	0,2ml	Merck, Darmstadt, Deutschland
	20% β -Mercaptoethanol	0,2ml	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
	0,2% Bromphenolblau	2mg	Merck, Darmstadt, Deutschland
	ddH ₂ O	auffüllen	-

Tabelle 4: Herstellung von 5x-Lämmli-Puffer

III.2.3.4 Herstellung der Gele für SDS-Page

Die Gele bestanden aus einem Anteil Trenn- und einem Anteil Sammelgel und wurden selbst hergestellt (Tabelle 5 und Tabelle 6).

Puffer	Menge	Hersteller	
Trenngelpuffer (Tris)	36,33g	Merck, Darmstadt, Deutschland	pH 8,8
	ad 200ml H ₂ O	-	
Sammelgelpuffer (Tris)	12,11g	Merck, Darmstadt, Deutschland	pH 6,8
	ad 200ml H ₂ O	-	

Tabelle 5: Zusammensetzung von Trenngel- und Sammelgelpuffer

Material und Methoden

Gel	Zusammensetzung	Menge	Hersteller
Trenngel	dH ₂ O	7,2ml	-
	Trenngelpuffer	7,5ml	s.o.
	Acrylamid	5,0ml	Merck., Darmstadt, Deutschland
	10% SDS in H ₂ O	200µl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	10% APS in H ₂ O	100µl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sammelgel	dH ₂ O	6,0ml	-
	Sammelgelpuffer	2,5ml	s.o.
	Acrylamid	1,25ml	Merck., Darmstadt, Deutschland
	10% SDS in H ₂ O	100µl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	10% APS in H ₂ O	100µl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	TEMED	20µl	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 6: Zusammensetzung Trenngel und Sammelgel

Alle Anteile der Apparatur zur Herstellung der Gele wurden von Thermo Fisher Scientific (München, Deutschland) hergestellt.

III.2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS). Dieses anionische Detergens überdeckt die Eigenladung von Proteinen.

Die vorbereiteten Proben wurden 10min bei 95°C im Thermomixer *Comfort* (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) aufgekocht, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen, und dann in die Geltaschen des Sammelgels übertragen. Zum Auftrennen der Proben wurde 10x-Laufpuffer (Tabelle 7) eins zu zehn in dH₂O verdünnt. Es wurde das Elektrophoresegerät *OWL* (Thermo Fisher Scientific, München, Deutschland) benutzt. Die elektrische Spannung wurde durch Elektrophoresis Power Supply EPS 601 (Amersham Pharmacia, Piscataway, USA) bis zur Auftrennung des Markers bei 80V eingestellt, dann auf 150V erhöht, bis die

Material und Methoden

Bromphenolblau-Front das untere Ende des Gels erreichte. Es wurde der Proteinmarker *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland) benutzt.

Stammlösung	Zusammensetzung	Menge	Hersteller
10x Laufpuffer	Tris	15,15g	Merck, Darmstadt, Deutschland
	Glycin	72g	Acros Organics, Geel ,Belgium
	SDS	5,0g	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	dH ₂ O	500ml	-

Tabelle 7: Zusammensetzung von 10x Laufpuffer

III.2.3.5.1 Transfer

Die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon P, Millipore, Schwalbach) übertragen. Die Membran wurde vorab zuerst in Methanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) getränkt und anschließend, ebenso wie vier Filterpapiere (Whatman, Dassel, Deutschland), in Blotting Puffer (Tabelle 8) gelegt. Zum Transfer wurde die PVDF-Membran mit dem Gel nach oben und unten durch jeweils zwei Filterpapiere isoliert. Die Übertragung auf die Transfermembran (Immobilon-P, Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) erfolgte in der Blotting Apparatur *Hoefler Semiphor* (Amersham Pharmacia, Piscataway, USA) bei ca. 1,2mA/cm² Membran für eine Stunde.

Lösung	Zusammensetzung	Menge	Hersteller
Blotting Puffer	dH ₂ O	700ml	-
	10xLaufpuffer	100ml	s.o.
	100% Methanol	200ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 8: Zusammensetzung Blotting-Puffer

III.2.3.5.2 Entwickeln

Nach dem Transfer wurde die Membran erst für zwei Stunden in 5% Milchpulver (Tabelle 9) bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, dann wurde sie mit PBS-Tween (PBST) gewaschen und inkubierte über Nacht bei 4°C im Primär-Antikörper 4H11 (1:2000 in PBST) auf einem Schüttelinkubator (*Unimax 1010*, Heidolph, Schwabach, Deutschland).

Material und Methoden

Lösungen	Zusammensetzung	Menge	Hersteller
10xPBS	NaCl	80g	Merck, Darmstadt, Deutschland
	KCl	2kg	Merck, Darmstadt, Deutschland
	Na ₂ HPO ₄	26,8g	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	KH ₂ PO ₄	2,4g	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBST	1xPBS	80ml	s.o.
	Tween 20	20ml	Merck, Darmstadt, Deutschland
5% Milchpulver	Milchpulver	5g	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	PBST	100ml	s.o.

Tabelle 9: Zusammensetzung von PBST und Milchpulver-Lösung

Die Stammlösung wurde mit HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) bis zum Erreichen eines pH 7,4 titriert und dann mit dH₂O auf 1L aufgefüllt.

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 10min in PBS-Tween (Tabelle 9) gewaschen und inkubierte dann eine Stunde im Sekundär-Antikörper (1:2000 in PBST, Goat-Anti-Mouse, Dako, Hamburg, Deutschland). Nach erneutem Waschen wurde die Membran fünf Minuten in Alkalische Phosphatase-Puffer (AP-Puffer, Tabelle 10) eingelegt und dann fünf Minuten mit CDP-Star (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) benetzt. Anschließend erfolgte die Entwicklung mit dem SOP-Kameras System (Intas, Göttingen, Deutschland). Die Membran wurde anschließend zusätzlich mittels einer Färbelösung dargestellt: 10ml Alkalische Phosphatase-Puffer, 45µl NBT (Merck, Darmstadt, Deutschland), 35µl BCIP (Merck, Darmstadt, Deutschland).

Lösung	Zusammensetzung	Menge	Hersteller
AP- Puffer	NaCl	2,92g	Merck, Darmstadt, Deutschland
	MgCl ₂	0,509g	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	Tris-Base (pH 9,5)	6,057g	Merck, Darmstadt, Deutschland
	ad dH ₂ O	500ml	-

Tabelle 10: Zusammensetzung Alkalische-Phosphatase-Puffer

Material und Methoden

III.2.3.6 Antikörper-Mapping

Es wurde untersucht, ob die Mutation neben dem Aminosäureaustausch an der Aminosäureposition 95 zu weiteren Änderungen der Struktur des Proteins geführt hatte. Um dies festzustellen wurden verschiedene Antikörper-Bindungsstellen im H95G-PrP^c im Vergleich zu Wildtyp-PrP^c untersucht (Tabelle 11).

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Markierung von
RA 3153	1:2000 PBST	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	PrP AS 90-103 [175]
3F4	1:2000 PBST	DAKO, Hamburg, Deutschland	Menschliches PrP AS 108-111 [176]
3B5	1:50 PBST	Göttingen, Germany	Oktapeptidregion [177, 178]
4H11	1:2000 PBST	Institut für Virologie, Technische Universität München, Prof. Dr. H. Schätzl	Markierung der C-terminalen Domaine von PrP ^c und PrP ^{sc} [179]

Tabelle 11: Eingesetzte Antikörper

III.2.3.7 Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der Banden im Western Blot erfolgte mit Hilfe des Programmes *Image Analyzer AIDA* (raytest, Straubenhardt, Deutschland). Für die jeweiligen Banden wurde die Intensität [QL/mm², QL=Quench Limit] des jeweiligen Bandenbereichs bestimmt. Der Intensitätswert des Hintergrundes wurde abgezogen (Intensity/Area-Bkg). Zur Bestimmung des Verhältnisses von FL-PrP^c/β-Aktin bei den nicht infizierten Mäusen wurde erst die Intensity/Area-Bkg des FL- PrP^c (ca. 33kDa) sowie der β-Aktin-Bande (ca. 42 kDa) bestimmt. Weiterhin wurde zum Vergleich das Verhältnis von β-Aktin bei den Knock-out-Mäusen als „Nullwert“ bestimmt. Analog erfolgte die Auswertung der Banden bei den weiteren Analysen der nicht infizierten und infizierten Mäuse.

Die Ergebnisse wurden mit Excel (Microsoft Deutschland GmbH, München, Deutschland) und SPSS (IMB SPSS Statitics) ausgewertet.

Material und Methoden

III.2.4 Histologie und Immunhistochemie

III.2.5 Formalin-Fixierung

Von nicht infizierten und scrapie-infizierten Tieren wurde das Hirn entnommen, erst mit Ameisensäure vorbehandelt, um dadurch die immunhistochemische Darstellbarkeit von PrP^{sc} zu steigern [180] und PrP^{sc} zudem zu inaktivieren und anschließend mit Formalin immersionsfixiert. Die Gruppe der nicht infizierten Mäuse bestand aus jeweils 2 Mäusen pro Linie und die Gruppe der scrapie-infizierten Maushirne bestand aus 21 Hirnen von RML-infizierten Mäusen (H95G-L.4, n=5; H95G-L.11, n=7; H95G-L.13, n=4; WT, n=5), sowie 18 Maushirnen von 2P-Mäusen (H95G-Gr. 5, n=4; H95G-Gr.6, n=6; WT-Gr. 7 n=4; WT-Gr. 8, n=4).

III.2.6 Paraffin-Einbettung

Vor der Formalin-fixierten Einbettung in Paraffin, wurden die Organe makroskopisch zugeschnitten und in Ameisensäure eingelegt. Die Maushirne wurden entsprechend des bekannten Protokolls zu fünf Segmenten zugeschnitten (Abbildung 7) [181].

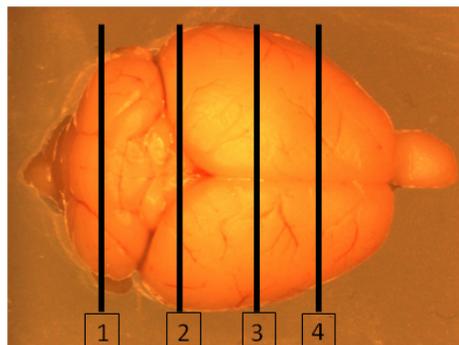


Abbildung 7: Definierte Schnitthöhen der Maushirne

Wie in bisherigen Protokollen beschrieben [182, 183], wurden in diesen Schnitten zwölf Hirnregionen entsprechend definierter Kriterien, wie nachfolgend beschrieben, beurteilt (Abbildung 8).

Regionen grauer Substanz: Medulla oblongata, Kleinhirn, Colliculi superiores, Hypothalamus, medialer Thalamus, Hippocampus, Septum, Kortex auf Höhe des Septums und auf Höhe des medialen Thalamus.

Regionen weißer Substanz: Kleinhirn, Tegmentum, Pyramidenbahn.

Material und Methoden

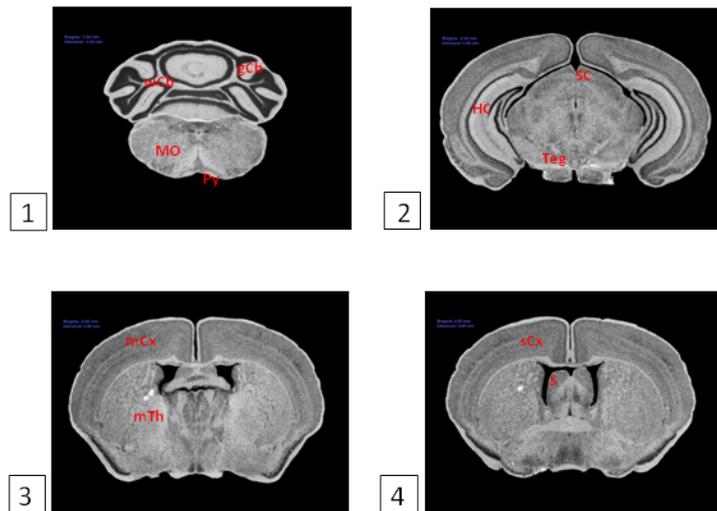


Abbildung 8: Beurteile Hirnregionen im Koronarschnitt

Bilder aus *Mouse Brain Library* (Neurogenetics at University of Tennessee Health Science Center, USA), Ebene 1 (entspricht Schnitt 34 in der *Mouse Brain Library*), Ebene 2 (Schnitt 23), Ebene 3 (Schnitt 17), Ebene 4 (Schnitt 16) [184]

Cbg= Cerebellum, graue Substanz, Cbw= Cerebellum, weiße Substanz, HC=Hippocampus, HyT=Hypothalamus, mCx= Kortex auf Höhe des medialen Thalamus, MO= Medulla Oblongata, mTh= medialer Thalamus, P= Pyramidenbahn, S=Septum, SC= Colliculi Superiores, Teg= Tegmentum (ventral), SCx= Kortex auf Höhe des Septums

Die Gewebeproben wurden zur Entwässerung der Schnitte zuerst in eine aufsteigende Alkoholreihe eingelegt: Erst erfolgte über zwei Stunden eine Immersion in 70% Alkohol, dann drei Mal acht Stunden in 96% Alkohol und zuletzt vier Mal zwei Stunden in 100% Alkohol. Der nächste Schritt war eine dreifache Immersion für zwei bis drei Stunden in Azeton. Anschließend wurden die Gewebeproben zwei Mal für zwei Stunden in Paraffin eingelegt und Paraffinblöcke ausgegossen. Die Paraffinblöcke wurden mit einer Schnittstärke von 2,5 µm zugeschnitten und auf Objektträger des Typs *Superfrost Plus* (Thermo Scientific, München, Deutschland) aufgetragen.

Material und Methoden

III.2.7 Färbung der Schnitte

III.2.7.1 Lichtmikroskopische Färbung: Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Zur Darstellung der spongiformen Veränderungen wurden die Schnitte nach dem laborinternen Standardprotokoll mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt: Die Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurde an 2,5 µm dicken Paraffinschnitten auf silanisierten Objektträgern durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden zunächst entparaffiniert. Hierzu wurden sie für 30 Minuten in einem Wärmeschrank auf 37°C erwärmt, dann zweimal für jeweils fünf Minuten in Xylol, anschließend für jeweils zwei Minuten in einer Mischung aus 50% Xylol und 50% Isopropanol, dreimal in 100%igem Isopropanol, zweimal in 90%igem Isopropanol, je einmal in 70%igem und 50%igem Isopropanol eingelegt und zum Abschluß in H₂O gespült. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 10 Minuten in Hämalaun nach Mayer inkubiert, durch mehrmaliges kurzes Eintauchen in HCl-Alkohol differenziert und dann für 10 Minuten in entmineralisiertem Wasser gebläut. Dann wurden die Präparate für vier Minuten in 0,5% Eosin gelegt und rasch durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt.

III.2.7.2 Immunhistochemische GFAP-Färbung

Zur Darstellung einer reaktiven Astroglieose wurde die GFAP (fibrilläres saures Gliaprotein)-Färbung benutzt. Die Ventana-Färbemaschine (Ventana Medical Systems, Illkirch Cedex, Frankreich) färbte die Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Schnitte nach dem *I-view DAB Detection Kit*-Protokoll mit dem GFAP-Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland). Dieser wurde in Antibody-Diluent (1:3000) verdünnt und durch die Maschine aufgetragen. Die Färbemaschine trug den Sekundärintikörper *I-view DAB* nach dem oben genannten Protokoll auf. Zuletzt wurde die Gegenfärbung vorgenommen: Erst inkubierten die Schnitte 1-2 Minuten in Hämalaun, dann wurden sie 10 min in lauwarmem Wasser gebläut und in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol gespült (s.o.).

III.2.7.3 Immunhistochemische PrP^c- und PrP^{sc}- Färbung

Der monoklonale Antikörper CDC1 gegen murines *Full-length-PrP* und den korrespondierenden Sekundär-Antikörper (Novus Biologicals, Cambridge, Grossbritannien) dienten der Bindung des murinen PrP^c bzw. PrP^{sc}. Die entparaffinierten Schnitte inkubierten 30 Minuten in 0,2M Borsäure (pH 9,0, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) im Wasserbad bei 63°C, zur Optimierung der Antigenbindungsstellen. Anschließend kühlten sie in der Borsäure ab und wurden dann drei bis vier Mal mit destilliertem Wasser gespült. Zwei Minuten wurden sie mit Hämalaun gespült und dann zwei Minuten in lauwarmem Wasser gebläut. Die Äquilibration erfolgte durch zwei Mal fünfminütiges Inkubieren in PBS (pH 7,3).

Bei den PrP^{sc}-Schnitten erfolgte der Proteinase K-Verdau (50mg/ml, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) bei einer Konzentration zwischen 1:350 und 1:800, wodurch gewährleistet wurde, dass nur das PrP^{sc} und nicht das PrP^c beim nächsten Schritt markiert wurde. Der Verdau wurde mit einem Kontrollschnitt

Material und Methoden

verglichen, der aus Knockout-, Wildtyp-, Tg20 (PrP^c-Überexpression)- und Sc-Mäusen bestand. Der Verdau wurde beendet, als der Wildtyp-Schnitt kein PrP^c mehr aufwies. Anschließend inkubierten die PrP^c- und PrP^{sc}-Schnitte in der Ventana-Färbemaschine (s.o.) in polyklonalen CDC1-Antikörper (1:500 in *Antibody diluent*, Ventana Medical Systems, Illkirch Cedex, Frankreich) und später im Sekundär-Antikörper (Schwein-Anti-Kaninchen, 1:150, DAKO, Hamburg, Deutschland). Die Gegenfärbung erfolgte wie oben beschrieben.

III.2.8 Untersuchung des pathologischen Musters

Es wurden neun Hirnregionen von grauer Substanz und drei Regionen weißer Substanz mit Kontrollmäusen bezüglich vermehrter Vakuolisierung/spongiformer Veränderungen, Astrozytose und Menge von PrP^{sc}-Ablagerungen in plaqueartiger und synaptischer Form verglichen. Die Quantifizierung orientierte sich am Protokoll von M. Bruce et al [182, 183]. Die Auswertung der gefärbten Präparate erfolgte geblendet. Hierzu wurden nach Fertigstellung aller notwendigen Färbungen die Beschriftungen der Objektträger mit undurchsichtigem Klebeband abgedeckt und die Objektträger in zufälliger Reihenfolge fortlaufend nummeriert. Die Quantifizierung der verschiedenen Kriterien wurde durch Wiederholung der verblindeten Stichprobenauswertung nach einem längeren zeitlichen Abstand objektiviert.

III.2.8.1 Darstellung von spongiformen Veränderungen in der HE-Färbung

III.2.8.1.1 Graue Substanz

Um die durch die Prioninfektion bedingten spongiformen Veränderungen der grauen Substanz zu objektivieren, wurden anhand der Vorlage des oben beschriebenen Protokolls für die jeweilige Ausprägung zwischen null und fünf Punkten vergeben (Abbildung 9).

Material und Methoden

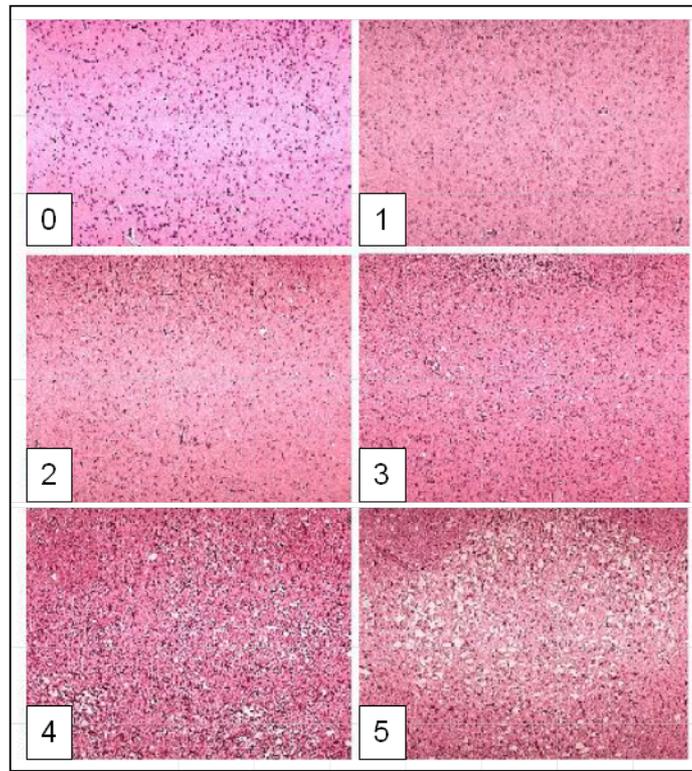


Abbildung 9: Scoring der spongiformen Veränderungen in der grauen Substanz, Bilder aus [182, 185].

III.2.8.1.2 Weiße Substanz

Die Vakuolisierung der weißen Substanz wurde durch die Zuordnung von null bis drei Punkten quantifiziert. Null Punkte wurden bei Fehlen von Vakuolisierung vergeben (Abbildung 10).

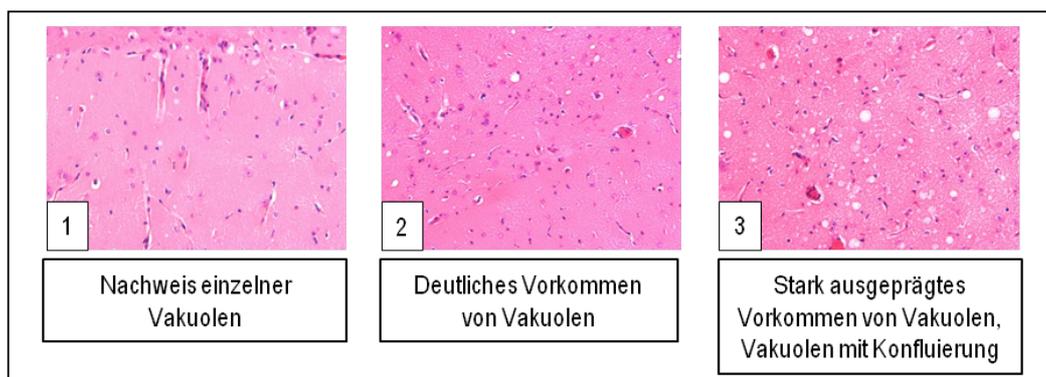


Abbildung 10: Scoring der spongiformen Veränderungen in der weißen Substanz nach Infektion

Die Punkte wurden entsprechend dem oben beschriebene Protokoll von M. Bruce et al [182, 185] vergeben.

Material und Methoden

III.2.8.2 Nachweis der reaktiven Astrozytose in der GFAP-Färbung

Um das Ausmaß der reaktiven Astrozytose in der weißen und grauen Substanz zu beurteilen, wurde ein Protokoll in Anlehnung an das Protokoll entworfen. Es wurden verblindet die oben beschriebenen zwölf Hirnregionen (Abbildung 8) bei allen Mäusen beurteilt.

Es wurden null (keine eindeutige Astrozytose), ein Punkt (vereinzelter Nachweis von Astrozyten), zwei Punkten (deutliche Ausprägung der Astrozytose mit Astrozytose in den meisten Bereichen des beurteilten Abschnittes) und drei Punkten (stark ausgeprägte Astrozytose in den meisten Bereichen des beurteilten Abschnittes) vergeben (Abbildung 11).

III.2.8.2.1

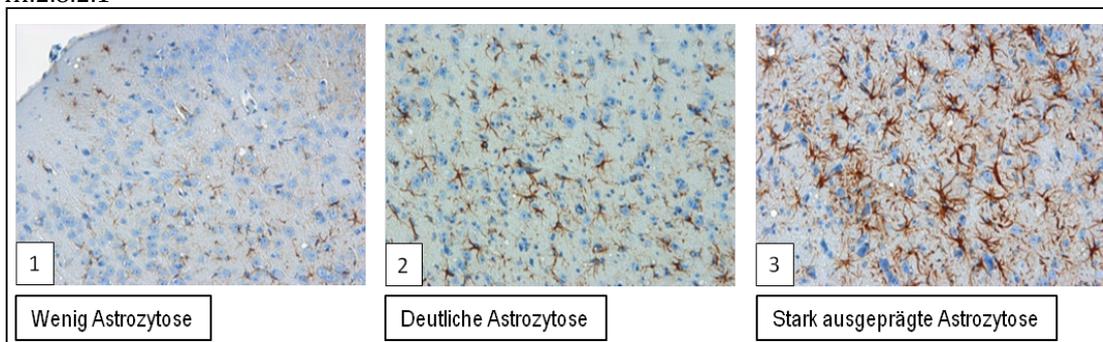


Abbildung 11: Scoring der Ausprägung von Astrozytose nach Infektion

III.2.8.3 PrP^{sc}-Ablagerungen

Analog zu den oben beschriebenen Untersuchungen wurde ebenfalls ein Score zur Bewertung von PrP^{sc}-Ablagerungen, sowohl in plaqueartiger als auch in synaptischer Form, erstellt (Abbildung 12).

Bei beiden Ablagerungstypen wurden zwischen null (keine Ablagerung), ein Punkt (vereinzelter Nachweis der Ablagerungen), zwei Punkten (deutliche Ausprägung der Ablagerungen in den meisten Bereichen des beurteilten Abschnittes) und drei Punkten (starke Ausprägung in den meisten Bereichen des beurteilten Abschnittes und/oder Konfluierung) Punkte vergeben. Es wurden bei allen Mäusen die oben beschriebenen zwölf Hirnregionen verblindet bewertet (Abbildung 12).

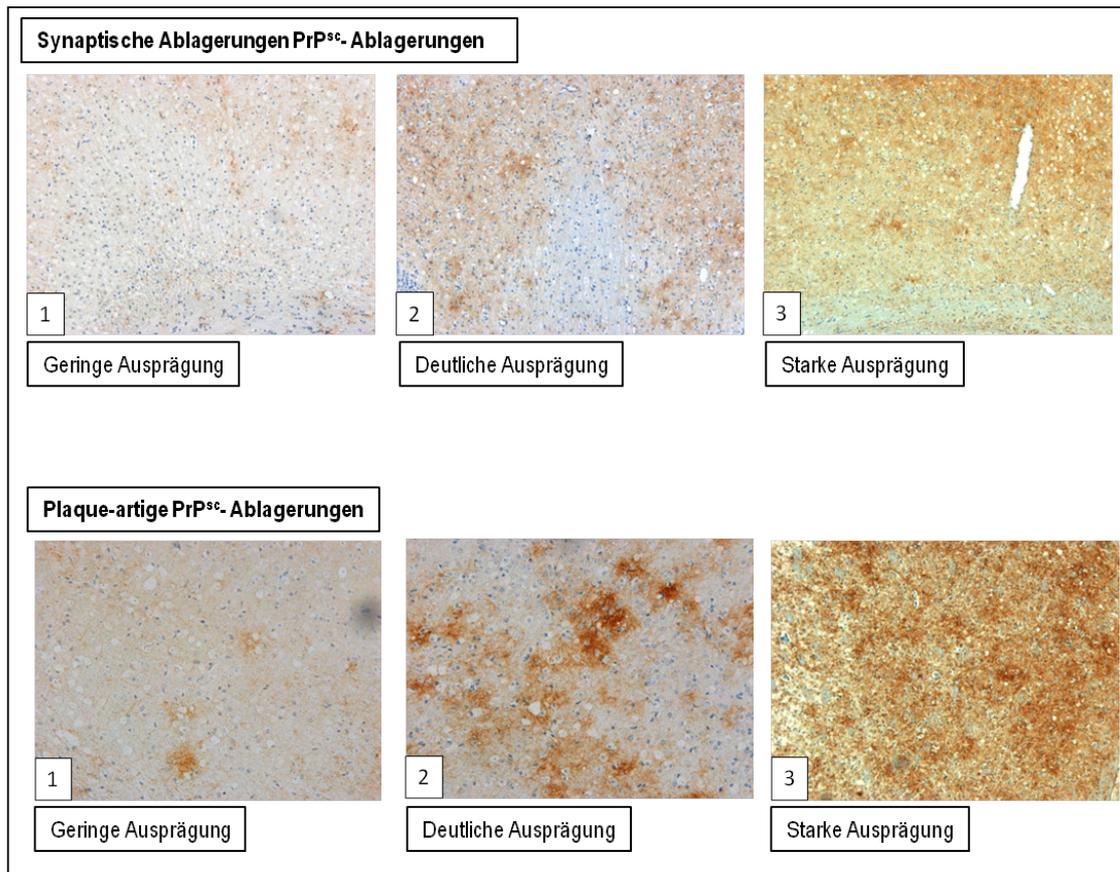


Abbildung 12: Scoring der Ausprägung von PrP^{sc}-Ablagerungen (synaptisch und plaqueartig)

III.2.8.4 Statistische Auswertung

Die ermittelten Werte wurden nach Entblindung ausgewertet. Die Auswertung dieser Untersuchungen erfolgte mittels SPSS (IBM SPSS Statistics). Hier wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Mittelwerte wurden auf Varianzgleichheit untersucht (Levene-Test) und Unterschiede anhand des entsprechenden T-Testes auf Signifikanz geprüft.

IV ERGEBNISSE

In dieser Arbeit soll die potentielle Rolle der Interaktion zwischen Prionprotein und Kupferbindung an der murinen Aminosäureposition 95 während Infektion und Pathogenese untersucht werden.

Ein krankheitsmodulierender Einfluss von Kupfer bei Prioninfektion wurde bisher bereits mehrfach beschrieben - dabei scheint Kupfer vor allem eine hemmende Wirkung auf die Entwicklung von Prionerkrankungen zu besitzen [154, 155]. Bisher ist bekannt, dass das Prion Protein kupferbindende Stellen an der Oktarepeatregion, der Aminosäure Histidin an der Position 95 bei der Maus (His95) bzw. 96 beim Menschen und Histidin an der Position 110 (His110) bei der Maus bzw. 111 beim Menschen besitzt [73, 161, 162]. Wie in der Einleitung dargestellt (s. Einleitung, Absatz 1.4, Prionerkrankungen und Kupfer), wurde die Rolle der Oktarepeatregion bereits mehrfach untersucht: So konnte gezeigt werden, dass diese Region einen wesentlichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf ausübt, es jedoch auch ohne die Oktarepeatregion zur Infektion kommen kann. Die bisherigen Ergebnisse lassen annehmen, dass somit auch die Kupferbindung an einer oder mehreren weiteren kupferbindenden Regionen im Prionprotein eine wichtige Rolle bei Infektion und Pathologie nach Prioninfektion spielen könnten. Ein möglicher Einfluss der Kupferbindung an der murinen Aminosäureposition 95 wurde bisher noch nicht genauer untersucht.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung erfolgte vor Beginn dieser Arbeit eine Mutation des murinen Prion Proteins, durch die das Histidin 95 durch Glycin ersetzt wurde. Um auszuschließen, dass die Mutation bereits vor Infektion zu Veränderungen geführt hatte, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Charakterisierung der nicht infizierten Mäuse (Liniencharakterisierung) der H95G-Mauslinien durch klinische, histologische, immunhistochemische und biochemische Untersuchungen durchgeführt. Im Anschluss daran wurde der Einfluss der H95G-Mutation auf Symptomatik und Krankheitsverlauf nach Infektion untersucht. Hierbei wurde analysiert, inwiefern die H95G-Mutation zu histologischen und/oder immunhistochemischen Unterschieden in den Mäusen sowie zu biochemischen Veränderungen des PrP^{sc} führt.

Ergebnisse

IV.1 Analyse des potentiellen Effektes der H95G-Mutation in nicht infizierten Mäusen

Ziel der folgenden Untersuchungen war eine Darstellung potentieller Einflüsse der H95G-Mutation auf den Zustand der Mäuse vor Infektion. Die Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen von Wildtypmäusen verglichen. Weiterhin erfolgte ein Vergleich der Ergebnisse der H95G-Mauslinien untereinander, um die Einheitlichkeit der H95G-Ergebnisse zu gewährleisten und mögliche zusätzliche Einflüsse auszuschließen. Die Ergebnisse dienen im Verlauf als Vergleich für die Ergebnisse der Mäuse nach Infektion.

IV.1.1 Phänotyp und Symptomatik

Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in Symptomatik und Überleben zwischen den Wildtyp- und den H95G-Mäusen vor Infektion.

IV.1.2 Histologische und immunhistochemische Aspekte

Entsprechend der oben beschriebenen Protokolle (s. Material und Methoden, III.2.8) nach der Arbeit von M. Bruce et al. für die histologische Untersuchung der Hirnregionen nach Infektion, wurden auch bei den nicht infizierten Mäusen der H95G-Mauslinien die Ausprägung und das Verteilungsmuster von H95G-PrP^c in zwölf Hirnregionen analysiert und mit den Befunden der Wildtyp-Mauslinie verglichen.

Es erfolgte eine Beurteilung von Anatomie und Histologie sowie PrP^c-Verteilung in diesen Hirnregionen. Insbesondere wurde auch nach dem Vorhandensein pathologischer Veränderungen, wie Vakuolisierung, Ausschau gehalten, um einen Einfluss der H95G-Mutation bereits vor Infektion zu analysieren und zudem einen Vergleich zu den Ergebnissen nach Infektion schaffen zu können. Exemplarisch werden im Folgenden die Hirnregionen Hippocampus, zerebraler Cortex und Kleinhirn dargestellt, die häufig pathologische Veränderungen im Rahmen von Prionerkrankungen aufweisen und physiologisch höhere Kupferkonzentrationen im Vergleich zu anderen Hirnregionen aufweisen [186].

Ergebnisse

IV.1.2.1 Hippocampus-Region

Die Hippocampus-Region (Abbildung 13) spielt im Rahmen von Prionerkrankungen eine wichtige Rolle und ist hier wahrscheinlich an der Entwicklung von Verhaltens- und neurophysiologischen Störungen beteiligt. Bereits in frühen Krankheitsphasen zeigen sich hier Veränderungen [187-189].



Abbildung 13: Beurteilte murine Hippocampus-Region

Quelle: *Mouse Brain Library* (Neurogenetics at University of Tennessee Health Science Center, USA) [184]

Qualitativ sind sowohl Ausprägung als auch Verteilungsmuster von Vakuolisierung, Astrozytose und von PrP^c zwischen den H95G-Linien sowie im Vergleich zu der Wildtyp-Linie vergleichbar (Abbildung 14).

Von jeder Mauslinie wurde hier exemplarisch eine Maus abgebildet.

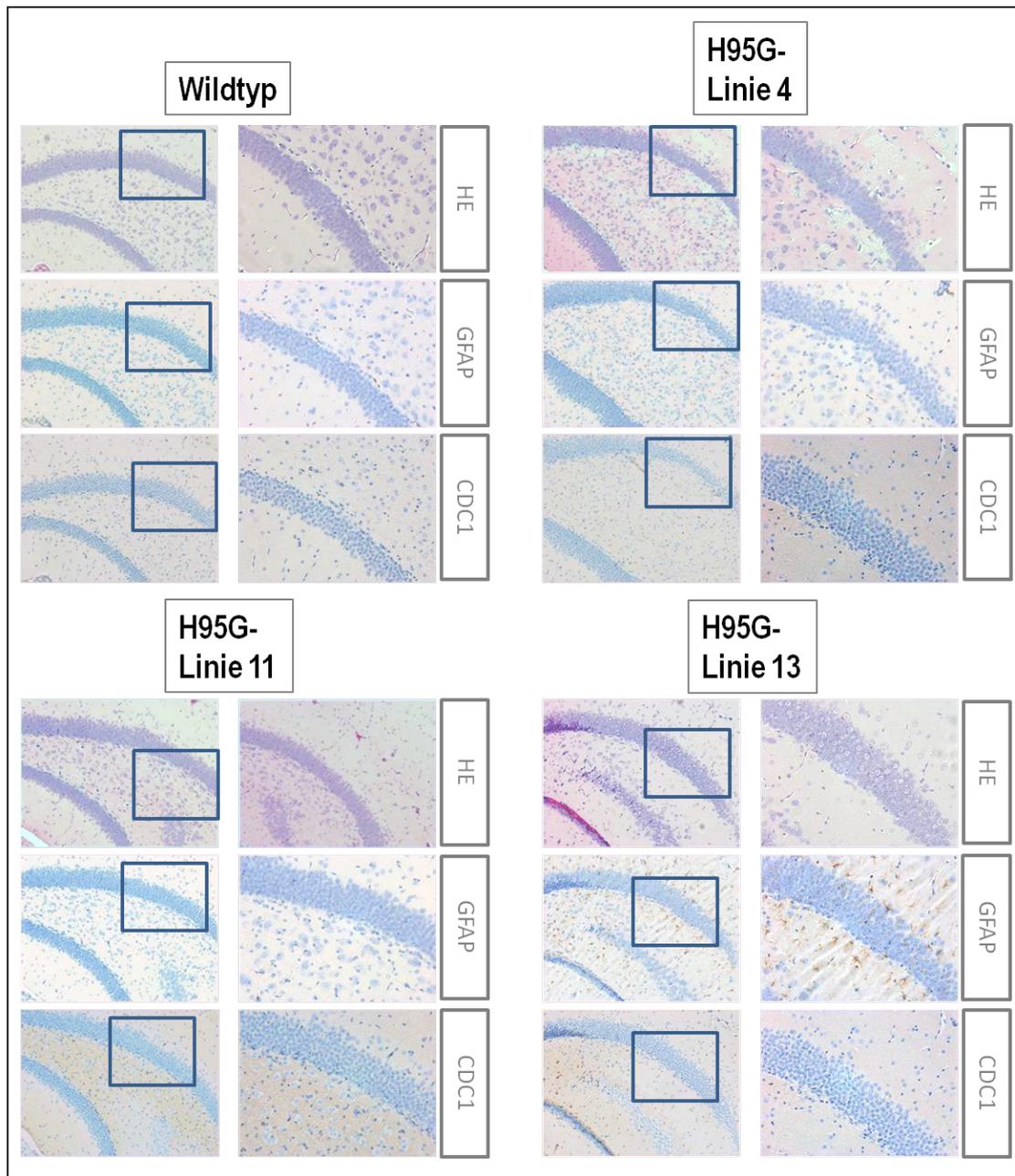


Abbildung 14: Linienspezifische Darstellung histologischer und immunohistochemischer Befunde der Hippocampus-Region der H95G-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp vor Infektion

Die Untersuchung erfolgte jeweils sowohl in 10-facher (jeweils linke Spalte) als auch in 20-facher (jeweils rechte Spalte) Vergrößerung. Die Ausprägung der Vakuolisierung wurde anhand der HE-Färbung, die Ausprägung der Astrozytose anhand der GFAP-Färbung und die Ausprägung des PrP^c anhand der immunhistochemischen PrP^c-Färbung (CDC-1-Primärantikörper) beurteilt. Es zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen allen Mäusen.

Ergebnisse

IV.1.2.2 Kleinhirn

Das Kleinhirn weist bei Prionerkrankungen häufig neuropathologische Veränderungen auf [60, 190, 191]. Die beurteilte Region entsprach der unten dargestellten Region (Abbildung 15). Wie bereits beschrieben erfolgte bei den nicht infizierten Mäusen die Analyse von Verteilung und Ausprägung von Vakuolisierung, Astrozytose und von PrP^c sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz des Kleinhirns.

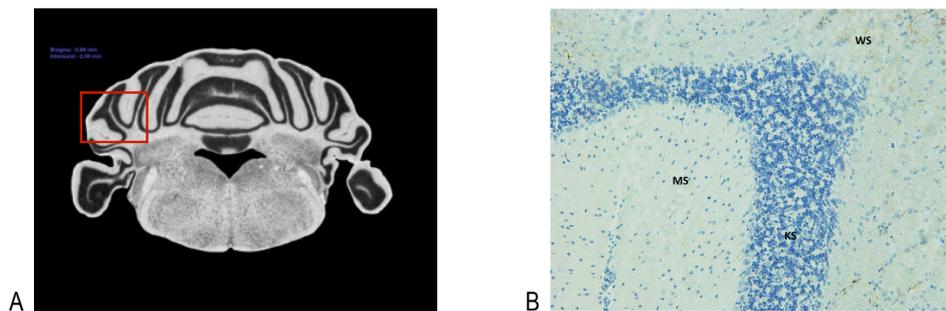


Abbildung 15: Beurteilte murine Kleinhirn-Region

A: Quelle: *Mouse Brain Library* (Neurogenetics at University of Tennessee Health Science Center, USA) [184]. B: MS (Molekularschicht), KS (Körnerschicht), WS (Weiße Substanz), 10-fache Vergrößerung. Exemplarisches, eigenes Bild, GFAP-Färbung, 10-fache Vergrößerung.

Es konnte qualitativ kein Unterschied in Bezug auf Vakuolisierung, Astrozytose oder PrP^c-Verteilung bzw. Ausprägung zwischen Wildtyp- und H95G-Mäusen sowie zwischen den H95G-Mauslinien festgestellt werden (Abbildung 16). Von jeder Mauslinie wurde hier exemplarisch eine Maus dargestellt.

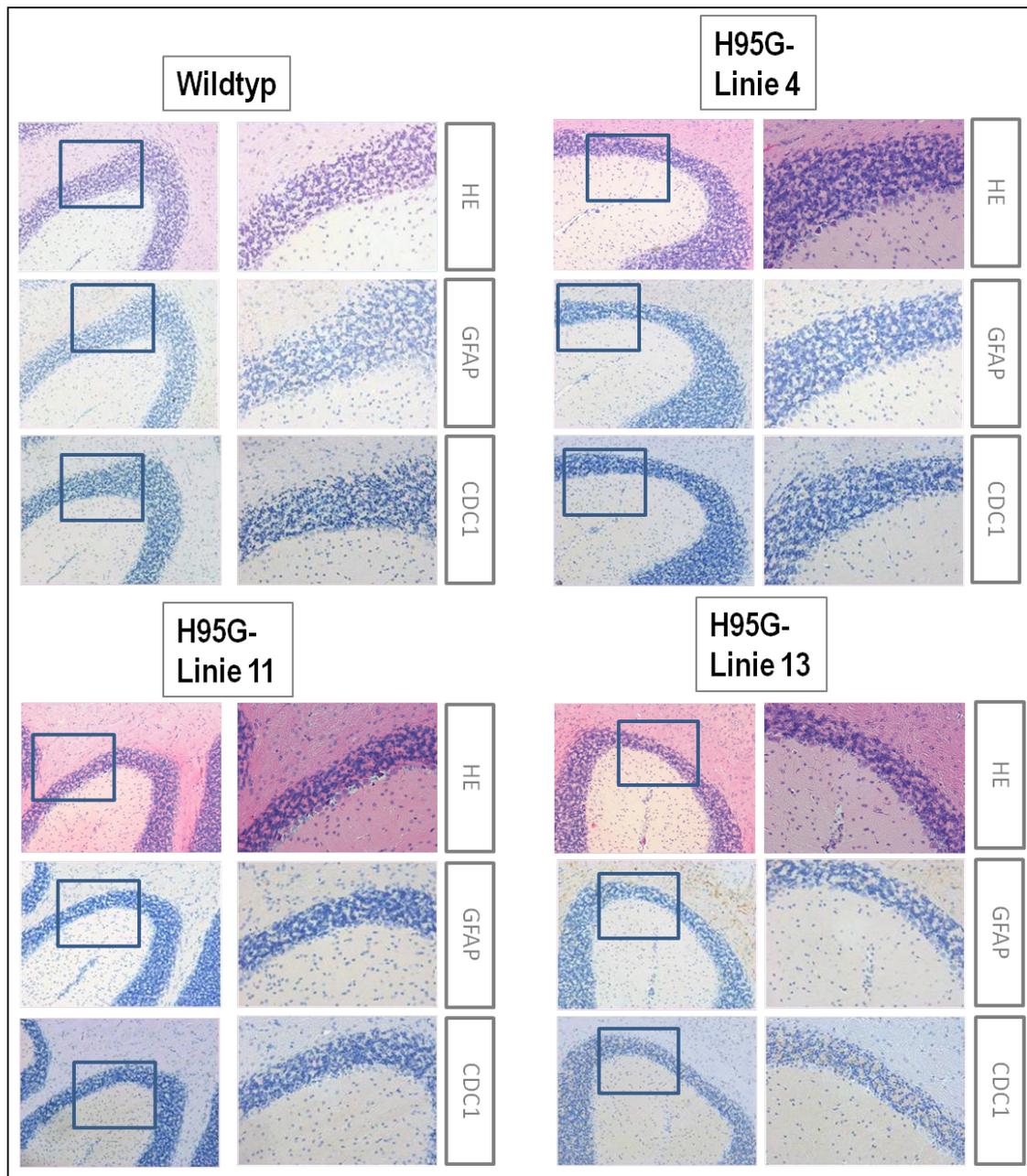


Abbildung 16: Linienecharakterisierung - Beispielhafte Darstellung histologischer und immunhistochemischer Befunde der Kleinhirn-Region der H95G-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp vor Infektion

Die Untersuchung erfolgte jeweils sowohl in 10-facher (jeweils linke Spalte) als auch in 20-facher (jeweils rechte Spalte) Vergrößerung. Die Ausprägung der Vakuolisierung wurde anhand der HE-Färbung, die Ausprägung der Astrozytose anhand der GFAP-Färbung und die Ausprägung des PrP^c anhand der immunhistochemischen PrP^c-Färbung (CDC-1-Primärantikörper) beurteilt. Es zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen allen Mäusen.

Ergebnisse

IV.1.2.3 Zerebraler Cortex

Weiterhin wurden die oben beschriebenen Aspekte auch im zerebralen Cortex (Abbildung 17) untersucht, einer ebenfalls häufig von pathologischen Veränderungen betroffenen Hirnregion bei Prionerkrankungen [189, 192].



Abbildung 17: Beurteilte murine zerebrale Cortex-Region

Quelle: *Mouse Brain Library* (Neurogenetics at University of Tennessee Health Science Center, USA) [184]

Auch hier konnte kein qualitativer Unterschied in Bezug auf Vakuolisierung, Astrozytose und PrP^c-Verteilung bzw. Ausprägung zwischen Wildtyp- und H95G-Mäusen sowie zwischen den H95G-Mauslinien dargestellt werden (Abbildung 18).

Von jeder Mauslinie ist hier exemplarisch eine Maus abgebildet.

Ergebnisse

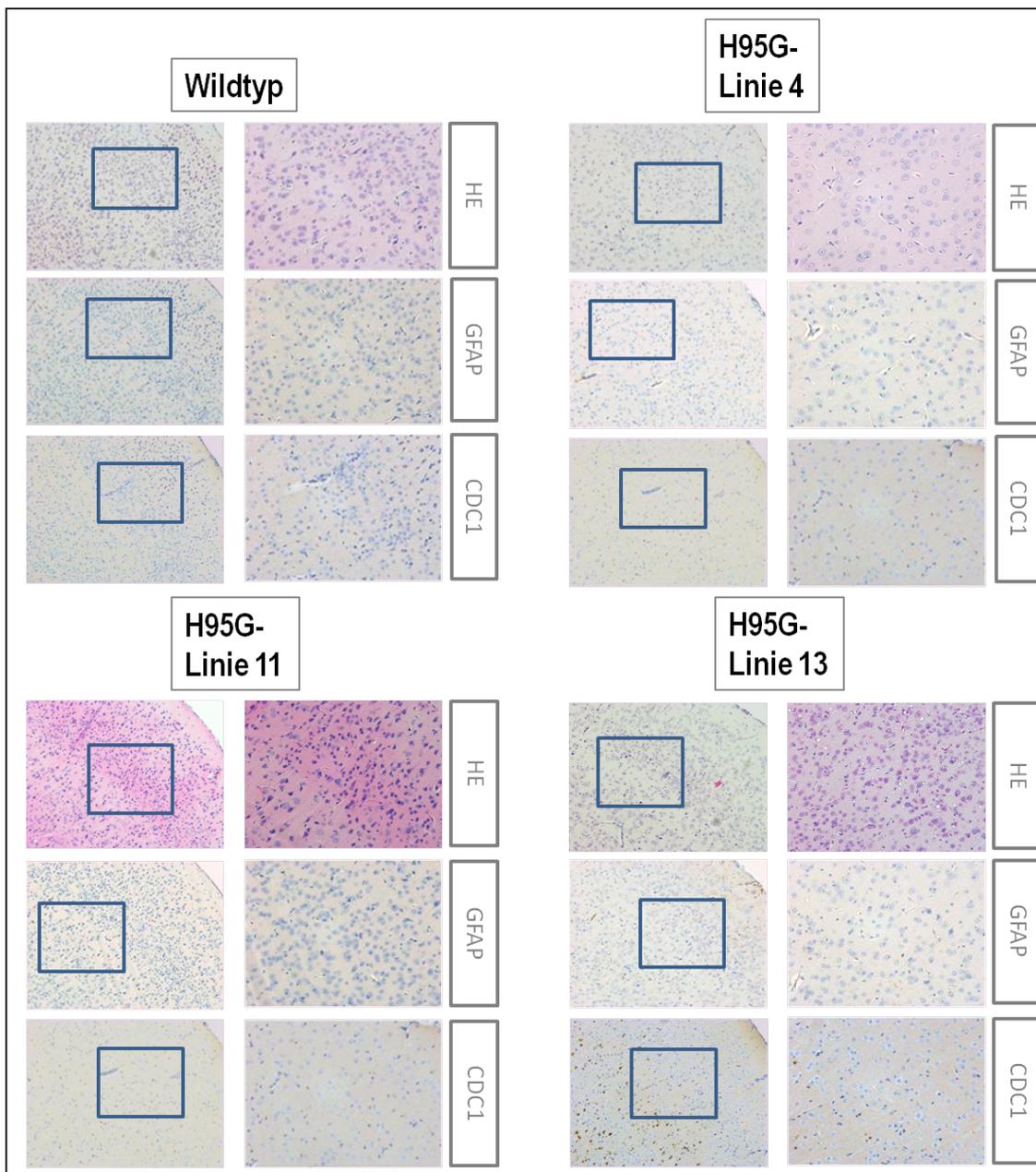


Abbildung 18: Linienecharakterisierung - Beispielhafte Darstellung histologischer und immunhistochemischer Befunde der zerebralen Cortex-Region der H95G-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp

Die Untersuchung erfolgte jeweils sowohl in 10-facher (jeweils linke Spalte) als auch in 20-facher (jeweils rechte Spalte) Vergrößerung. Die Ausprägung der Vakuolisierung wurde anhand der HE-Färbung, die Ausprägung der Astrozytose anhand der GFAP-Färbung und die Ausprägung des PrP^c anhand der immunhistochemischen PrP^c-Färbung (CDC-1-Primärantikörper) beurteilt. Es zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen allen Mäusen.

Ergebnisse

IV.1.2.4 Weitere Organe

Das PrP^c ist ein ubiquitäres Protein. Um zu untersuchen, ob die Mutation an der Kupferbindungsstelle Histidin 95 zu einer wesentlichen Änderung der Verteilung oder Menge im Körper geführt hatte, die möglicherweise Einfluss auf das Überleben nach Infektion ausüben könnte, wurden verschiedene Organe immunhistochemisch auf Unterschiede in Bezug auf PrP^c-Verteilung und -Ausprägung im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den H95G-Mäusen untereinander und im Vergleich zum Wildtyp in den untersuchten Organen (Milz, Leber, Jejunum, Kolon, Herz, Lunge und Niere) (Abbildung 19). Es konnte somit kein Unterschied bei den verschiedenen H95G-Mauslinien sowie im Vergleich zu der Wildtypelinie dargestellt werden.

Ergebnisse

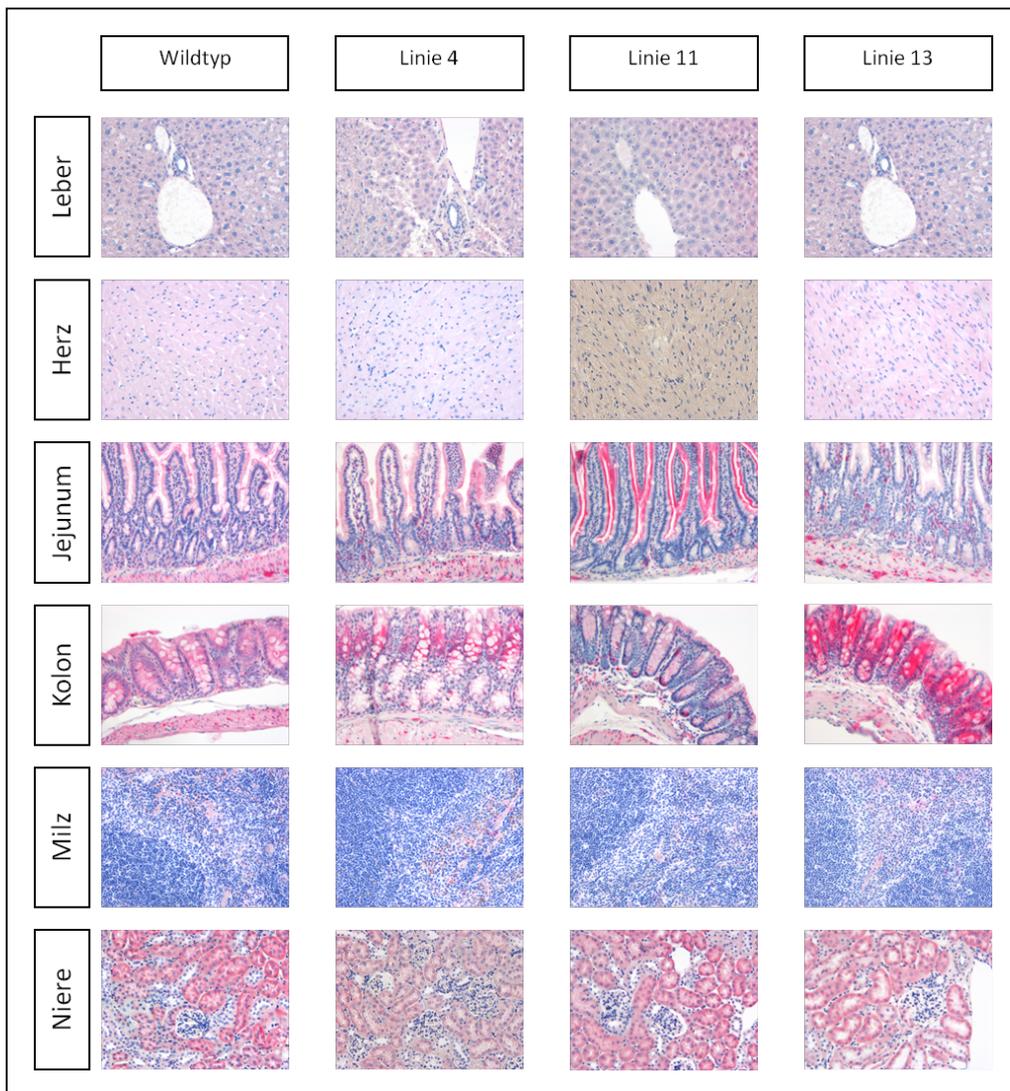


Abbildung 19: Linienspezifische Charakterisierung - Beispielhafte Darstellung immunohistochemischer Befunde von verschiedenen Organen

Hier dargestellt sind die Ergebnisse in 20-fache Vergrößerung. Je Mauslinie wurden exemplarisch die Organe einer Maus zur Darstellung gewählt. Es zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen allen Mäusen.

Ergebnisse

IV.1.3 Analyse von biochemischen Eigenschaften, Expression und Struktur des H95G-PrP^c

Die Analysen mittels Western Blot dienten der Darstellung der biochemischen Eigenschaften des PrP^c nach der H95G-Mutation (H95G-PrP^c). Ein eventueller Einfluss der H95G-Mutation auf angrenzende, wichtige Regionen des PrP, denen insbesondere nach Infektion eine Rolle zukommt, wurde untersucht. Weiterhin wurde geprüft, inwiefern der Standard-Primär-Antikörper 4H11 für die weiteren Untersuchungen des H95G- PrP^c bzw. -PrP^{sc} geeignet ist. Das sog. *Full-length-(FL-)PrP^c*, das der Aminosäuresequenz 23-231 entspricht, wurde nach Denaturierung sowie nach Deglykosylierung in verschiedenen Hirnregionen untersucht und mit den Ergebnissen des *FL-PrP^c* im Gesamthirn verglichen, um Unterschiede in Abhängigkeit von der Lokalisation zu prüfen. Zur Beurteilung der Konzentration von PrP^c nach H95G-Mutation wurden Verdünnungsreihen erstellt und verglichen. Die Auswertungen erfolgten im Vergleich zu Kontrollmäusen (Wildtyp- und PrP^c-Knockout-Mäuse). Das Protein β -Aktin (ca. 42 kDa), ein physiologisch gleichmäßig exprimiertes Zellprotein, wurde als Referenz für die allgemeine zelluläre Proteinexpression ebenfalls untersucht.

IV.1.3.1 Einfluss der H95G-Mutation auf bekannte Antikörperbindungsstellen und Wahl des geeigneten Antikörpers

Um mögliche Artefakte aufgrund eventueller unterschiedlicher Antikörper-Affinität nach Mutation zu untersuchen sowie um herauszufinden, ob die Mutation an der Aminosäure Histidin 95 zu weiteren Veränderungen des Proteins geführt hatte, die die nachfolgenden Ergebnisse beeinflussen könnten, wurde das *FL-H95G-PrP^c* (verlaufend bei ca. 33 kDa) auf Änderungen an bekannten Antikörper-Bindungsstellen untersucht. Es wurden hier Antikörperbindungsstellen mit relevantem Einfluss auf Kupferbindung, Pathologie und typische Eigenschaften des PrP untersucht. Weiterhin wurde untersucht, inwiefern der Standard-Antikörper 4H11 trotz der H95G-Mutation für die weiteren Untersuchungen des PrP^c und PrP^{sc} geeignet ist.

Das Ergebnis der H95G-Probe für jeden Antikörper wurde jeweils mit dem einer Wildtypkontrolle verglichen. Im Folgenden wurde repräsentativ die H95G-Linie 13 ausgewählt, um das Antikörper-Bindungsmuster von H95G-*FL-PrP^c* im Vergleich zu Wildtyp-*FL-PrP^c* darzustellen.

Zur Analyse der Oktarepeatregion (Antikörperbindungsstelle: Aminosäuresequenz 60-91) wurde der Antikörper 3B5 verwendet. Dieser Antikörper bindet zudem auch humanes PrP^{sc} [177, 178]. Das Bandenmuster zeigt hier keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und H95G-Mäusen; auch Im Vergleich zwischen Primärantikörper 4H11 und 3B5 zeigt sich kein wesentlicher Unterschied in Bezug auf das Bandenmuster des Wildtyp- und H95G-*FL-PrP^c* (Abbildung 20).

Der Antikörper RA3153 bindet im murinen PrP die Aminosäuresequenz 90-103 [175] und entsprechend die Sequenz mit dem Histidin 95 sowie einen Teil der proteaseresistenten Spaltprodukte nach der Spaltung [51, 173]. Es zeigt sich kein Unterschied zwischen Wildtyp- und H95G-Mäusen im Bandenmuster, sowie zwischen dem

Ergebnisse

Banden entsprechend dem Wildtyp- und H95G-FL-PrP^c nach Verwendung von RA3153 und 4H11 als Primär-Antikörper (Abbildung 20).

Der 3F4-Antikörper bindet die Aminosäuresequenz 108-111 des menschlichen Prionproteins [176]. Wie in den Ergebnissen dargestellt (Abbildung 20), bindet der Antikörper nur unspezifisch das murine Prionprotein sowohl der Wildtypmaus als auch der H95G-Maus. Hier zeigt sich kein relevanter Unterschied zwischen den zwei Mäusen.

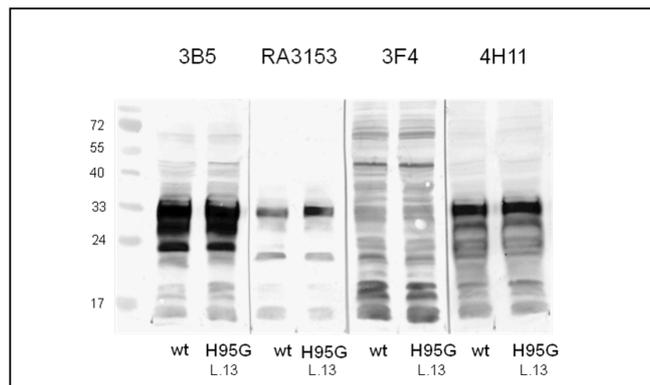


Abbildung 20: Liniencharakterisierung: Antikörper-Mapping

Darstellung des Bandenmusters nach NBT-BCIP-Färbung und Verwendung der Primär-Antikörper 3B5, RA3153, 3F4 sowie 4H11 an das H95G-PrP^c der Linie 13 im Vergleich zu Wildtyp-PrP^c. Es zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen H95G-Maus und Wildtyp-Maus bei den Antikörpern 3B5, RA3153 und 4H11. Der Antikörper 3F4 bindet nur das menschliche Prionprotein spezifisch, hier zeigt sich entsprechend nur ein unspezifisches Bandenmuster.

IV.1.3.2 Untersuchung des *Full-Length*-H95G-PrP^c

Durch die Denaturierung mit 5xSDS-Lämmli-Puffer wird eine Auftrennung der Proteine ausschließlich entsprechend der Proteingröße ermöglicht. In dieser Untersuchung wurde das sog. *Full-Length*-(*FL*-)PrP^c, das beim Wildtyp typischerweise vor allem bei ca. 33 kDa verläuft, analysiert. Das *FL*-PrP^c ist posttranslational prozessiert worden, jedoch noch keinem physiologischen Abbauprozess (z.B. Deglykosylierung, α - oder β -Spaltung) unterlegen. Zur Untersuchung wurde jeweils eine Maus pro Linie ausgewählt und eine Hirnhälfte für die Untersuchung von Großhirn, Kleinhirn und Hippocampus sowie die andere Hirnhälfte als Äquivalent für „Hirn-Gesamt“ verwendet.

Ergebnisse

Das Bandenmuster in Großhirn, Hippocampus, Kleinhirn und Gesamthirn ist bei Wildtyp- und allen H95G-Mäusen identisch (Abbildung 21): die Bande des Proteins β -Aktin verläuft bei allen Mauslinien sowie in jeder Hirnregion bei ca. 42 kDa und das denaturierte *FL-PrP^c*, neben weiteren Banden, vor allem bei ca. 33 kDa. Weiterhin fällt auf, dass bei den H95G-Mauslinien das Verhältnis von *FL-PrP^c* zu β -Aktin größer ist als bei den Wildtypmäusen. Insbesondere fällt dies im Bereich des Kleinhirns auf. Dieser Unterschied ist insbesondere bei der Linie 13 besonders ausgeprägt zu sehen.

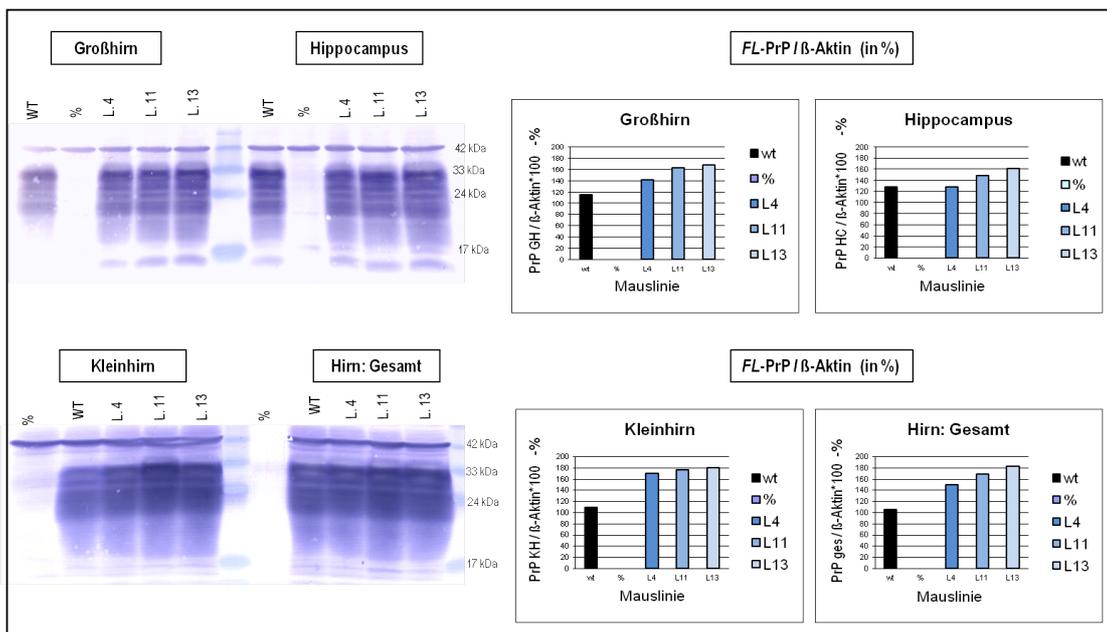


Abbildung 21: Western Blot zur Liniencharakterisierung - nach Denaturierung

Untersuchung von denaturiertem *FL-PrP^c* (bei ca. 33 kDa) und β -Aktin (ca. 42 kDa) in jeweils einer Maus pro Linie: Western Blot mit Primär-Antikörper 4H11 und *Goat-anti-Mouse*-Sekundär-Antikörper, Anti- β -Aktin-Antikörper und *Goat-Anti-Rabbit*-Sekundär-Antikörper.

Auswertung des Verhältnisses von *FL-PrP^c* bei ca. 33 kDa zu β -Aktin zur Analyse der Expression von *FL-PrP^c* im Vergleich zu β -Aktin, einem gleichmäßig gebildeten zellulären Proteins. Die Ergebnisse entsprechen jeweils einer nicht infizierten Maus der Wildtyp-Linie, der Knock-out-Kontrolle (%), der H95G-Linien (L.) 4, 11 und 13. Es wurden die Regionen Großhirn, Kleinhirn, Hippocampus und Gesamthirn untersucht. In fast allen untersuchten Regionen zeigt sich mehr *FL-PrP^c* bei den H95G-Mäusen, was sich auch im Gesamt-Hirn darstellen lässt.

Ergebnisse

IV.1.3.3 Korrelation der gemessenen H95G-PrP^c-Menge mit der tatsächlichen Proteinmenge

Nachdem die H95G-Linien in den meisten Hirnregionen mehr *FL*-PrP^c aufzuweisen schienen (Abbildung 21) als der Wildtyp, wurde untersucht, ob eine lineare Korrelation zwischen tatsächlicher Proteinmenge und gemessener Menge besteht. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von H95G-PrP^c mit Massen von jeweils 100, 50, 25 und 12,5 µg Gesamtprotein verglichen. Zur Kontrolle der Verdünnung wurde ebenfalls die Konzentration des β -Aktins, einem gleichmäßig exprimiertem zellulären Protein, ausgewertet. Anhand der Auswertung (Abbildung 22) ist zu sehen, dass eine lineare Korrelation zwischen tatsächlicher Proteinmenge und gemessener Menge bei PrP^c sowie bei β -Aktin bei den Linie 11, 13 und der Wildtyplinie besteht.

Auch hier ist eine größere Menge PrP^c bei den H95G-Linien 11 und 13 als beim Wildtyp. Bei der Linie 13 und dem Wildtyp ist eine vergleichbare Menge von β -Aktin nachweisbar. Die Ergebnisse der Linie 4 zeigen keine eindeutige lineare Korrelation, weisen aber eine ähnliche Tendenz auf, wie die beiden anderen H95G-Linien.

Ergebnisse

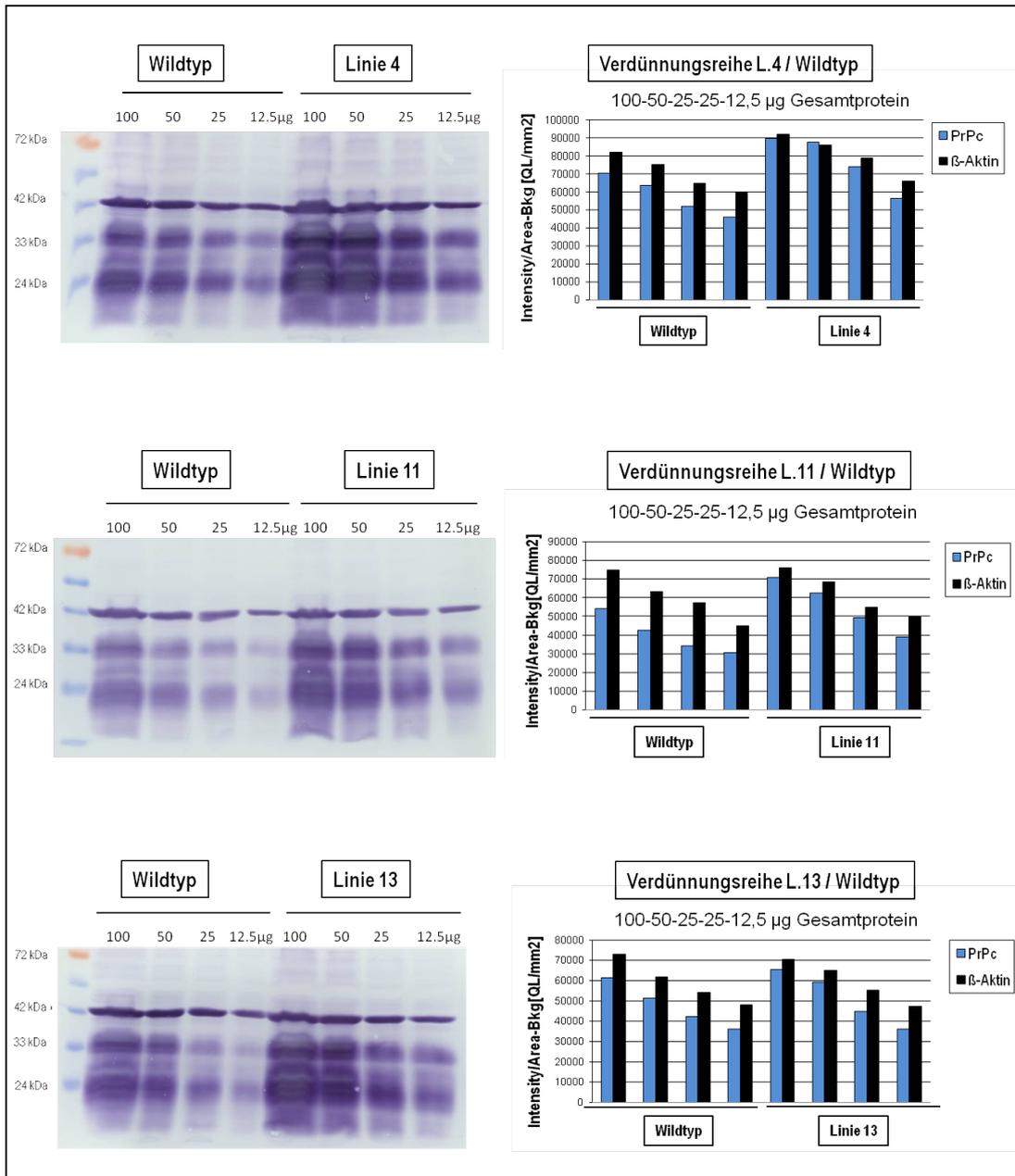


Abbildung 22: Linienecharakterisierung – Verdünnungsreihen

Bkg: Background. QL: Quench Limit. L.: Linie

Darstellung der Verdünnungsreihen des H95G-PrP^c im Vergleich zu der Verdünnungsreihe des β -Aktins, einem Marker für die allgemeine Proteinexpression. Die Untersuchung dient der Kontrolle der Korrelation zwischen gemessener H95G-PrP^c-Menge und tatsächlicher Proteinmenge. Bei allen Mäusen ist mehr PrP^c als β -Aktin nachzuweisen. Die Mäuse der H95G-Linie 4 und 11 weisen mehr PrP^c als die jeweilige Wildtypkontrolle auf, auch die Menge an β -Aktin ist hier höher. Zwischen der H95G-Maus der Linie 13 und der Wildtyp-Kontrollmaus zeigt sich kein relevanter Unterschied in Bezug auf PrP^c - und β -Aktin-Menge, es besteht jeweils eine lineare Korrelation.

Ergebnisse

IV.1.3.4 Analyse des H95G-PrP^c nach Deglykosylierung

Um eine Reduktion der Komplexität der Banden zu ermöglichen, wurde im Western Blot das PrP^c im Gesamthirn der verschiedenen H95G-Mauslinien nach Deglykosylierung durch PNGaseF-Verdau auf Unterschiede im Bandenmuster untersucht. Die PNGaseF spaltet durch Hydrolyse die Bindung zwischen Asparagin (Asn) und N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) in Oligosacchariden von N-Glykoproteinen.

Es wird angenommen, dass bei unbehandeltem PrP^c die Bande verlaufend bei ca. 33 kDa dem doppelt glykosylierten *FL*-PrP^c und die Bande bei ca. 24 kDa einem einfach glykosylierten Fragment entspricht [193]. Die Banden sind jedoch heterogen und zum Teil nicht eindeutig abgrenzbar. Nach dem PNGaseF-Verdau findet man in der Literatur folgende Interpretation der Banden: ca. 25 kDa entspricht dem deglykosylierten *FL*-PrP^c [139][139][139][139][139][139][139][139], ca. 20 kDa dem C2-Fragment sowie ca. 16 kDa dem C1-Fragment [166].

Vor dem PNGaseF-Verdau verlaufen bei Wildtyp- und H95G-Mäusen die Banden bei ca. 33 kDa, bei ca. 24-30 kDa sowie schwach ausgeprägt bei ca. 17 kDa (Abbildung 23). Dem Western Blot ist zu entnehmen, dass nach der Deglykosylierung hauptsächlich Banden bei ca. 24 kDa und bei ca. 17 kDa entstehen.

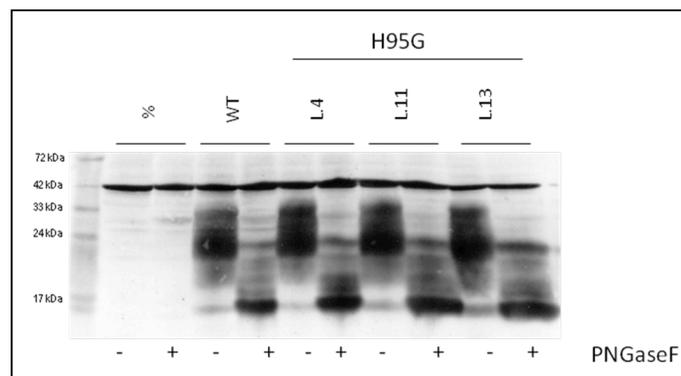


Abbildung 23: Western Blot zur Linienecharakterisierung - nach Deglykosylierung

Bandenverlauf des PrP^c bei H95G-Mäusen der Linie 4, 11 und 13 im Vergleich zum Wildtyp- und Knock-out-Maus, ohne und mit Deglykosylierung mit PNGaseF. % (Knock-out-Maus), WT (Wildtyp), L.4/L.11/L.13 (H95G-Linien 4, 11 und 13).

IV.1.3.5 Untersuchung der Organe

Aufgrund einer zu geringen PrP^c-Proteinkonzentration sowohl bei H95G- als auch bei Wildtyp-Proben konnten keine auswertbaren Ergebnisse erzielt werden.

IV.2 Analyse des Einflusses der H95G-Mutation auf Überlebenszeit und Phänotyp nach Infektion

Bisherige Ergebnisse (s. Einleitung) werfen die Frage auf, inwiefern eine Veränderung der Kupferbindung im Prionprotein den Krankheitsverlauf nach Infektion beeinflusst. Um herauszufinden, ob die H95G-Mutation und die dadurch modifizierte Kupferbindung zu einer Veränderung des Phänotyps und/oder der Überlebenszeit nach der Infektion führt, wurden die Mäuse klinisch beobachtet und die Zeit in Tagen nach Infektion bis zum Eintreten der terminalen Phase der H95G-Mauslinien gemessen. Die gewählten Mäuse waren bei Infektion sechs bis acht Wochen alt. Es wurden für die RML-Infektion homozygote HG95^{+/+}-Mäuse (L. 4 n=8, L.11 n=12, L.13 n=8) mit *Prnp*^{-/-} Hintergrund und *Prnp*^{+/+}-129/Sv-C57/Bl6-Kontrollmäuse (im Folgenden Wildtypmäuse genannt, n=9) mit vergleichbarem genetischem Hintergrund infiziert. Diese Untersuchung erfolgte ebenfalls bei den Mäusen zweiter Passage (2P-Mäuse): Die Gruppe 5 (H95G-Mäuse, n=6) und Gruppe 7 (Wildtypkontrolle, n=6) wurden mit Hirnhomogenat der Maus 304 der Linie 13 nach RML-Infektion inokuliert; die Gruppen 6 (H95G-Mäuse, n=8) und 8 (Wildtypkontrolle, n=6) mit Hirnhomogenat der Maus 305 der Linie 13 nach RML-Infektion. Es wurde mit Mäusen der gleichen Gruppe inokuliert, um einen besseren Vergleich der Ergebnisse zu gewährleisten (s. III.1 Versuchstiere, Materiale und Methoden).

IV.2.1 Symptomatik von infizierten H95G-Mäusen

Die Mäuse wurden bis zum Eintreten der terminalen Phase klinisch beobachtet. Dabei wurde das Laufmuster der Mäuse dokumentiert. Die H95G-Mäuse (RML- und 2P-Mäuse) zeigten hier ebenso wie die Wildtypmäuse nach Infektion ein Nachschleifen der Beine, eine Gangunsicherheit sowie eine Verlangsamung bei der Ganginitiierung. Sowohl bei H95G- als auch bei Wildtypmäusen zeigten sich ein Zusammenkauern und eine Antriebslosigkeit, die per Videokamera festgehalten wurden. Das Fell verlor bei allen Mäusen am Ende der Inkubationszeit deutlich an Glanz.

Ergebnisse

IV.2.2 Überlebenszeit nach Infektion

Die terminale Phase wurde definiert als das Auftreten von zwei der folgenden Symptome an drei aufeinanderfolgenden Tagen: Hypersensitivität mit Lethargie, Gewichtsverlust, Kyphose, Tremor oder Ataxie. Der Zeitpunkt zwischen Infektion und Eintritt der terminalen Phase wird nachfolgend als Überlebenszeit beschrieben. In der anschließenden statistisch-analytischen Auswertung des Patientenüberlebens nach Kaplan-Meier wird der Einfluss der H95G-Mutation auf die mediane Überlebenszeit nach Infektion im Vergleich zu Wildtypmäusen verglichen.

IV.2.2.1 Überlebenszeit der H95G-Mäuse nach RML-Infektion

Beim Vergleich der medianen Überlebenszeit der H95G-Mäuse zu den Wildtypmäusen nach der Infektion (Abbildung 24) stellt sich heraus, dass das mediane Überleben bei der H95G-Linie 4 117 Tage (95% CI: 115,152; 118,848) mit einem Mittelwert von $116,13 \pm$ Standardfehler (SEM) 1,17 Tagen beträgt. Bei der H95G-Linie 11 betrug die mediane Überlebenszeit 82 Tage (95% CI: 75,8; 88,2), der Mittelwert $87 \pm$ SEM 2,5 Tage. Die H95G-Linie 13 wies eine mediane Überlebenszeit von 87 Tagen (95% CI: 84,6; 89,4) und einen Mittelwert von $86,5 \pm$ SEM 1,00 Tagen auf. Hingegen erreichte die mediane Überlebenszeit bei den Wildtypmäusen nach Infektion 145 Tage (95% CI: 144,39; 145,61) mit einem Mittelwert von $145,33 \pm$ SEM 1,17 Tagen auf.

Somit resultiert nach der Überlebensanalyse die H95G-Mutation bei allen mutierten Mauslinien in einem signifikant verkürzten medianen Überleben ($p=0,000$ bei allen Linien) im Gegensatz zum Wildtyp.

Ergebnisse

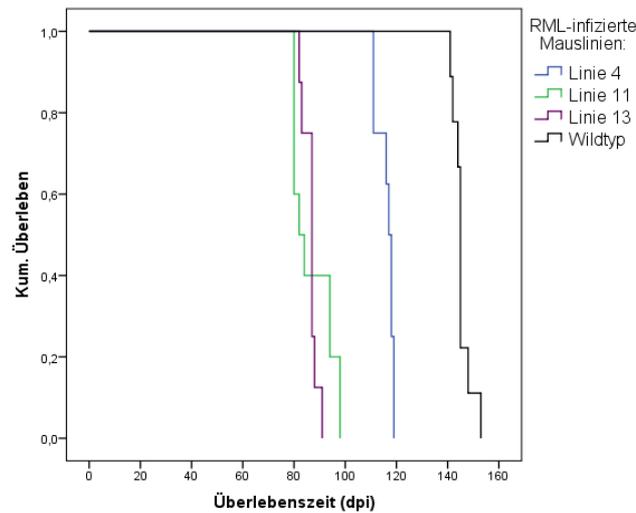


Abbildung 24: Analyse der Überlebenszeit von H95G-Mäusen vs. Wildtyp-Mäusen nach RML-Infektion mittels Kaplan-Meier-Kurve

Linie 4 (n=8), Linie 11 (n=10), Linie 13 (n=8), Wildtyp (n=9). Die H95G-Wildtyp-Mauslinien wiesen eine signifikant kürzere Überlebenszeit nach RML-Infektion im Vergleich zu den ebenfalls RML-infizierten Wildtypmäusen auf.

IV.2.2.2 Überlebenszeit der H95G-Mäuse nach Infektion zweiter Passage

Um herauszufinden, ob die Ergebnisse des H95G-PrP^{sc} auf eine bestehende Infektiosität zurückzuführen sind, wurden (wie oben beschrieben) H95G- und Wildtyp-Mäuse mit infizierten Hirnhomogenaten der H95G-Linie 13 inokuliert: die sog. Mäuse zweiter Passage. Die Mäuse der H95G-Gruppe 5 und die Wildtyp-Gruppe 7 wurden mit der Maus 304 der RML-infizierten Linie 13 infiziert, die H95G-Gruppe 6 und die Wildtyp-Gruppe 8 mit der Maus 305 der RML-infizierten Linie 13.

Die Analyse (Abbildung 25) stellt dar, dass die mediane Überlebenszeit bei der H95G-Gruppe 5 74 Tage und der Mittelwert $75,17 \pm \text{SEM } 0,54$ Tage beträgt. Im Gegensatz dazu beträgt die mediane Überlebenszeit bei der Wildtypgruppe 7 144 Tage (95% CI: 129,60, 158,40) und der Mittelwert $144 \pm \text{SEM } 3,156$ Tage. Bei der H95G-Gruppe 6 war die mediane Überlebenszeit 78 Tage (95% CI: 76,3; 79,47) und der Mittelwert $77,00 \pm \text{SEM } 1,25$ Tage. Bei der Wildtyp-Gruppe 8 war die mediane Überlebenszeit 151 Tage (95% CI: 149,89; 152,13) und der Mittelwert $149,67 \pm \text{SEM } 2,01$ Tage.

Bei beiden H95G-Mausgruppen zeigte sich eine signifikant kürzere Überlebenszeiten nach der Infektion (Gr.5 im Vergleich zur Gr.7 p=0,01; Gr. 6 im Vergleich zur Gr.8 p=0,000) als bei den Wildtyp-Gruppen. Außerdem fällt der

Ergebnisse

Unterschied in der medianen Überlebenszeit zwischen den beiden Wildtyp-Gruppen auf, der jedoch nicht signifikant ist.

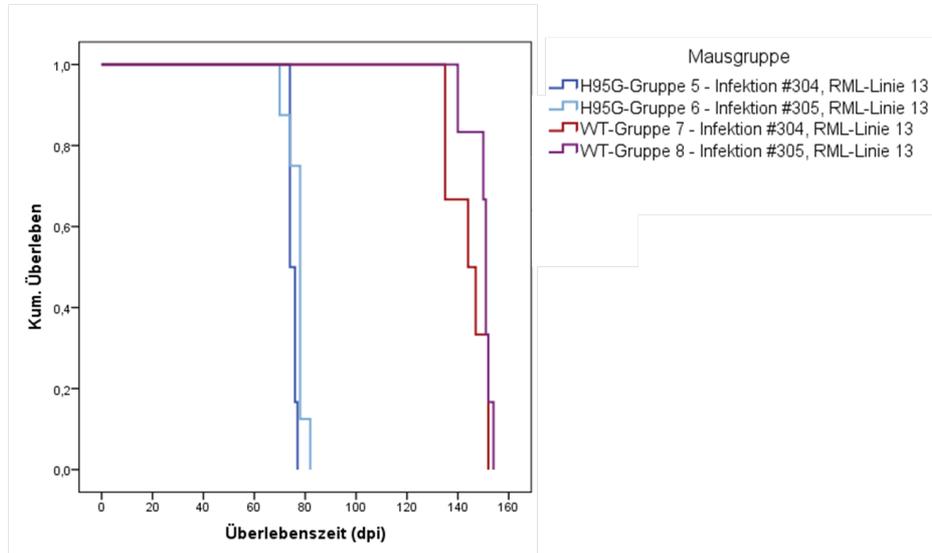


Abbildung 25: Analyse der Überlebenszeit der Mäuse zweiter Passage nach Infektion mittels Kaplan-Meier-Kurve

#: Maus. RML-Linie13 entspricht der H95G-Linie 13 nach RML-Infektion. Gruppe 5 (H95G, n=6), Gruppe 6 (H95G, n=8), Gruppe 7 (WT, Wildtyp, n=6), Gruppe 8 (WT, Wildtyp, n=6).

Auch nach Infektion zweiter Passage zeigte sich eine signifikant kürzere Überlebenszeit nach Infektion bei den H95G-Mauslinien im Vergleich zu den Wildtypmäusen.

IV.3 Analyse des Einflusses der H95G-Mutation auf typische neuropathologische Aspekte nach Infektion

Zuerst wurde anhand von histologischen Präparaten beurteilt, inwiefern die H95G-Mutation nach Infektion die Vakuolisierung (HE-Färbung) und/oder die reaktive Astrozytose (GFAP-Färbung) beeinflusst hat. Weiterhin wurde die Ausprägung der PrP^{sc}-Ablagerungen, in plaqueartiger und synaptischer Form, in immunhistochemischen Präparaten nach der Infektion analysiert (siehe Materiale und Methoden, III.2.8). Die Ausprägung aller Schnitte, sowohl der H95G-Mäuse als auch Wildtypmäuse, wurde verblindet und semiquantitativ bewertet.

Es wurden insgesamt jeweils zwölf verschiedene Hirnregionen entsprechend bekannter Standardprotokolle [182, 183] untersucht: neun Regionen grauer Substanz (Medulla oblongata, Kleinhirn, Colliculi superiores, Hypothalamus, medialer Thalamus, Hippocampus, Septum, Cortex auf Höhe des Septums und auf Höhe des medialen Thalamus) und drei Regionen weißer Substanz (Kleinhirn, Tegmentum, Pyramidenbahn).

IV.3.1 Überblick über histologische und immunhistochemische Ergebnisse

Zur besseren Darstellung der pathologischen Veränderungen wird nachfolgend repräsentativ die Cortex-Region auf Höhe des Septums dargestellt. Von jeder Mauslinie wurde exemplarisch eine Maus für alle Färbungen (HE-, GFAP und PrP^{sc}-Färbung) ausgewählt.

In der HE-Färbung imponieren die spongiformen Veränderungen als „blasenartiges Gebilde im Neuropil, etwa 2 bis 10µm im Durchmesser, die im Wesentlichen Hohlraumbildungen in Nervenzellfortsetzungen entsprechen“ [51]. Durch die GFAP-Färbung wird ein wesentlicher Bestandteil des Astrozytengerüsts gefärbt, sodass durch diese Färbung die sternförmige Verzweigung dieser Zellen gut dargestellt werden kann. In dieser Färbung sind die Astrozyten braun. Plaqueartige Veränderungen sind wolkenartige Verdichtungen ohne zentralen Kern, die in der PrP^{sc}-Färbung dunkelbraun dargestellt werden. Synaptische PrP^{sc}-Ablagerungen hingegen sind feine, diffuse Ablagerungen, die vor allem um Neurone und Dendriten zu finden sind. Sie sind wie die plaqueartigen Ablagerungen nach der PrP^{sc}-Färbung braun gefärbt.

Ergebnisse

IV.3.1.1 RML-infizierte H95G-Mauslinien

Wie in der Abbildung 26 anhand der immunhistochemischen Bilder nach der PrP^{sc}-Färbung dargestellt, zeichnen sich die H95G-Mäuse durch stärker ausgeprägte PrP^{sc}-Plaques als die Wildtypkontrolle aus. Am deutlichsten ausgeprägt waren die plaqueartigen Ablagerungen bei der H95G-Linie 13. Die diffusen, feinen Ablagerungen der synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen in der PrP^{sc}-Färbung sind bei den H95G-Mäusen nachzuweisen. Bei der Linie 4 sind diese ausgeprägter als bei den anderen beiden Linien. Bei der Wildtypmaus sind diese ebenfalls ein wenig stärker und diffus über einen großen Teil des Cortex' verteilt.

Bei allen Mäusen in Abbildung 26 erkennt man außerdem vereinzelte Zellen mit sternförmigen Ausläufern in der GFAP-Färbung, die hier den Astrozyten entsprechen. Die reaktive Astrozytose ist hier bei allen Mäusen eher gering ausgeprägt, dabei im Vergleich bei der Linie 11 am geringsten nachzuweisen.

In Abbildung 27, insbesondere in der 20-fachen Vergrößerung, erkennt man, dass die Wildtypmaus im Vergleich zu den H95G-Mauslinien mehr ovale bis runde Auflockerungen im Gewebe, im Sinne von spongiformen Veränderungen, aufweisen, die zum Teil auch konfluieren. Diese sind im Gegensatz zu den runden, weißen Gefäßanschnitten eher opak. Die H95G-Linie 4 weist in diesem Beispiel etwas mehr dieser Veränderungen als die anderen H95G-Mäusen auf.

Die Ergebnisse werden nachfolgend bei allen Mäusen quantifiziert und statistisch untersucht.

Ergebnisse

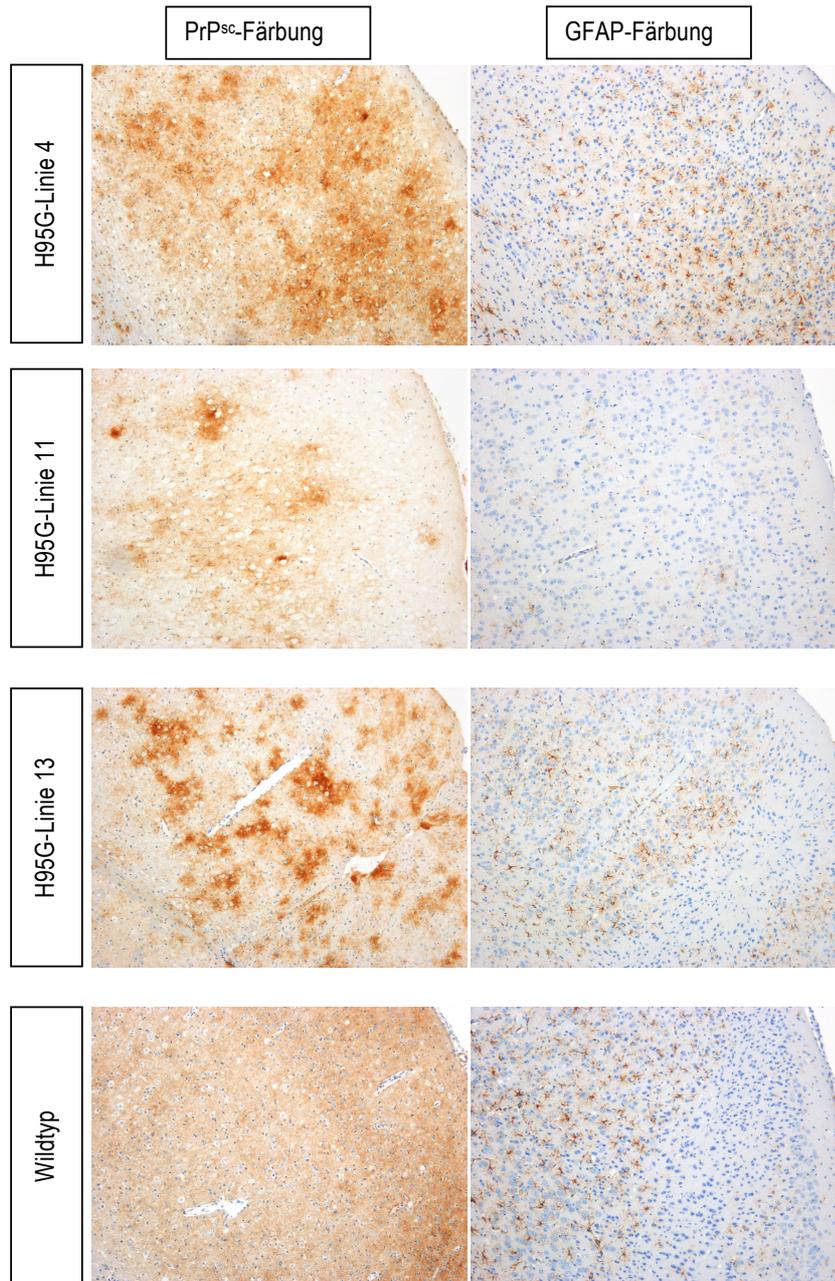


Abbildung 26: Beispielhafte Darstellung der immunhistochemischen Ergebnissen bei den RML-infizierten Mäusen in Bereich der Cortex-Hirnregion auf Höhe des Septums: PrP^{sc}- und GFAP-Färbung

10-fache Vergrößerung. In der PrP^{sc}-Färbung fällt bei den H95G-Mäusen eine deutlichere Ausprägung der plaqueartigen PrP^{sc}-Ablagerungen. Am stärksten ausgeprägt ist hier dieses Ergebnis bei den H95G-Linien 13. Bei allen Mäusen sind feine, synaptische PrP^{sc}-Ablagerungen zu sehen. Es fällt auf, dass bei der Wildtypmaus diese Ablagerungen diffus über eine große Fläche des Cortex' ausgebreitet ist. Bei der H95G-Linie 4 sind diese Ablagerungen in diesem Beispiel stärker als bei den anderen beiden H95G-Mauslinien ausgeprägt. Eine geringe reaktive Astrozytose ist bei allen Mäusen zu erkennen, bei der Linie 4 ist sie am geringsten ausgeprägt.

Ergebnisse

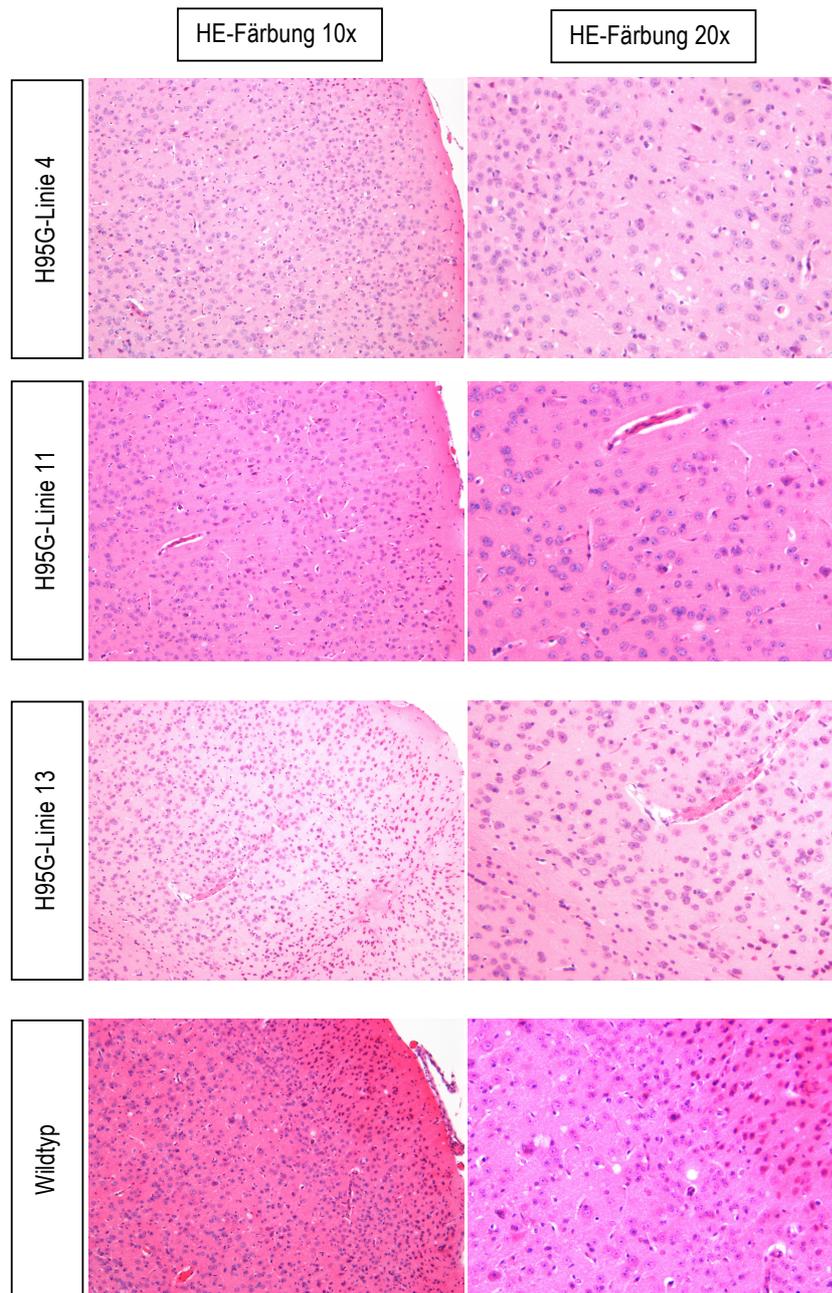


Abbildung 27: Beispielhafte Darstellung der Immunhistochemie bei den RML-infizierten Mäusen in Bereich der Cortex-Hirnregion auf Höhe des Septums: HE-Färbung

10-fache (10x) und 20-fache (20x) Vergrößerung. Man erkennt hier vor allem in der 20-fachen Vergrößerung die vermehrten spongiformen Veränderungen bei der Wildtypmaus im Vergleich zu den H95G-Mäusen. Die eher opaken Auflockerungen im Gewebe konfluieren hier zum Teil. Im Vergleich zwischen den H95G-Mäusen sind bei der Linie 4 am meisten spongiforme Veränderungen zu sehen.

Ergebnisse

IV.3.1.2 H95G-Mauslinien nach Infektion zweiter Passage

Es wurden die H95G-Mäuse der Gruppe 5 (Infektion mit Maus 304, Linie 13) und 6 (Infektion mit Maus 305, Linie 13) nach Infektion zweiter Passage untereinander und jeweils mit der entsprechenden Wildtypmaus nach Infektion zweiter Passage, Gruppe 7 (Infektion mit Maus 304, Linie 13) und Gruppe 8 (Infektion mit Maus 305, Linie 13) verglichen.

Wie in Abbildung 28 in der PrP^{sc}-Färbung dargestellt, weisen die H95G-Mäuse nach Infektion zweiter Passage in der Cortex-Region ebenfalls eine deutlichere Ausprägung der plaqueartigen PrP^{sc}-Ablagerungen im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Kontrollen auf. In diesem Beispiel sind bei allen Mäuse geringe, feine synaptische PrP^{sc}-Ablagerungen nachzuweisen, bei der H95G-Maus der Gruppe 5 in diesem Fall etwas mehr als bei der Wildtypmaus der Gruppe 7.

In der GFAP-Färbung der Abbildung 28 ist die reaktive Astrozytose bei der Maus der H95G-Gruppe 5 vergleichbar mit der der Wildtypmaus der Gruppe 7; die Maus der H95G-Gruppe 6 weist weniger reaktive Astrozytose auf als die entsprechende Wildtypmaus der Gruppe 8.

In der Abbildung 29 scheint die spongiformen Veränderungen in der 20-fachen Vergrößerung, wie oben beschrieben, in den Wildtypgruppen etwas ausgeprägter als bei den beiden H95G-Mäusen der Gruppe 5 und 6 zu sein, die zum Teil auch konfluieren.

Die Ergebnisse werden nachfolgend quantifiziert.

Ergebnisse

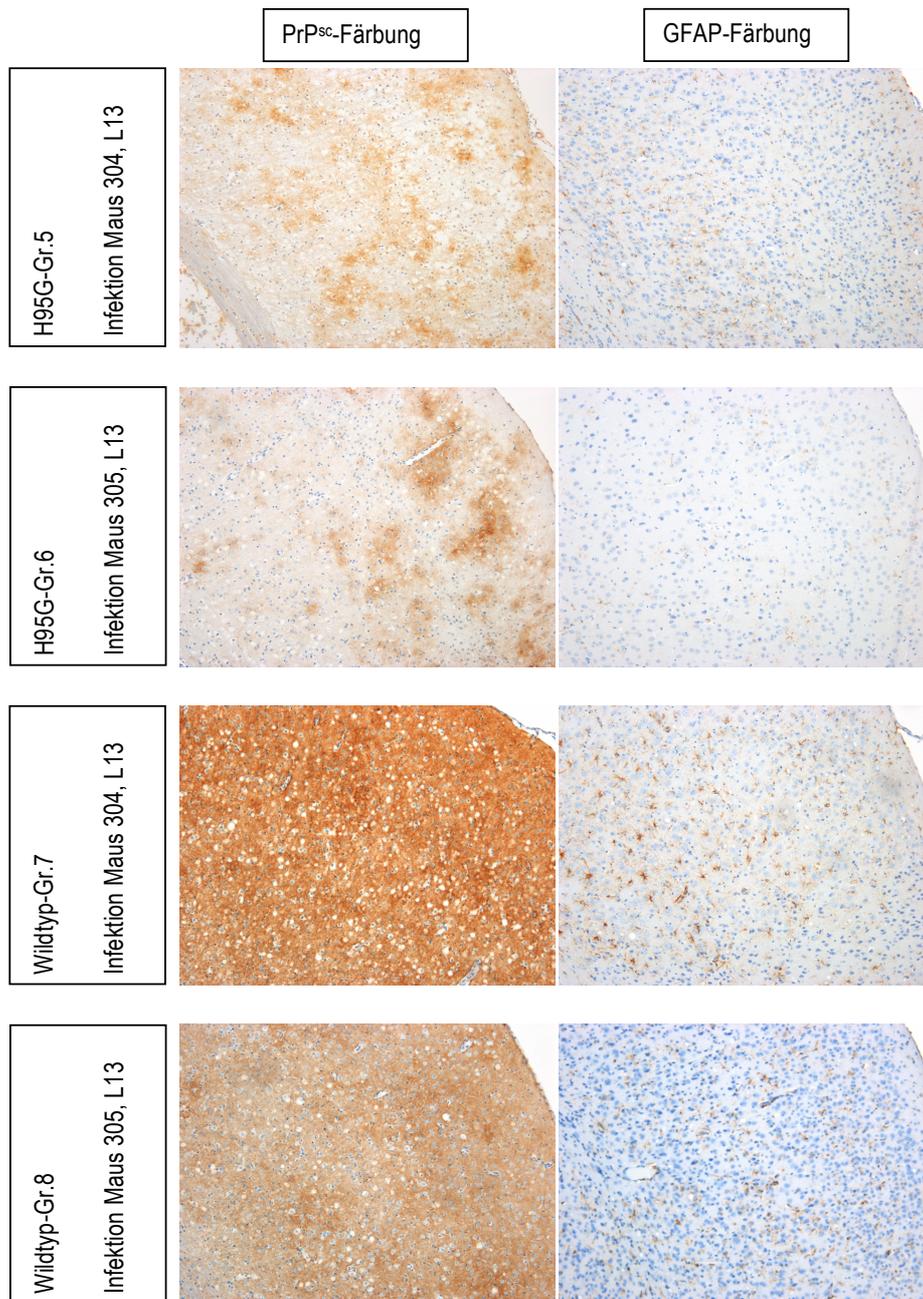


Abbildung 28: Beispielhafte Darstellung der immunhistochemischen Ergebnissen bei den Mäusen nach Infektion zweiter Passage in Bereich der Cortex-Hirnregion auf Höhe des Septums: PrP^{sc}- und GFAP-Färbung

10-fache (10x) Vergrößerung. Die H95G-Gruppen 5 und 6 werden untereinander und jeweils mit den Wildtypgruppe (WT) 7 bzw. 8 verglichen. Auch hier, wie bei den H95G-Mäusen nach RML-Infektion, zeigen sich vermehrte plaqueartige PrP^{sc}-Ablagerungen und eine vergleichbare Ausprägung der Astrozytose in der GFAP-Färbung verglichen mit der jeweiligen Wildtypmaus.

Ergebnisse

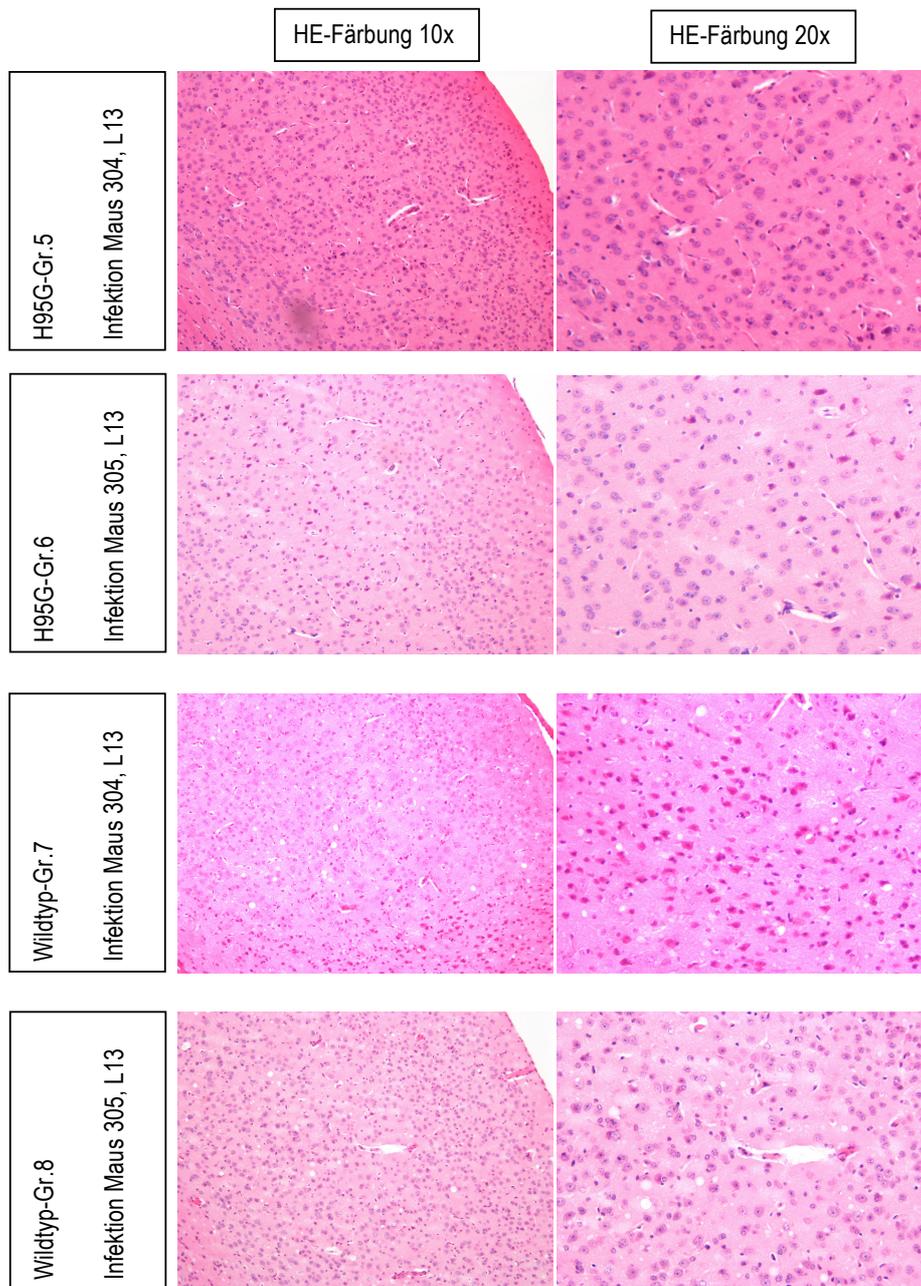


Abbildung 29: Beispielhafte Darstellung der Immunhistochemie bei den Mäusen nach Infektion zweiter Passage in Bereich der Cortex-Hirnregion auf Höhe des Septums: HE-Färbung

10-fache (10x) und 20-fache (20x) Vergrößerung. Die H95G-Gruppen 5 und 6 werden untereinander und jeweils mit den Wildtypgruppe 7 bzw. 8 verglichen. Bei allen sind spongiforme Veränderungen zu sehen, im Vergleich scheinen diese jedoch bei den Wildtypmäusen ausgeprägter zu sein und konfluieren zudem teilweise.

Ergebnisse

IV.3.2 Semiquantitative Untersuchung des pathologischen Musters

Im folgenden Abschnitt wird die Ausprägung typischer histologischer und immunhistochemischer pathologischer Veränderungen von Prionerkrankungen bei den H95G-Mäusen untersucht: Spongiforme Veränderungen wurden hier anhand eines bekannten, bereits definierten Protokolls [44] bei den H95G-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen semiquantitativ bewertet. Für die Ausprägung der spongiformen Veränderungen in der grauen Substanz wurden entsprechend dem Protokoll zwischen null und fünf Punkte, in der weißen Substanz zwischen null und drei Punkte vergeben. Zur Bewertung der Ausprägung von Astrozytose und PrP^{sc}-Ablagerungen (plaqueartig und in synaptischer Form) wurden eigene Protokolle in Anlehnung an das erstere erstellt, bei denen jeweils die Ausprägung anhand von null bis drei Punkte in den beschriebenen Hirnregionen bewertet wurde.

IV.3.2.1 Spongiforme Veränderungen

Spongiforme Veränderungen sind ein klassisches pathologisches Merkmal im Rahmen von Prionerkrankungen. Ihre Entstehung sowie ihre Bedeutung sind bisher noch nicht vollständig verstanden. Nachfolgend wird der Einfluss der H95G-Mutation nach RML- Infektion sowie nach Infektion zweiter Passage analysiert.

IV.3.2.1.1 H95G-Mäuse nach RML-Infektion

Anhand der Grafik (Abbildung 30) kann man erkennen, dass bei den H95G-Mäusen in den meisten Hirnregionen die spongiformen Veränderungen deutlich geringer ausgeprägt sind als bei den Wildtypmäusen. Dieses Ergebnis ist größtenteils statistisch signifikant:

Bei der H95G-Linie 4 sind signifikant geringer ausgeprägte spongiforme Veränderungen im Vergleich zu den Wildtypmäusen in den meisten beurteilten Regionen grauer Substanz zu finden: Colliculi superiores ($p=0,003$), Hippocampus ($p=0,005$), Septum ($p=,000$), Cortex auf Höhe des medialen Thalamus ($p=0,005$). In den Bereichen weißer Substanz war dieser Aspekt ebenfalls signifikant geringer ausgeprägt: weiße Substanz des Kleinhirns ($p=0007$), Tegmentum ($p=0,016$) und Pyramidenbahn ($p=0,002$).

Bei der H95G-Linie 11 zeigte sich in 10 von 12 beurteilten Regionen signifikant geringer ausgeprägte spongiforme Veränderungen als bei den Wildtypmäusen: Wie bei der Linie 4 war dieses Ergebnis im Bereich der Colliculi superiores ($p=0,012$), Hippocampus ($p=0,000$), Septum ($p=0,005$), Cortex auf Höhe des medialen Thalamus ($p=0,002$) und des Septums ($p=0,008$) zu finden. Weiterhin konnte dies in der grauen Substanz des Kleinhirns ($p=0,004$) und Hypothalamus ($p=0,006$) gezeigt werden. In allen Regionen weißer Substanz zeigte sich ebenfalls eine signifikant geringere Ausprägung der spongiformen Veränderungen bei den H95G-Mäusen der Linie 11: weiße Substanz des Kleinhirns ($p=0,011$), Tegmentum ($p=0,000$), Pyramidenbahn ($p=0,000$).

Bei der H95G-Linie 13 waren in folgenden Regionen signifikant geringer ausgeprägte spongiforme Veränderungen zu sehen: Colliculi superiores ($p=0,000$), Hypothalamus ($p=0,033$), Hippocampus ($p=0,001$),

Ergebnisse

Septum ($p=0,001$), Cortex auf Höhe des Septums ($p=0,010$) und des medialen Thalamus ($p=0,011$). Im Bereich der Regionen weißer Substanz zeigte sich ebenfalls eine signifikant geringere Ausprägung der spongiformen Veränderungen bei den H95G-Mäusen: Tegmentum ($p=0,001$) und Pyramidenbahn ($p=0,009$).

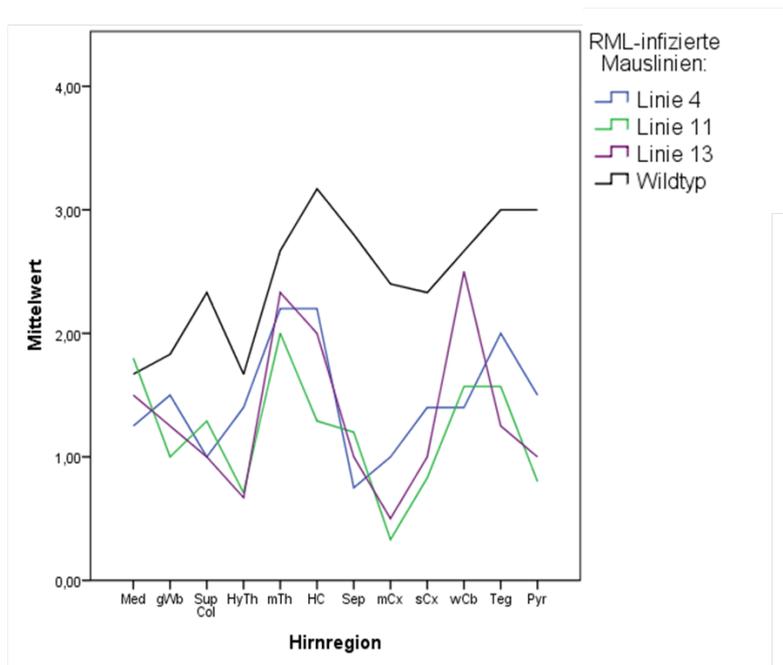


Abbildung 30: Auswertung Ausprägung der spongiformen Veränderungen nach RML-Infektion je nach Hirnregion

Med - Medulla oblongata; *gCb* – graue Substanz im Kleinhirn; *sup col* – Colliculi superiores; *HyTh* – Hypothalamus; *mTh* - medialer Thalamus; *HC* – Hippocampus; *Sep* – Septum; *sCx* - Cortex auf Höhe des Septums; *mCx* - Cortex auf Höhe des medialen Thalamus; *wCb* – weiße Substanz im Kleinhirn; *Teg* – Tegmentum; *Pyr* – Pyramidenbahn. H95G-L.4, n=5; H95G-L.11, n=7; H95G-L.13, n=4; WT, n=5.

Die spongiformen Veränderungen sind bei den H95G-Mäusen nach RML- Infektion in den meisten beurteilten Hirnregionen signifikant geringer ausgeprägt bei den Wildtypmäusen.

Ergebnisse

IV.3.2.1.2 H95G-Mäuse nach Infektion zweiter Passage

Die oben beschriebenen Aspekte wurden ebenfalls nach Infektion zweiter Passage untersucht. Es zeigten sich insgesamt folgende Ergebnisse (Abbildung 31) bezüglich der Ausprägung von spongiforme Veränderungen bei den H95G-Mäusen nach Infektion zweiter Passage (Gruppe 5 bzw. 6) im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypmäusen zweiter Passage (Gruppe 7 bzw. 8): Die H95G-Gruppe 5 zeigte signifikant weniger spongiforme Veränderungen in den Regionen weißer Substanz des Kleinhirns ($p=0,017$) im Vergleich zu der Wildtypgruppe 7 nach der Infektion. Bei den H95G-Mäusen der Gruppe 6 zeigte sich dieses Ergebnis in zwei Regionen grauer Substanz: Cortex auf Höhe des medialen Thalamus ($p= 0,02$) und auf Höhe des Septums ($p=0,024$) im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe 8. Dieser Unterschied zeigte sich in diesen Regionen ebenso bei der Gruppe 5 im Vergleich zur Gruppe 7, wenngleich nicht signifikant. Die Ergebnisse der Infektion nach RML-Infektion sind somit teilweise bei den Mäusen nach Infektion zweiter Passage reproduzierbar.

Ergebnisse

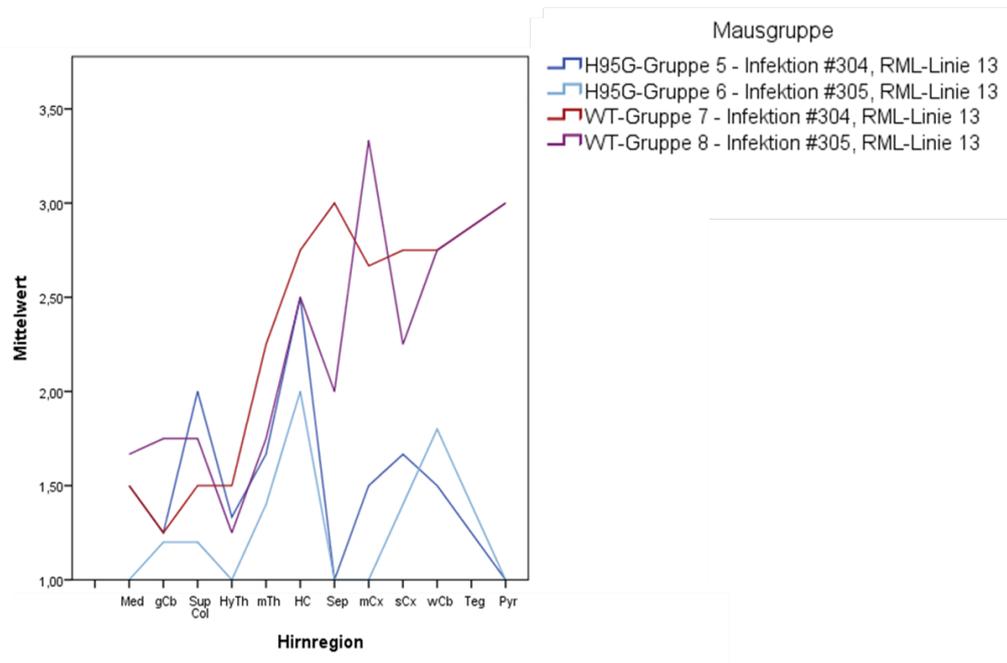


Abbildung 31: Auswertung Ausprägung der spongiformen Veränderungen nach Infektion zweiter Passage je nach Hirnregion

#: Maus. RML-Linie13 entspricht der H95G-Linie 13 nach RML-Infektion. WT: Wildtyp. *Med* - Medulla oblongata; *gCb* - graue Substanz im Kleinhirn; *sup col* - Colliculi superiores; *HyTh* - Hypothalamus; *mTh* - medialer Thalamus; *HC* - Hippocampus; *Sep* - Septum; *sCx* - Cortex auf Höhe des Septums; *mCx* - Cortex auf Höhe des medialen Thalamus; *wCb* - weiße Substanz im Kleinhirn; *Teg* - Tegmentum; *Pyr* - Pyramidenbahn. H95G-Gr. 5, n=4; H95G-Gr.6, n=6; WT-Gr. 7 n=4; WT-Gr. 8, n=4.

Verglichen werden die H95G-Gruppe 5 mit der WT-Gruppe 7 und die H95G-Gruppe 6 mit der WT-Gruppe 8. Wie auch bei den RML-infizierten Mäusen zeigt sich nach Infektion zweiter Passage eine signifikant geringere Ausprägung der spongiformen Veränderungen bei den H95G-Mäusen als bei den Wildtypmäusen in den meisten beurteilten Hirnregionen.

Ergebnisse

IV.3.2.2 Reaktive Astrozytose

Die Astrozytose ist eine typische Reaktion bei Prionerkrankungen und kann durch die immunhistochemische Färbung des Proteins GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*, „Saures Gliafaserprotein“) im Lichtmikroskop dargestellt werden [67]. Es soll im Folgenden untersucht werden, inwiefern die H95G-Mutation diesen Aspekt nach Infektion beeinflusst. Hierzu wurden die oben beschriebenen Hirnregionen nach einem selbst erstellten Protokoll bewertet (null bis drei Punkte) und mit den Ergebnissen von infizierten Wildtyp-Mäusen verglichen. Die Ergebnisse werden auch bei den Mäusen zweiter Passage untersucht.

IV.3.2.2.1 H95G-Mäuse nach RML-Infektion

Je nach beurteilter Hirnregion unterscheiden sich Wildtyp- und H95G-Mauslinien (Abbildung 32) in der Ausprägung der Astrozytose nach Infektion. Signifikante Unterschiede in der Ausprägung der Astrozytose zeigen sich in folgenden Regionen: Bei der H95G-Linie 11 war in der Region der Medulla oblongata ($p=0,014$) signifikant mehr Astrozytose zu sehen. Hingegen war im Bereich graue Substanz des Kleinhirns ($p=0,015$), Hippocampus ($p=0,000$), medialer Thalamus ($p=0,004$) und des Cortex auf Höhe des Septums ($p=0,000$) signifikant weniger Astrozytose als bei den Wildtypmäusen darzustellen. Wie auch bei der H95G-Linie 11, war im Bereich der Medulla oblongata bei der H95G-Linie 13 signifikant mehr Astrozytose als bei den Wildtypmäusen darstellbar ($p=0,013$) und signifikant weniger Astrozytose im Bereich des Cortex auf Höhe des Septums ($p=0,041$) nachzuweisen. Weiterhin war in der weißen Substanz des Kleinhirns ($p=0,019$) und im Tegmentum ($p=0,032$) signifikant mehr Astrozytose nachzuweisen. Bei der H95G-Linie 4 waren keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp nachzuweisen.

Ergebnisse

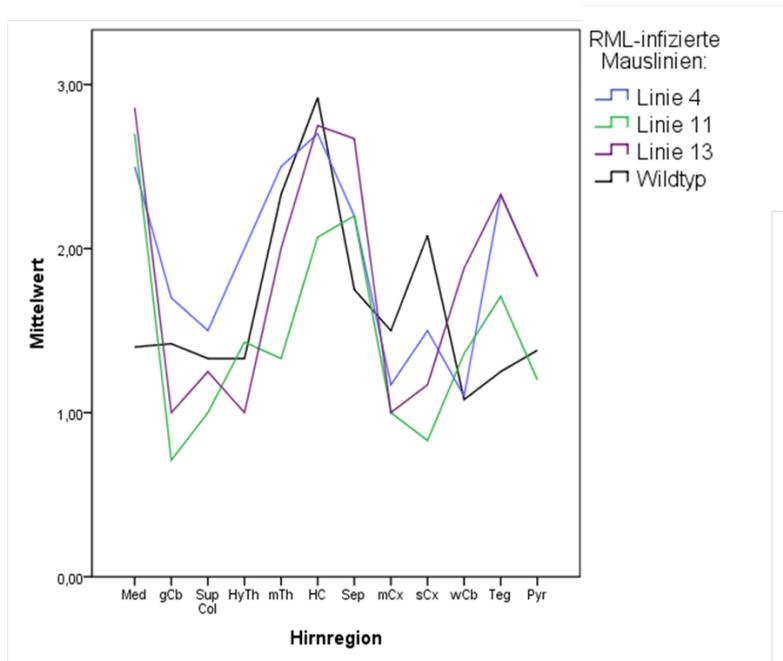


Abbildung 32: Auswertung Ausprägung der Astrozytose nach RML-Infektion je nach Hirnregion

WT: Wildtyp. *Med* - Medulla oblongata; *gCb* – graue Substanz im Kleinhirn; *sup col* – Colliculi superiores; *HyTh* – Hypothalamus; *mTh* - medialer Thalamus; *HC* – Hippocampus; *Sep* – Septum; *sCx* - Cortex auf Höhe des Septums; *mCx* - Cortex auf Höhe des medialen Thalamus; *wCb* – weiße Substanz im Kleinhirn; *Teg* – Tegmentum; *Pyr* – Pyramidenbahn. H95G-L.4, n=5; H95G-L.11, n=7; H95G-L.13, n=4; WT, n=5.

Es zeigt sich bei den H95G-Mäusen eine ausgeprägtere Astrozytose in der weißen Substanz des Kleinhirns, Tegmentum und Medulla oblongata, im Gegensatz zu den Cortexarealen mit deutlich geringer ausgeprägter Astrozytose im Vergleich zum Wildtyp. Bei den H95G-Linien 11 und 13 waren diese Unterschiede teilweise signifikant.

Ergebnisse

IV.3.2.2.2 H95G-Mäuse nach Infektion zweiter Passage

In der Abbildung 33 wird dargestellt, dass bei den H95G-Mäusen zweiter Passage die Ausprägung der Astrozytose im Bereich des Cortex auf Höhe des Septums geringer und im Bereich der Medulla oblongata deutlich stärker ausgeprägt zu sein scheint als bei den Wildtypmäusen.

In der Auswertung wurde gezeigt, dass bei der H95G-Mausgruppe 5 in der Medulla oblongata die Astrozytose signifikant stärker ausgeprägt ist als bei den jeweiligen infizierten Wildtypmäusen ($p=0,006$). Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei der Gruppe 6 im Vergleich zum Wildtyp ($p=0,001$). Die weiteren Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied, wenngleich man hier einen Trend zu einer geringer ausgeprägten Astrozytose in den kortikalen Regionen erkennen kann. Die Ergebnisse der Region im Bereich des Tegmentums konnten in diesem Fall aufgrund des Anschnitts nicht ausgewertet werden. Die Ergebnisse nach RML-Infektion waren somit nach Infektion zweiter Passage teilweise reproduzierbar.

Ergebnisse

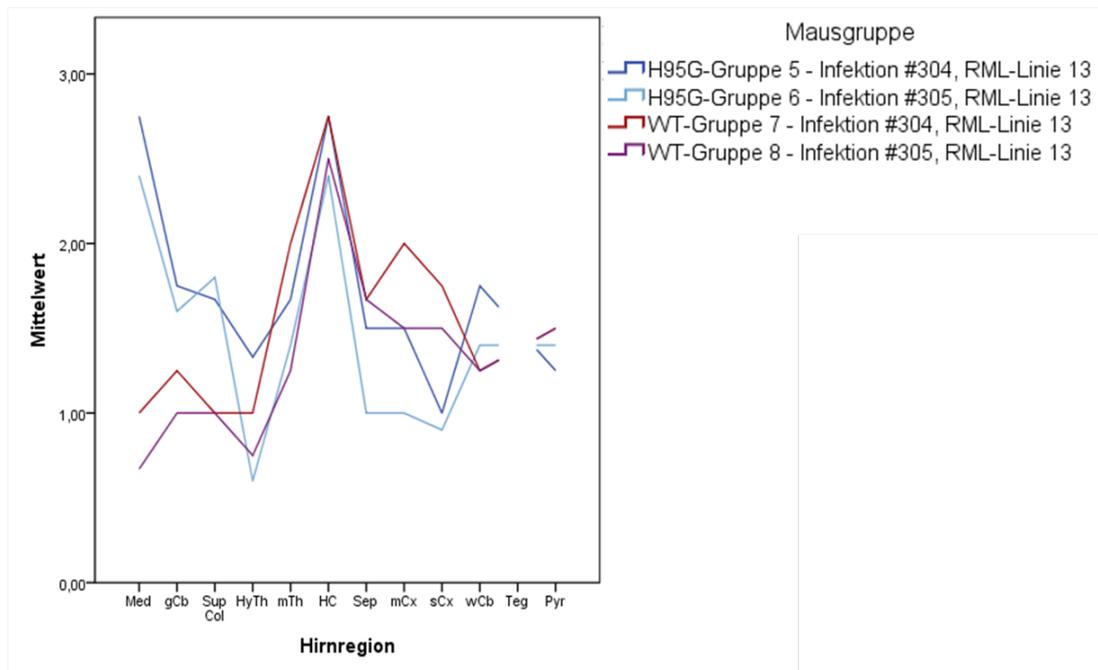


Abbildung 33: Auswertung Ausprägung der Astrozytose nach Infektion zweiter Passage je nach Hirnregion

#: Maus. RML-Linie13 entspricht der H95G-Linie 13 nach RML-Infektion. WT: Wildtyp. *Med* - Medulla oblongata; *gCb* - graue Substanz im Kleinhirn; *sup col* - Colliculi superiores; *HyTh* - Hypothalamus; *mTh* - medialer Thalamus; *HC* - Hippocampus; *Sep* - Septum; *sCx* - Cortex auf Höhe des Septums; *mCx* - Cortex auf Höhe des medialen Thalamus; *wCb* - weiße Substanz im Kleinhirn; *Teg* - Tegmentum (nicht durchgeführt, ungeeigneter Anschnitt); *Pyr* - Pyramidenbahn. H95G-Gr. 5, n=4; H95G-Gr.6, n=6; WT-Gr. 7 n=4; WT-Gr. 8, n=4. Verglichen werden die H95G-Gruppe 5 mit der WT-Gruppe 7 und die H95G-Gruppe 6 mit der WT-Gruppe 8.

Man erkennt hier, dass bei den H95G-Mäusen die Astrozytose im Bereich des Cortex' auf Höhe des Septums geringer und im Bereich der Medulla oblongata deutlich stärker ausgeprägt ist als bei den Wildtypmäusen. Die Ergebnisse der H95G-Mäuse sind wie nach RML- teilweise signifikant.

Ergebnisse

IV.3.2.3 Plaqueartige PrP^{sc}-Ablagerungen

Plaqueartige PrP^{sc}-Ablagerungen werden immunhistochemisch nachgewiesen. Ihre genaue Funktion und Entstehung sind bisher noch nicht vollständig verstanden, sie sind jedoch ein wesentlicher neuropathologischer diagnostischer Aspekt im Rahmen von TSEs. Nachfolgend wird die Ausprägung dieser Ablagerungen nach Infektion bei den H95G-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen dargestellt und statistisch analysiert.

IV.3.2.3.1 H95G-Mäuse nach RML-Infektion

Insgesamt kann anhand der Abbildung 34 eine deutlich stärkere Ausprägung der plaqueartigen PrP^{sc}-Ablagerungen bei den H95G-Mäusen als bei den Wildtyp-Mäusen in den meisten beurteilten Hirnregionen dargestellt werden. Bei der H95G-Linie 4 zeigte sich im Vergleich zu den Wildtypmäusen in den Regionen Kleinhirn (graue Substanz, $p=0,002$), Colliculi superiores ($p=0,016$), Hippocampus ($p=0,004$) und Cortex auf Höhe des Septums ($p=0,000$) signifikant stärker ausgeprägte plaqueartige Ablagerungen von PrP^{sc}.

Die plaqueartigen PrP^{sc}-Ablagerungen waren bei der H95G-Linie 11 ebenfalls in den Regionen Colliculi superiores ($p=0,020$), Hippocampus ($p=0,001$) und Cortex auf Höhe des Septums ($p=0,025$) signifikant ausgeprägter als bei den Wildtypmäusen. Weiterhin zeigte sich dieser Unterschied ebenfalls signifikant im Cortex auf Höhe des medialen Thalamus ($p=0,002$).

Diese Ergebnisse konnten ebenfalls bei der H95G-Linie 13 gezeigt werden: Colliculi superiores ($p=0,001$), Hippocampus ($p=0,002$), Cortex auf Höhe des Septums ($p=0,02$). Wie bei der Linie 4 waren signifikant mehr PrP^{sc}-Ablagerungen im Kleinhirn (graue Substanz, $p=0,007$) vorzufinden. Zudem fanden sich ebenfalls in der Medulla oblongata ($p=0,044$) signifikant mehr plaqueartige PrP^{sc}-Ablagerungen.

Ergebnisse

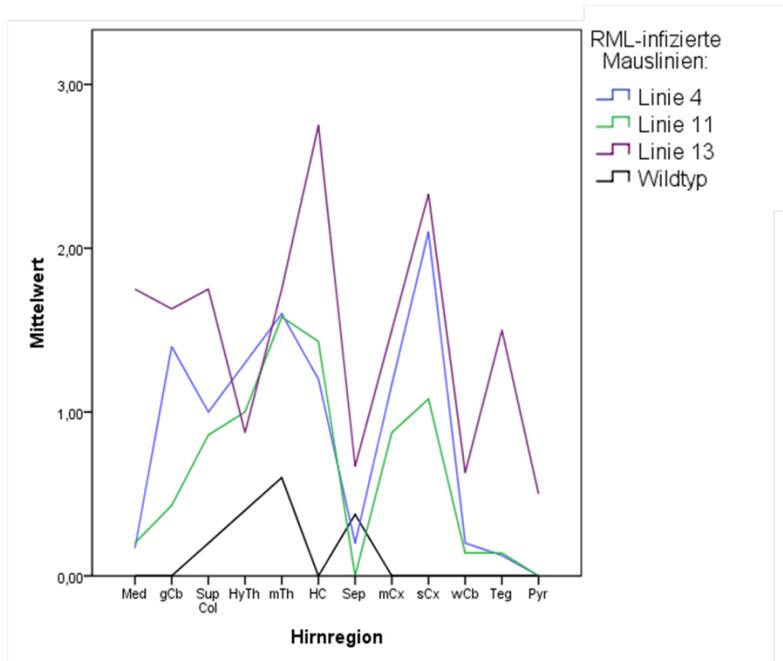


Abbildung 34: Auswertung Ausprägung der plaqueartigen PrP^{Sc}-Ablagerungen nach RML-Infektion

Med - Medulla oblongata; *gCb* – graue Substanz im Kleinhirn; *sup col* – Colliculi superiores; *HyTh* – Hypothalamus; *mTh* - medialer Thalamus; *HC* – Hippocampus; *Sep* – Septum; *sCx* - Cortex auf Höhe des Septums; *mCx* - Cortex auf Höhe des medialen Thalamus; *wCb* – weiße Substanz im Kleinhirn; *Teg* – Tegmentum; *Pyr* – Pyramidenbahn. H95G-L.4, n=5; H95G-L.11, n=7; H95G-L.13, n=4; WT, n=5.

Bei den H95G-Mäusen zeigt sich nach RML-Infektion –größtenteils signifikant – eine deutlich stärkere Ausprägung der plaqueartigen PrP^{Sc}-Ablagerungen in den meisten beurteilten Hirnregionen im Vergleich zum Wildtyp.

IV.3.2.3.2 H95G-Mäuse nach Infektion zweiter Passage

Die oben beschriebenen Aspekte wurden nach Infektion zweiter Passage untersucht. Anhand der Abbildung 35 ist ersichtlich, dass der oben beschriebene deutliche Unterschied zwischen H95G-Mäusen und Wildtyp-Mäusen in mehreren Hirnregionen weiterhin darstellbar ist.

In der Auswertung zeigte sich, dass die H95G-Gruppe 5 signifikant mehr plaqueartige PrP^{Sc}-Ablagerungen als die Wildtypgruppe 7 in den Bereichen graue Substanz des Kleinhirns ($p=0,009$), Colliculi superiores ($p=0,007$), Hippocampus ($p=0,035$), Cortex auf Höhe des Thalamus ($p=0,020$) aufweist.

Ergebnisse

Weiterhin wurde dargestellt, dass die H95G-Gruppe 6 sich durch signifikant mehr plaqueartige PrP^{sc}-Ablagerungen in den Regionen Medulla oblongata ($p=0,033$), graue ($p=0,001$) und weiße ($p=0,007$) Substanz des Kleinhirns, Colliculi superiores ($p=0,001$), Hippocampus ($p=0,002$), Cortex auf Höhe des medialen Thalamus ($p=0,025$) und des Septums ($p=0,001$) auszeichnete als die Wildtypgruppe 8.

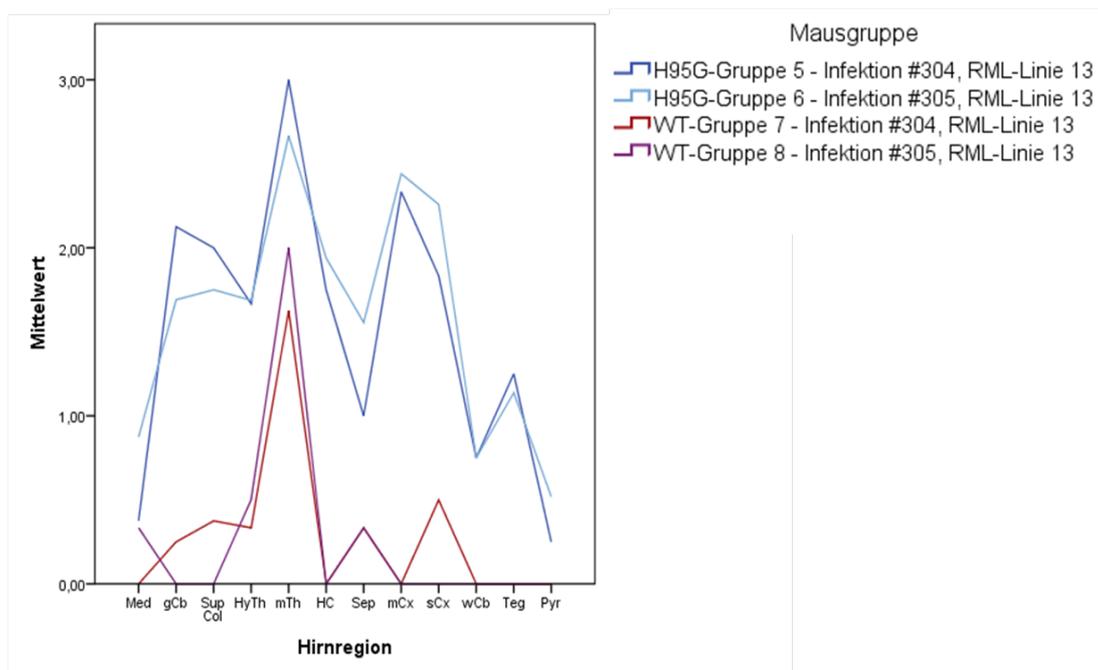


Abbildung 35: Auswertung Ausprägung der plaqueartigen PrP^{sc}-Ablagerungen nach Infektion zweiter Passage je nach Hirnregion

#: Maus. RML-Linie13 entspricht der H95G-Linie 13 nach RML-Infektion. WT: Wildtyp. *Med* - Medulla oblongata; *gCb* - graue Substanz im Kleinhirn; *sup col* - Colliculi superiores; *HyTh* - Hypothalamus; *mTh* - medialer Thalamus; *HC* - Hippocampus; *Sep* - Septum; *sCx* - Cortex auf Höhe des Septums; *mCx* - Cortex auf Höhe des medialen Thalamus; *wCb* - weiße Substanz im Kleinhirn; *Teg* - Tegmentum; *Pyr* - Pyramidenbahn. H95G-Gr. 5, n=4; H95G-Gr.6, n=6; WT-Gr. 7 n=4; WT-Gr. 8, n=4. Verglichen werden die H95G-Gruppe 5 mit der WT-Gruppe 7 und die H95G-Gruppe 6 mit der WT-Gruppe 8.

Wie auch bei den RML-infizierten H95G-Mäusen zeigte sich bei den H95G-Mäusen nach Infektion zweiter Passage eine deutlich stärkere, teilweise signifikante, Ausprägung der plaqueartigen PrP^{sc}-Ablagerungen in den meisten beurteilten Hirnregionen im Vergleich zum Wildtyp.

Ergebnisse

IV.3.2.4 Synaptische PrP^{sc}-Ablagerungen

Synaptische PrP^{sc}-Ablagerungen entsprechen der häufigsten Ablagerungsform und sind möglicherweise für die Neurodegeneration im Rahmen von Prionerkrankungen verantwortlich [46, 48]. In diesem Abschnitt soll untersucht werden, inwiefern die veränderte Kupferbindung an der Aminosäure Histidin 95 zu einer veränderten Ausprägung oder Verteilung von synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen im Gehirn nach der Infektion geführt hat. Die Ergebnisse werden mit denen der infizierten Wildtypmäuse verglichen und ausgewertet. Im Anschluss wird das Ergebnis ebenfalls bei den Mäusen zweiter Passage untersucht.

IV.3.2.4.1 H95G-Mäuse nach RML-Infektion

Die synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen bei den RML-Mäusen unterscheiden sich in einigen Regionen deutlich von den Befunden bei den infizierten Wildtypmäusen (Abbildung 36).

Bei der Linie 4 waren die synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen in der Medulla oblongata ($p=0,009$) und in der weißen Substanz des Kleinhirns ($p=0,013$) signifikant stärker ausgeprägt als beim Wildtyp. Signifikant geringer ausgeprägt waren sie in den Regionen Hippocampus ($p=0,025$), Cortex auf Höhe des medialen Thalamus ($p=0,020$) und des Septums ($p=0,006$).

Bei der Linie 11 zeigten sich ebenfalls signifikant stärker ausgeprägte synaptische PrP^{sc}-Ablagerungen in der Medulla oblongata ($p=0,011$) und der grauen ($p=0,029$) und weißen ($p=0,004$) Substanz des Kleinhirns sowie im Tegmentum ($p=0,002$). Im Cortex auf Höhe des medialen Thalamus ($p=0,010$) und des Septums ($p=0,003$) waren die synaptischen Ablagerungen signifikant geringer ausgeprägt.

Bei der Linie 13 wurden ebenfalls signifikant stärker ausgeprägte synaptische PrP^{sc}-Ablagerungen in der grauen Substanz des Kleinhirns ($p=0,020$) sowie signifikant geringer ausgeprägte synaptische PrP^{sc}-Ablagerungen im Cortex auf Höhe des Septums ($p=0,033$) dargestellt.

Ergebnisse

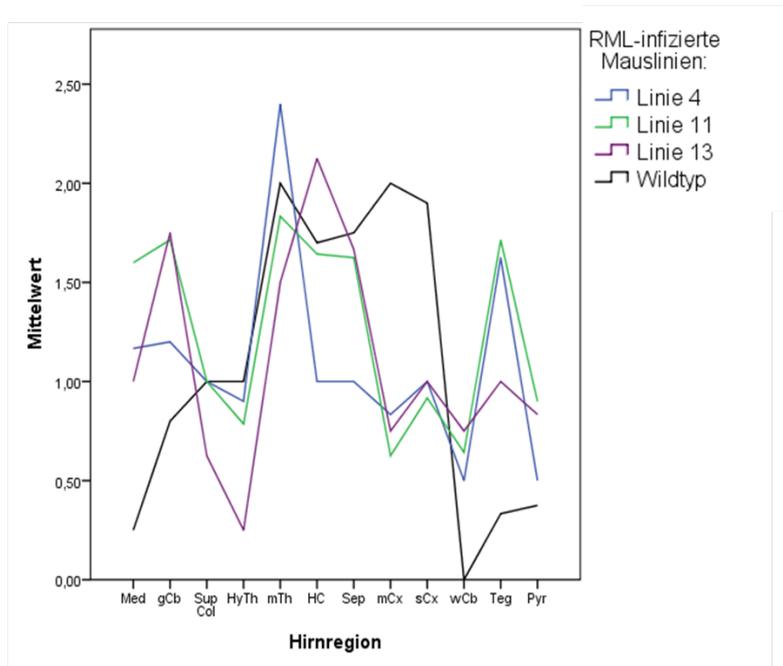


Abbildung 36: Auswertung Ausprägung der synaptischen PrP^{Sc}-Ablagerungen nach RML-Infektion je nach Hirnregion

WT: Wildtyp. Med - Medulla oblongata; gCb – graue Substanz im Kleinhirn; sup col – Colliculi superiores; HyTh – Hypothalamus; mTh - medialer Thalamus; HC – Hippocampus; Sep – Septum; sCx - Cortex auf Höhe des Septums; mCx - Cortex auf Höhe des medialen Thalamus; wCb – weiße Substanz im Kleinhirn; Teg – Tegmentum; Pyr – Pyramidenbahn. H95G-L.4, n=5; H95G-L.11, n=7; H95G-L.13, n=4; WT, n=5.

Bei allen H95G-Mauslinien zeigte sich insgesamt ein ähnlicher Trend in den Regionen Medulla oblongata, weiße und graue Substanz des Kleinhirns, Tegmentum und Pyramidenbahn mit deutlich stärker ausgeprägten synaptische PrP^{Sc}-Ablagerungen. Im Kontrast dazu zeigten sich die synaptische PrP^{Sc}-Ablagerungen in den beurteilten Cortex-Regionen deutlich geringer ausgeprägt.

IV.3.2.4.2 H95G-Mäuse nach Infektion zweiter Passage

Die oben beschriebenen Aspekte wurden nach Infektion zweiter Passage untersucht und in Abbildung 37 dargestellt. Bei den H95G-Mäusen der Gruppe 5 zeigten sich im Vergleich zu den Wildtypmäusen der Gruppe 7 signifikant geringer ausgeprägte synaptische PrP^{Sc}-Ablagerungen in den Regionen Colliculi superiores ($p=0,012$) und Pyramidenbahn ($p=0,001$).

Ergebnisse

Synaptische PrP^{sc}-Ablagerungen sind bei den H95G-Mäusen der Gruppe 6 in den Regionen medialer Thalamus ($p=0,035$), Septum ($p=0,007$), Hippocampus ($p=0,02$) und Cortex auf Höhe des medialen Thalamus ($p=0,006$) signifikant geringer ausgeprägt als den bei infizierten Wildtypmäusen der Gruppe 8.

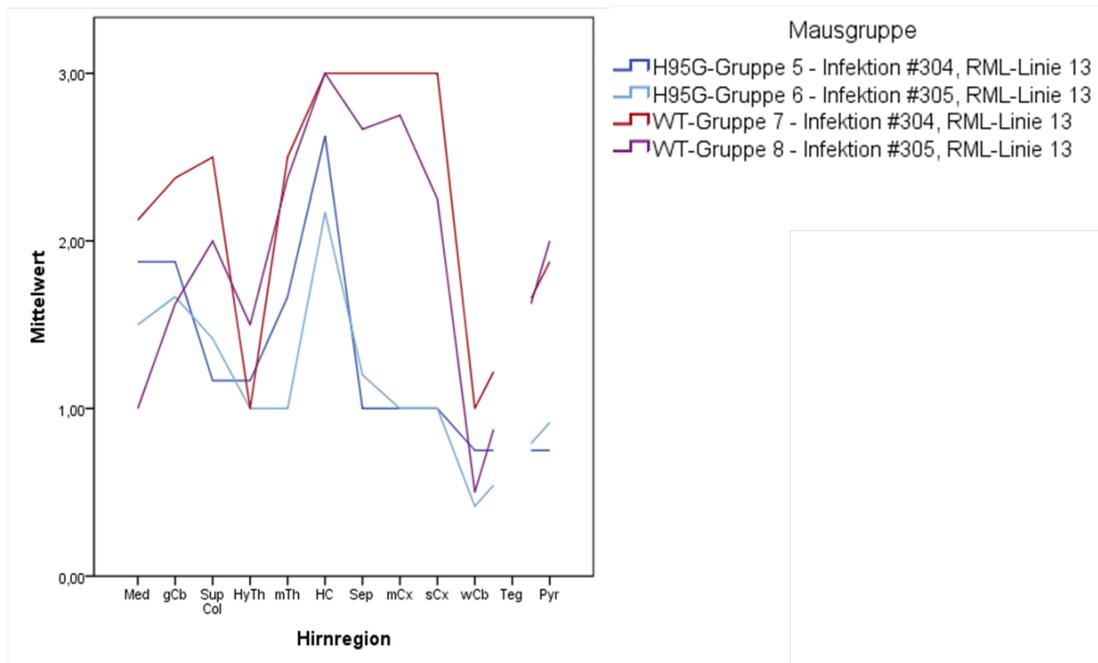


Abbildung 37: Auswertung Ausprägung der synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen nach Infektion zweiter Passage je nach Hirnregion

#: Maus. RML-Linie13 entspricht der H95G-Linie 13 nach RML-Infektion. WT:Wildtyp. *Med* - Medulla oblongata; *gCb* - graue Substanz im Kleinhirn; *sup col* - Colliculi superiores; *HyTh* - Hypothalamus; *mTh* - medialer Thalamus; *HC* - Hippocampus; *Sep* - Septum; *sCx* - Cortex auf Höhe des Septums; *mCx* - Cortex auf Höhe des medialen Thalamus; *wCb* - weiße Substanz im Kleinhirn; *Teg* - Tegmentum (nicht durchgeführt, da ungeeigneter Anschnitt); *Pyr* - Pyramidenbahn. H95G-Gr. 5, n=4; H95G-Gr.6, n=6; WT-Gr. 7 n=4; WT-Gr. 8, n=4. Verglichen werden die H95G-Gruppe 5 mit der WT-Gruppe 7 und die H95G-Gruppe 6 mit der WT-Gruppe 8.

Wie bei den H95G-Mäusen nach RML-Infektion, waren im Bereich des Cortex' auf Höhe des medialen Thalamus die synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen signifikant geringer ausgeprägt als den bei infizierten Wildtypmäusen der Gruppe 8.

IV.4 Analyse des Einflusses der H95G-Mutation auf biochemische Eigenschaften des PrP^{sc}

Es wurde im Folgenden untersucht, inwiefern sich die Mutation am Histidin 95 auf biochemische Eigenschaften des PrP^{sc} ausgewirkt hatte: Führt die H95G-Mutation zu qualitativen Veränderungen des *Full-Length-PrP^{sc}* (*FL-PrP^{sc}*) oder zu einer Veränderung des zellulären Proteinabbaus des PrP^{sc}? Ein wichtiger Aspekt des PrP^{sc} ist seine Teilresistenz gegenüber dem Verdau durch die Proteinase K [133], die wahrscheinlich durch die Konformationsänderung von PrP^c zu PrP^{sc} entsteht und die in dem Abschnitt zwischen den Aminosäuren 90 bis 112 lokalisiert ist [77]. Somit stellt sich die Frage, ob durch die H95G-Mutation eine Veränderung des proteaseresistenten Anteils des PrP^{sc} im Vergleich zum Wildtyp verursacht wurde.

IV.4.1 Untersuchung des *Full-Length-H95G-PrP^{sc}*

Anhand des SDS-Detergenz wurde das *Full-Length-H95G-PrP^{sc}* denaturiert und so eine Auftrennung des Proteins ausschließlich nach Größe ermöglicht.

IV.4.1.1 Nach RML-Infektion

Zur Untersuchung des *Full-Length-(FL-)H95G-PrP^{sc}* bei RML-infizierten Mäusen wurden die Proben mit 5xSDS-Lämmli-Puffer denaturiert. Anhand des Western Blots (Abbildung 38) kann man erkennen, dass qualitativ kein Unterschied im Verlauf der Banden zwischen den Wildtyp-*FL-PrP^{sc}*, verlaufend bei ca. 33 kDa, und H95G-Mäusen, ebenfalls bei ca. 33 kDa, besteht.

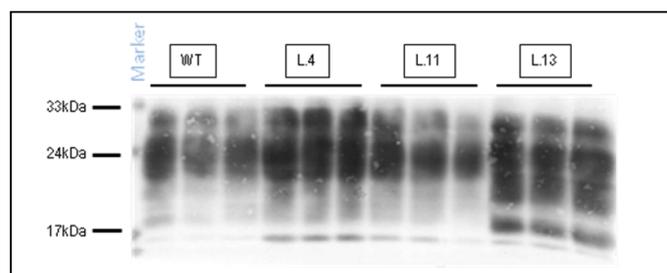


Abbildung 38: Western Blot nach Denaturierung – Beurteilung des H95G-*FL-PrP^{sc}* nach RML-Infektion

Dargestellt wird hier der das *FL-PrP^{sc}* nach Denaturierung durch 5xSDS bei H95G-Mäusen (Linie 4 L4, n=3; Linie 11, L.11, n=3; Linie 13, L.13, n=3) im Vergleich zu Wildtypmäusen nach RML-Infektion (WT, n=3). Die Untersuchung erfolgte bei allen Mäusen nach Eintritt definierter Zeichen der terminalen Phase. Das *FL-PrP^{sc}* verläuft bei Wildtyp und H95G-Mauslinien bei ca. 33kDa.

Ergebnisse

IV.4.1.2 Nach Infektion zweiter Passage

Wie bei den Mäusen nach RML-Infektion wurde auch das *Full-Length-(FL-)* H95G-PrP^{sc} bei den Mäusen zweiter Passage mit 5xSDS-Lämmli-Puffer denaturiert. Im Western Blot (Abbildung 39) zeigt sich ein identischer Bandenverlauf des *FL-PrP^{sc}* bei ca. 33kDa sowohl bei H95G- als auch bei Wildtypmäusen.

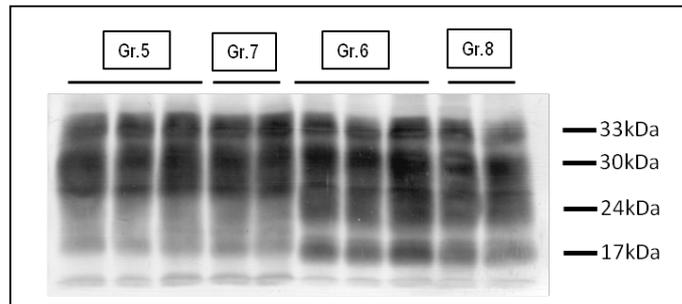


Abbildung 39: Western Blot nach Denaturierung - Beurteilung des *FL-PrP^{sc}* bei den Mäusen nach Infektion zweiter Passage

Dargestellt wird hier der das *FL-PrP^{sc}* nach Denaturierung durch 5xSDS bei H95G-Mäusen (Gr.5, n=3; Gr.6, n = 3) im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypmäusen nach Infektion zweiter Passage (Gr. 7, n= 2; Gr. 8, n=2). Die Untersuchung erfolgte bei allen Mäusen nach Eintritt definierter Zeichen der terminalen Phase. Das *FL-PrP^{sc}* verläuft bei Wildtyp und H95G-Mauslinien bei ca. 33kDa.

IV.4.2 Einfluss der H95G-Mutation auf den zellulären Abbau des PrP^{sc}

Ziel dieser Analyse war es zu überprüfen, ob die H95G-Mutation zu einem modifizierten zellulären Abbau des H95G-PrP^{sc} im Vergleich zu Wildtyp-PrP^{sc} geführt hatte. Im Rahmen des zellulären Abbaus wird das PrP^{sc} zwischen den Aminosäuren 111 und 112 oder an der Aminosäureposition 96 gespalten [92, 95]. Dabei entstehen jeweils C1- (ca. 17 kDa nach Deglykosylierung) und N1-Fragmente bzw. C2- (ca. 21 kDa nach Deglykosylierung) und N1-Fragmente. Im Folgenden wurde der Schwerpunkt auf C1- und C2-Fragmente gelegt. Diese sind nach Deglykosylierung durch die PNGase F besser abgrenzbar.

Ergebnisse

IV.4.2.1 Nach RML-Infektion

Anhand der Ergebnisse (Abbildung 40) erkennt man einen vergleichbaren Bandenverlauf der RML-infizierten Mauslinien bei ca. 42 kDa entsprechend dem β -Aktin, einem physiologisch gleichmäßig exprimiertem Zellprotein, das zur Kontrolle der zellulären Proteinexpression diente. Im Vergleich zu den nicht behandelten Proben der H95G- und Wildtypmaus ist zu erkennen, dass nach dem PNGaseF-Verdau sowohl bei den H95G- als auch bei den Wildtypmäusen ein *Shift* des *FL-PrP^{sc}* von ca. 33 kDa zu ca. 25 kDa entsteht. Bei ca. 21 kDa verläuft bei allen Mäusen eine Bande, am ehesten dem C2-Fragment entsprechend, und bei ca. 17 kDa eine Bande, am ehesten dem C1-Fragment entsprechend. Die zelluläre Spaltung scheint somit nach der H95G-Mutation qualitativ nicht wesentlich beeinträchtigt worden zu sein.

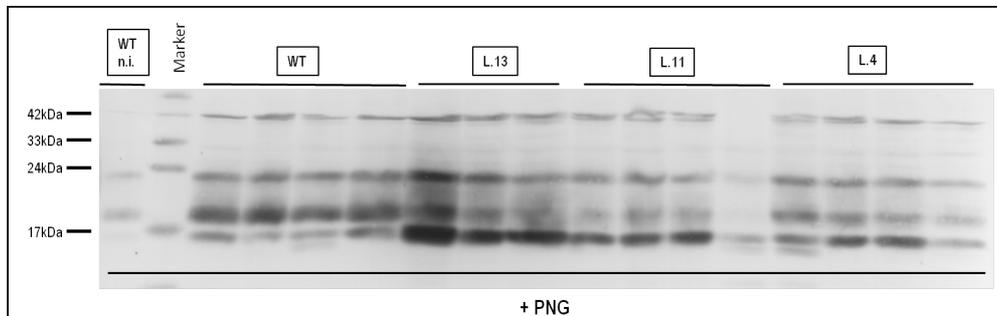


Abbildung 40: Western Blot nach PNGaseF-Verdau - RML-infizierte Mauslinien

Wildtyp (WT, n=4), Linie 13 (L. 13, n=3), Linie 11 (L.11, n=4), Linie 4 (L.4, n=4). Kontrollproben waren nicht infizierte Wildtyp-Mäuse (n.i. WT) vor und nach PNGaseF-Verdau. Die Bande verlaufend bei ca.42 kDa entspricht dem Protein β -Aktin, einem physiologisch gleichmäßig exprimierten Zellprotein. Bei ca. 21 kDa verläuft das C2-Fragment und bei ca. 17 kDa das C1-Fragment nach der zellulären Proteinspaltung.

Zur weiteren Analyse wurden C1- und C2-Fragmente untersucht, die aufgrund unterschiedlicher Spaltungsmechanismen entstehen (s. I.2.3). Bei allen Mäusen wurde das Verhältnis von C1- zu C2-Fragmenten untersucht. Hierzu wurde die jeweilige Intensität der Banden gemessen und ins Verhältnis gesetzt.

Die Auswertung (Abbildung 41) zeigt, dass bei den H95G-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen signifikant mehr C1-Fragmente als C2-Fragmente entstanden sind: Linie 4 ($p=0,013$), Linie 11 ($p=0,039$) und Linie 13 ($p=0,032$).

Ergebnisse

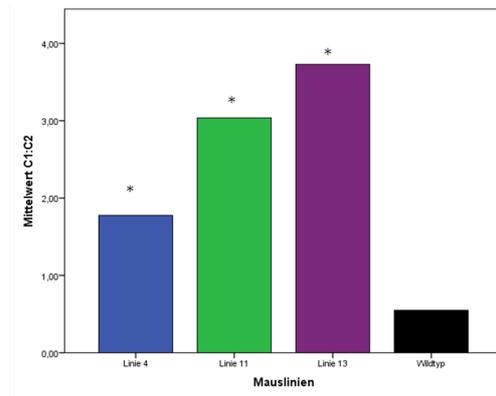


Abbildung 41: Auswertung Western Blot nach PNGaseF-Verdau - RML-infizierte Mauslinien

C1- und C2-Fragmente wurden zur Differenzierung des dominierenden Abbaumechanismus‘ untersucht und verglichen. Hier dargestellt ist das Verhältnis der Intensität der Banden der C1- und C2-Fragmente. Wildtyp (n=4), Linie 4 (n=4), Linie 11 (n=4), Linie 13 (n=3). Es zeigte sich signifikant mehr C1-Anteile bei den H95G-Mäusen nach RML-Infektion im Vergleich zum Wildtyp (* $p < 0,05$).

IV.4.2.2 Nach Infektion zweiter Passage

Anhand des Western Blots (Abbildung 42) kann man einen identischen Verlauf der Banden bei den verschiedenen Mauslinien erkennen.

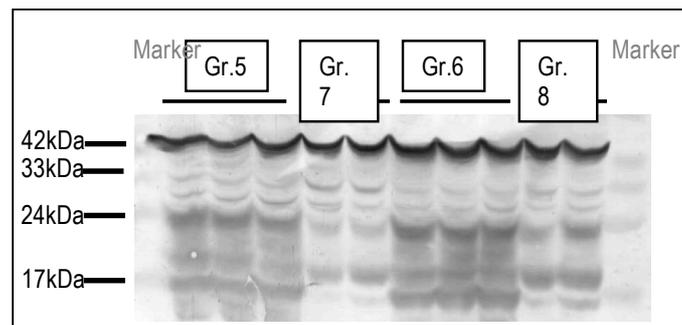


Abbildung 42: Auswertung Western Blot nach PNGaseF-Verdau - Mauslinien nach Infektion zweiter Passage

Wildtyp-Gruppe 7 und –Gruppe 8 (Gr.7 und Gr.8, jeweils n=2), H95G-Gruppe 5 und –Gruppe 6 (Gr.5 und Gr.6, jeweils n=3). Die Bande verlaufend bei ca.42kDa entspricht dem Protein β -Aktin, einem physiologisch gleichmäßig exprimierten Zellprotein. Bei ca. 21 kDa verläuft das C2-Fragment und bei ca. 17 kDa das C1-Fragment.

Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse (Abbildung 43) lässt erkennen, dass bei den H95G-Mäusen der Gruppe 5 bzw. 6 ein deutlich größerer Anteil an C1-Fragmenten dargestellt ist als bei den Wildtypmausgruppen 7 bzw. 8, bei denen der Anteil an C2-Fragmenten dominiert.

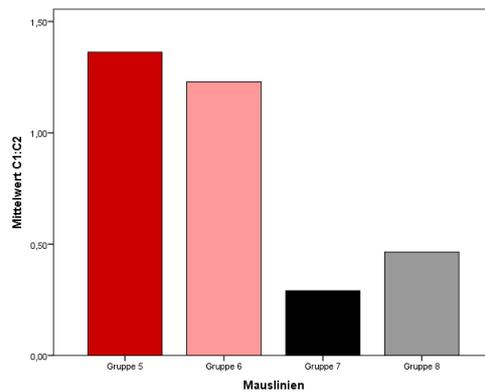


Abbildung 43: Auswertung Western Blot nach PNGaseF-Verdau – Mäuse nach Infektion zweiter Passage

Die Banden entsprechend den C1- und C2-Fragmenten wurden zur Differenzierung des dominierenden Abbaumechanismus analog zu der Auswertung der RML-infizierten Mäuse untersucht und verglichen. Gruppe 5 (n=3), Gruppe 6 (n=3), Gruppe 7 (n=2), Gruppe 8 (n=2). Man erkennt, dass wie auch bei den RML-infizierten H95G-Mäusen das Verhältnis von C1- zu C2-Fragmenten bei den H95G-Mäusen nach Infektion zweiter Passage deutlich höher als bei den Wildtypmäusen ist.

IV.4.3 Analyse des Einflusses der H95G-Mutation auf die Proteaseresistenz des PrP^{sc}

Ein typisches Merkmal von PrP^{sc} im Vergleich zum PrP^c ist die Teilresistenz gegenüber der Proteinase K (PK) [10]: Nach dem Verdau mit der PK ist das PrP^c nicht mehr im Western Blot nachweisbar, während das PrP^{sc} an den Aminosäureresten 82 und 97 [51] gespalten wird und ein c-terminales Fragment nachweisbar bleibt (PrPres). Wie es zu dieser Proteaseresistenz kommt, ist bisher noch unklar. Bei manchen *Strains* zeigten sich Unterschiede in Bezug auf die Proteaseresistenz, von denen angenommen wird, dass sie möglicherweise auf unterschiedliche Konformationen zurückzuführen sind [194].

Ergebnisse

IV.4.3.1 Nach RML-Infektion

Im Western Blot stellte sich insgesamt ein vergleichbarer Bandenverlauf zwischen H95G-Mauslinien und Wildtyp dar (Abbildung 44). Nach der c-terminalen Spaltung ist das Molekulargewicht von PrPres geringer als das des *FL-PrP^{Sc}* (sog. *Band shift*), was hier sowohl bei den H95G-Mäusen als auch bei den Wildtypmäusen der Fall war. Alle Banden verlaufen insgesamt vergleichbar. Bei allen Mäusen sieht man nur noch eine schwache Bande, die bei ca. 33 kDa verläuft und beim Wildtyp dem *FL-PrP^{Sc}* entspricht. Im Vergleich zu den nicht PK-verdauten Kontrollen sieht man den deutlichen *Band Shift* nach PK-Verdau, wodurch angenommen wird, dass der Unterschied im Bandenverlauf durch diesen Verdau entstanden ist.

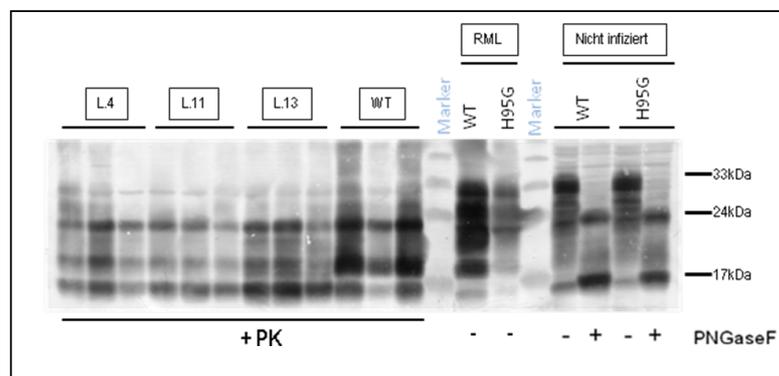


Abbildung 44: Western Blot nach PK-Verdau - RML-infizierte Mauslinien

Gezeigt wird die Einwirkung der Proteinase K (PK) auf das H95G-PrP^{Sc}. Aufgetragen sind die Proben der H95G-Linie 4 (L.4, n=3), H95G-Linie 11 (L.11, n=3), H95G-Linie 13 (L.13, n= 3), Als Kontrolle dienen Wildtypproben nach RML-Infektion (WT) nach PK-Verdau sowie WT- und H95G-Proben ohne PK-Verdau. Als Vergleich zu den infizierten Proben dienen die nicht infizierten WT- und H95G-Proben mit und ohne PNGaseF-Verdau. Es zeigt sich kein wesentlicher Einfluss durch die H95G-Mutation auf die Teilresistenz des PrP^{Sc} durch die PK.

Ergebnisse

IV.4.3.2 Nach Infektion zweiter Passage

Der Western Blot (Abbildung 45) stellt insgesamt keine Unterschiede in Bezug auf den Bandenverlauf nach Proteinase K-Verdau zwischen den Mäusen zweiter Passage nach H95G-Mutation und den Wildtypmäusen dar: Eine schwache, schlecht abgrenzbare Bande ist bei den Mäusen bei ca. 33 kDa zu sehen und entspricht einem geringen Anteil an *FL-PrP^{Sc}*. Im Vergleich zu den nicht PK-verdauten Kontrollen sieht man den deutlichen Shift nach PK-Verdau, wodurch gezeigt wird, dass der Unterschied im Bandenverlauf durch diesen Verdau entstanden ist. Im Vergleich zu den RML-infizierten H95G- und Wildtyp-Kontrollmäusen zeigt sich nach PK-Verdau ein vergleichbarer Bandenverlauf mit dem beschriebenen Banden *Shift*. Wie oben beschrieben sind hier wieder folgende Banden dargestellt: eine Bande bei ca. 20 kDa bis ca. 23 kDa, die am ehesten den Spaltprodukten nach PK-Verdau darstellen. Auch der Vergleich der Proben jeweils nach Denaturierung zwischen Mäusen zweiter Passage und RML-infizierten Mäusen sowie nach PK-Verdau war unauffällig.

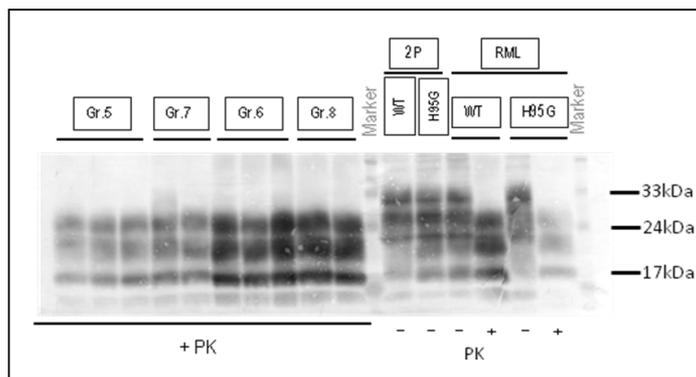


Abbildung 45: Western Blot - Mäuse zweiter Passage nach PK-Verdau

Dargestellt wird die Einwirkung der Proteinase K (PK) auf das H95G-PrP^{Sc} bei den Mäusen zweiter Passage. Aufgetragen sind die Proben der H95G-Gruppe 5 (Gr.5, n=3) und H95G-Gruppe 6 (Gr.6, n=3). Als Kontrolle dienen Wildtypproben der Gruppe 7 (Gr.7, n=2) und der Gruppe 8 (Gr. 8, n=2). Auch hier sieht man, wie auch nach RML-Infektion, dass die Teilresistenz des PrP^{Sc} durch die Proteinase K nicht beeinflusst wurde.

V DISKUSSION

In diesem Teil der Arbeit wird erst der Einfluss der Mutation an der murinen Kupferbindungsstelle Histidin 95 auf den Zeitpunkt des Eintrittes der terminalen Phase nach Prioninfektion dargestellt und diskutiert. Der anschließende Teil befasst sich mit dem Einfluss dieser Mutation auf Merkmale des physiologischen Prionproteins und mögliche, daraus resultierende Konsequenzen nach Infektion. Im dritten Teil wird der Einfluss der H95G-Mutation auf Eigenschaften des Prionproteins im Western Blot diskutiert. Abschließend erfolgt die Analyse des Einflusses der Kupferbindungsstelle am Histidin 95 auf die Ausprägung von typischen neuropathologischen Aspekten nach Prioninfektion. Der letzte Teil beschäftigt sich zudem mit der Relevanz der erhobenen Ergebnisse für das Verständnis der Pathologie bei Prionerkrankungen; auch Parallelen zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen mit teilweise vergleichbaren neuropathologischen Befunden werden gezogen und diskutiert. Aufgrund der Ähnlichkeiten der Erreger von Scrapie und CJD in Bezug auf Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur [51, 168], ist anzunehmen, dass die meisten Ergebnisse aus Tiermodellen auf die menschlichen Prionproteine übertragbar sind.

V.1 Einfluss der Kupferbindung an der Aminosäure Histidin 95 auf die Überlebenszeit nach Infektion

Wie unter IV.2.2 dargestellt, wiesen die Mäuse mit Mutation am Histidin 95 nach Infektion signifikant früher Zeichen der terminalen Krankheitsphase auf als die Wildtyp-Mäuse. Da es zu keinen wesentlichen Unterschieden in Überleben und Symptomatik zwischen H95G- und Wildtypmäusen vor Infektion kam (s. IV.1.1), alle Mäuse einen vergleichbaren genetischen Hintergrund aufwiesen und auf gleiche Weise infiziert wurden, lassen sich Unterschiede in der Länge der Zeit bis zum Eintritt der terminalen Phase am ehesten auf den Einfluss der H95G-Mutation nach Infektion zurückführen. Dieses Ergebnis war bei den H95G-Mäusen nach Infektion zweiter Passage im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls signifikant. Hierdurch konnte ein Einfluss von Spezies-/Strain-Barriere auf die Ergebnisse ausgeschlossen werden und gezeigt werden, dass es durch die H95G-Mutation zu einer stabilen, verkürzten Inkubationszeit im Vergleich zum Wildtyp kommt (Abbildung 46).

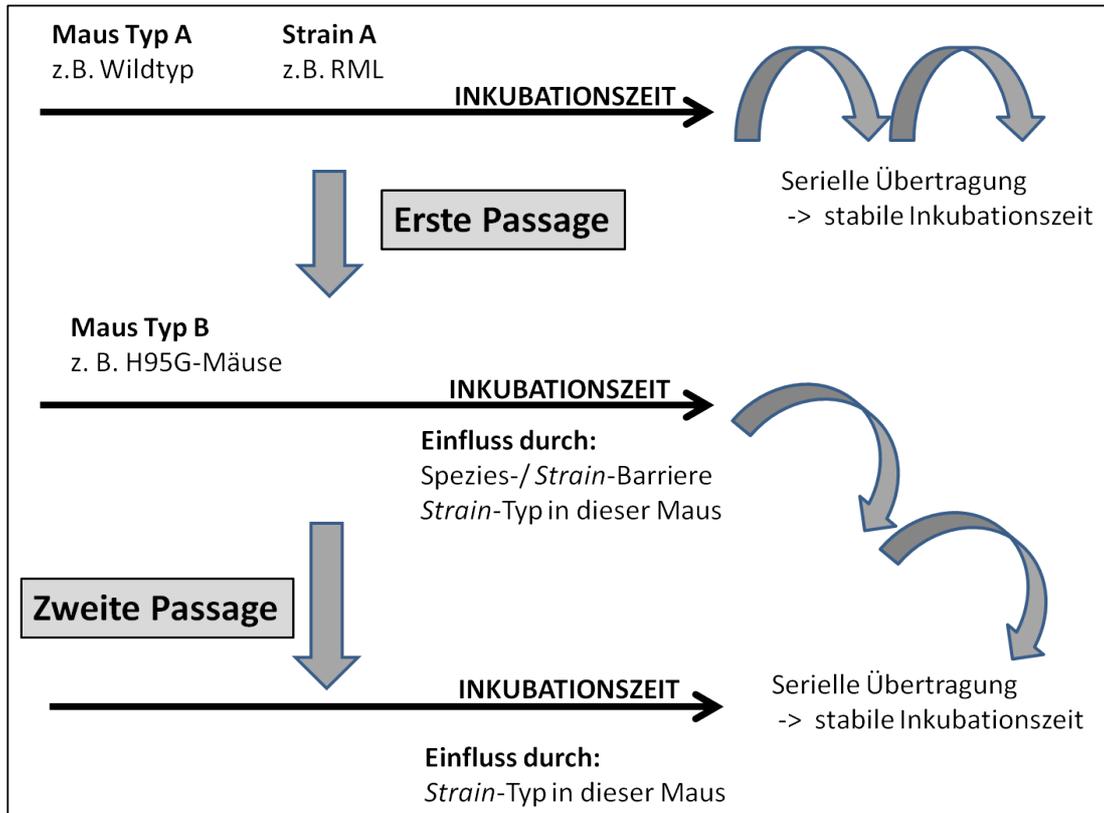


Abbildung 46: Infektion zweiter Passage zur Untersuchung der stabilen Inkubationszeit

Der Beginn dieser terminalen Phase wurde entsprechend vorheriger Arbeiten als zwei der folgenden Symptome an drei aufeinanderfolgenden Tagen definiert: Hypersensitivität, Lethargie, Gewichtsverlust, Kyphose, Tremor oder Ataxie [170]. Da angenommen wird, dass klinische Erkrankung und Tod bei Prionerkrankungen erst durch eine deutlich ausgeprägte neurologische Dysfunktion in kritischen Hirnregionen entstehen [185, 195], sind in Bezug auf die definierten Symptome der terminalen Phase unter anderem die Regionen Hippocampus, Thalamus, Kleinhirn und zerebraler Cortex von besonderem Interesse: Bereits frühe Verhaltensveränderungen im Rahmen von Prionerkrankungen, wie verminderte Nahrungsaufnahme und damit verbundener Gewichtsverlust, scheinen mit Veränderungen im Bereich des Hippocampus zusammen zu hängen [196, 197]. Zu diesem Zeitpunkt sind hier bereits aktivierte Mikroglia und PrP^{Sc}-Ablagerungen nachweisbar. Die beurteilte Hypersensitivität kann als psychische Störung oder als Hyperpathie, ein Zeichen einer zentralen Störung meist im Bereich des Thalamus, gewertet werden. Eine Ataxie kann typischerweise durch Störungen im Bereich des Kleinhirns bedingt und eine Kyphose kann als Zeichen eines muskulären Tonusverlustes von Rücken- und Abdominalmuskulatur, zum Beispiel im Rahmen von Störungen im Bereich des Kleinhirns oder der Basalganglien, gewertet werden. Ebenso kann das Auftreten von Tremor in diesem Kontext sowohl auf Störungen im Bereich des Kleinhirns als auch der Basalganglien zurückgeführt werden. Die Funktionen des Cortex' sind vielfältig, in diesem Zusammenhang könnte jedoch unter anderem die Funktion der

Diskussion

Bewegungsplanung hervorgehoben werden. Tatsächlich sind diese Regionen bereits mehrfach in der Literatur als betroffene Regionen nach Prioninfektion beschrieben worden.

Auffällig ist die Tatsache, dass es sich bei den Regionen Kleinhirn, Hippocampus und Cortex um Hirnregionen handelt, die im Vergleich zu anderen am meisten Kupfer enthalten [186], einem essentiellen Metall sowohl bei Tieren als auch bei Menschen, die somit für Veränderungen in Bezug auf die Kupfer besonders empfindlich sein könnten.

Bei Eintreten dieser terminalen Phase nach Infektion wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, um eine Objektivierung der Ergebnisse im gleichen Krankheitsstadium für die weiteren Untersuchungen zu gewährleisten. Es wird im Folgenden der Einfluss der Mutation an der Kupferbindungsstelle am Histidin 95 auf Eigenschaften des PrP im Western Blot sowie neuropathologische Veränderungen in verschiedenen Hirnregionen untersucht und als Ursache für die kürzere Überlebenszeit der H95G-Mäuse nach Infektion diskutiert.

V.2 Einfluss der H95G-Mutation auf physiologisch und pathologisch relevante Sequenzen

V.2.1 Untersuchung des *Full-Length-PrP^c*

Kupfer kommt bisher insgesamt eine eher widersprüchliche Funktion in Bezug auf die Struktur des PrP^c zu: Manche Autoren beschreiben eine Zunahme der Bildung von β -Faltblattanteilen durch Kupferbindung in der Sequenz 90-120 [162] sowie in der Oktarepeatsequenz [198]. Andere wiederum beschreiben eine protektive Funktion der Kupferbindung sowohl an die Oktarepeatregion [199] als auch an das Histidin 95, insbesondere da letztere Bindung nicht mit der Bildung von β -Faltblatt in linksgängigen Helices vereinbar zu sein scheint [167] – ein fundamentaler Teil der Struktur des PrP^{sc} [200].

Wie unter IV.1.3.1 dargestellt, zeigten sich nach der H95G-Mutation keine wesentlichen strukturellen Veränderungen an den jeweiligen Bindungsstellen der verwendeten Primärantikörper (Abbildung 47), die die weiteren Ergebnisse dieser Arbeit beeinflussen könnten. Insbesondere war dies der Fall in der Aminosäuresequenz 90-120 [77], in der wahrscheinlich die Konversion nach Infektion stattfindet: Nach Verwendung des Primärantikörpers RA3153 (Aminosäuresequenz 90-103 [175]) zeigt sich kein wesentlicher Unterschied in Bezug auf das *FL-PrP^c*, was vermuten lässt, dass durch die veränderte Kupferbindung am Histidin 95 und der möglichen, oben bereits beschriebenen protektiven Wirkung an dieser Stelle keine Bildung von β -Faltblattanteilen vor Infektion induziert wurde. Eine vereinfachte oder beschleunigte Konversion nach Infektion durch die Mutation ist jedoch nicht auszuschließen.

Diskussion

Insbesondere auch die weiteren kupferbindenden Sequenzen Oktarepeatsequenz und das Histidin 110 wurden durch die H95G-Mutation strukturell nicht wesentlich beeinflusst: Das *FL*-H95G-PrP^c zeigte keine Unterschiede im Verlauf des H95G-*FL*-PrP^c im Western Blot nach Verwendung von den Primär-Antikörpern 3B5 (Bindung an die murine und menschliche Aminosäuresequenz 60-91, entsprechend der Oktarepeatsequenz [177, 178]) und 4H11 (Bindung an die C-terminale Domäne von PrP^c und PrP^{sc} [179]) im Vergleich zum Wildtyp-*FL*-PrP^c. Interessant wäre eine weiterführende Untersuchung eines möglichen Einflusses durch die Mutation auf diese weiteren kupferbindenden Sequenzen, zum Beispiel bezüglich der Affinität zu Kupfer und anderer Qualitäten der Kupferbindung.

Der Antikörper 3F4 (menschliche Aminosäuresequenz 108-111 [176]) bindet wie erwartet nicht an das murine PrP^c und H95G-PrP^c.

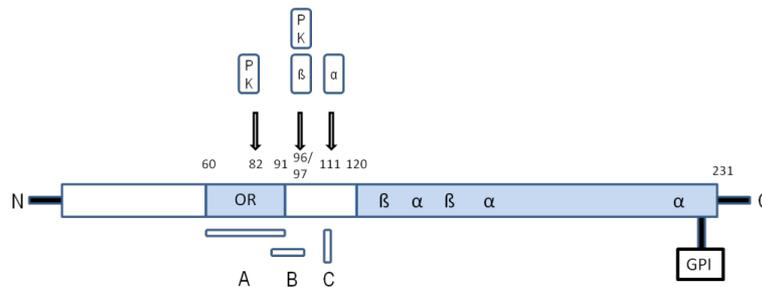


Abbildung 47: Antikörperbindungsstellen und wichtige physiologische und PK-Spaltstellen des murinen PrP^c und PrP^{sc}

Bindungsstelle A: 3B5-Antikörper; B: RA3153-Antikörper; C: 3F4-Antikörper. Aminosäure 82 und 97: PK-Spaltungsstellen; Aminosäure 96: β-Spaltungsstelle; Aminosäure 111: α-Spaltungsstelle. OR: Oktarepeat-Region.

V.2.2 Wahl des geeigneten Primär-Antikörpers und Untersuchung der Spaltprodukte

Um die Aspekte zelluläre Konzentration des *Full-length*-PrP^c (*FL*-PrP^c), eine gesteigerte oder verminderte Proteaseresistenz oder einen modifizierten zellulären Abbau adäquat analysieren zu können, muss der eingesetzte Primär-Antikörper trotz der Mutation das *FL*-PrP bzw. die verschiedenen Spaltprodukte binden.

Anhand der Ergebnisse zeigt sich, dass der Antikörper 4H11 vergleichbar das *FL*-H95G- und -Wildtyp-PrP^c bindet, sodass dieser Standardantikörper für die Untersuchungen des *FL*-PrP eingesetzt werden kann.

Wie sieht es jedoch mit den zellulären Spaltprodukten (C1- und C2-Fragmenten) aus? Wie bereits in der Literatur

Diskussion

beschrieben, bindet der Antikörper 4H11 an die C-terminale Region sowohl des murinen PrP^c als auch des murinen PrP^{sc} [179, 201] - diese entspricht der Aminosäuresequenz 113-126 [68]. Der Antikörper 4H11 bindet somit auch das nach der α -Spaltung entstehende C1-Fragment (C-terminal der AS 111 [92, 95]), das im Western Blot bei ca. 17 kDa verläuft und das C2-Fragment, das nach Spaltung an der Aminosäure 96 nach der zellulären β -Spaltung [92-95] entsteht (ca. 21 kDa im Western Blot). Diese Ergebnisse zeigen somit weiterhin auch, dass die zelluläre Spaltung des Prionproteins, die bekanntlich zum Teil von der Kupferbindung beeinflusst wird [93, 94], qualitativ nicht wesentlich durch die Mutation beeinflusst wurde. Die quantitativen Untersuchungen werden nachfolgend diskutiert.

Weiterhin kann man durch die gezeigten Ergebnisse und aufgrund der Bindung der C-terminalen Domäne auch davon ausgehen, dass auch der 4H11-Antikörper zum Nachweis der Proteasespaltprodukte eingesetzt werden kann.

Zusammenfassend kann der 4H11-Antikörper somit verwendet werden, um adäquat das murine *FL*-PrP^c und *FL*-H95G-PrP^c sowie die zellulären Spaltprodukte C1- und C2-Fragmente und die Proteasespaltprodukte des Wildtyp- und H95G-Proteins vor bzw. nach Infektion darzustellen.

V.3 Einfluss der Kupferbindungsstelle am Histidin 95 auf die zelluläre Konzentration und Proteaseresistenz des Prionproteins

V.3.1 Einfluss der Kupferbindungsstelle Histidin 95 auf die zelluläre PrP^c- und PrP^{sc}-Konzentration

Die unter IV.1.3.2 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das Verhältnis von *FL*-PrP^c zu β -Aktin in den Mäusen der H95G-Mäuse minimal höher ist als bei den Wildtypmäusen. Das Protein β -Aktin entspricht einem hochkonservierten und physiologisch gleichmäßig exprimierten zellulären Protein, bei dessen Regulation bisher kein Zusammenhang mit dem Prionprotein oder mit Kupfer beschrieben wurde. Somit dient das Protein β -Aktin in dieser Arbeit als ein geeigneter Parameter zum Vergleich für die allgemeine zelluläre Proteinsynthese. Dieses Ergebnis zeigt, dass nach der H95G-Mutation mehr Prionprotein bereits vor Infektion vorhanden war. Obwohl sie vor Infektion zu keinen wesentlichen klinischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp führte, könnte die höhere Konzentration von PrP ursächlich für die Pathologie und das frühere Eintreten der terminalen Phase nach Infektion sein. Allerdings erscheint der Unterschied in der Expression so gering, dass hiermit der Unterschied in der Inkubationszeit nicht vollständig erklärt werden kann.

Diskussion

V.3.2 Einfluss der Kupferbindungsstelle Histidin 95 auf den zellulären Abbau des Prionproteins

Der Abbau des PrP^{sc} spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle im Rahmen der Pathologie. Dies ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise ist die Unfähigkeit, das fehlgefaltete Protein abzubauen, wesentlich an der Ausbildung von neuropathologischen Veränderungen wie Plaquetbildung und Vakuolisierung und damit an der Klinik nach Infektion beteiligt.

Im Rahmen des zellulären Metabolismus sind zwei Haupt-Abbaumechanismen des PrP bekannt: die α -Spaltung an der Aminosäure 110 und die β -Spaltung an der Aminosäure 96. Wie bereits beschrieben, entstehen die C1- (ca. 17 kDa) und N1-Fragmente nach der α -Spaltung, die C2- (ca. 21 kDa) und N2-Fragmente nach der β -Spaltung. Beide Banden sind nach Deglykosylierung besser abgrenzbar. Die unter IV.1.3.4 vorgelegten Ergebnisse nach Deglykosylierung stellen dar, dass bei den H95G-Mäusen vor Infektion der Bandenverlauf insgesamt dem der Wildtypmäuse entspricht und es somit zu keiner wesentlichen qualitativen Änderung des zellulären α - und β -Abbaus gekommen ist.

Die Auswertung der Ausprägung der jeweiligen zellulären Abbauprodukte nach Infektion zeigt, dass bei den H95G-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen signifikant mehr C1-Fragmente als C2-Fragmente entstanden sind (IV.4.2). Die Mutation an der Kupferbindungsstelle Histidin 95 scheint entsprechend die α -Spaltung zu fördern oder die β -Spaltung im PrP^{sc} zu stören.

Dass Kupfer sich auf den zellulären Abbau des Prionproteins auswirkt, ist bekannt: C1-Fragmente konnten auch in Zellen nachgewiesen werden, in welchen das PrP^c aufgrund verschiedener Mutationen nicht einer Kupfer-stimulierten Endozytose unterliegen kann [93]. Im Gegensatz dazu wurde nachgewiesen, dass insbesondere die β -Spaltung durch Kupfer induziert werden kann [93, 202]. Ob eine bestimmte Kupferbindungsstelle oder möglicherweise alle gemeinsam dabei einen Einfluss auf die β -Spaltung ausüben, ist bisher noch unklar. Dass die Kupferbindungsstelle am Histidin 95 hier eine Rolle spielt, wäre mit den hier vorgelegten Ergebnissen gut vereinbar. Diese Veränderung kann somit möglicherweise bereits vor Infektion entstanden sein, allerdings konnte dies aufgrund der geringen Anzahl an nicht infizierten Mäusen nicht vertieft werden.

Inwiefern die Änderung des zellulären Abbaus des PrP^{sc} sich auf das frühere Eintreten der terminalen Phase ausgewirkt haben könnte, ist nicht eindeutig. Eine Möglichkeit besteht darin, dass es durch die Mutation zu einer Störung des β -Abbaumechanismus und somit zu einem insgesamt verminderten Abbau des PrP^c kam, und dies zu vermehrtem Konversionssubstrat führte, wie oben bereits beschrieben. Ebenfalls möglich wäre demzufolge ein verminderter Abbau des PrP^{sc} nach Infektion, was eventuell zu den früher eintretenden Symptomen geführt hat.

Eventuell ist die terminale Phase aber auch mit den unterschiedlichen Funktionen der entstehenden Fragmente nach dem Abbau zu erklären. Bisher wurde in erkrankten Hirnpräparaten hauptsächlich das C2-Fragment nachgewiesen [100]. Diskutiert wurde demnach, ob der hauptsächlichliche β -Abbau auf Konformationsunterschiede zwischen PrP^{sc} und PrP^c zurückzuführen ist, ob es einem zellulären Schutzmechanismus entspricht oder ob im

Diskussion

Gegenteil das C2-Fragment selbst eine pathologische Funktion besitzt. Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen eine Reevaluierung dieser Theorien, indem sie zeigen, dass hier keine Korrelation zwischen klinischer Erkrankung und C2-Fragmenten nachzuweisen ist. Lässt sich hingegen ein Zusammenhang zwischen β -Abbau und früher terminaler Phase herstellen?

Die C1- und N1-Fragmente modulieren wahrscheinlich den p53-abhängigen Zelltod: Während das N1-Fragment eher neuroprotektiv zu wirken scheint, induziert das C1-Fragment den Zelltod [97]. Ein vermehrter Zelltod, insbesondere in kritischen Hirnregionen, könnte eine Erklärung für die früher eintretende terminale Phase bei den H95G-Mäusen nach Infektion darstellen. Da das N1-Fragment hier die Zelle gegenüber dem neurotoxischen Effekt des C1-Fragmentes zu schützen scheint [98], wäre eine gezielte Untersuchung dieses Fragmentes nach der Mutation von Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Untersuchung von C1- und C2-Fragmenten gelegt, die bisher in der Literatur am meisten im Fokus der Untersuchungen standen. Unklar bliebe dennoch, weshalb sich dieser Aspekt erst nach Infektion klinisch und neuropathologisch äußern würde.

V.3.3 Einfluss der Kupferbindungsstelle Histidin 95 auf die Proteaseresistenz

Das PrP^{sc} ist im Gegensatz zum physiologischen PrP^c teilweise proteaseresistent. Nach Proteinase K (PK)-Verdau entsteht das sog. PrP27-30, das als infektiöser und pathogener Anteil des PrP^{sc} angesehen wird [203]. Die H95G-Mutation entsteht nicht weit von einer der Hauptschnittstellen: Die Hauptschnittstellen der PK befinden sich an den Aminosäureresten 82 und 97 [51]. Es wird die Theorie vertreten, dass Unterschiede in der Proteaseteilresistenz auf unterschiedliche Konformationen zurückzuführen seien [194] und von extrazellulärem Kupfer moduliert werden: Es wurde gezeigt, dass kupferarmes Milieu unterschiedlicher Genese reversibel die Sensitivität gegenüber dem Verdau durch Proteinase K steigert [152, 153]. Dies wird allerdings kontrovers gesehen, da manche Autoren annehmen, dass dieser Effekt direkt durch die Wirkung von Kupfer auf die Proteinase K entsteht [204]. Um einen möglichen Einfluss durch die H95G-Mutation auf die Proteaseresistenz und möglicherweise indirekt eine Konformationsänderung darzustellen, wurden hier alle zu untersuchenden Proben mit 100 μ g/ml Lysat PK für 1 Stunde bei 37°C behandelt.

Das Bandenmuster im Western Blot war bei H95G-Mäusen und Wildtypmäusen - sowohl nach RML-Infektion als auch im Rahmen der zweiten Passage - nach PK-Verdau vergleichbar (IV.4.3). Zur genaueren Abgrenzung der einzelnen Banden, da diese bekanntlich durch das Glykosylierungsmuster beeinflusst werden, erfolgte orientierend bei den RML-Mäusen ein Doppelverdau mit PK und PNGaseF zur Kontrolle. Auch hier zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen H95G-Maus und Wildtyp. Ein Einfluss auf die Proteaseteilresistenz durch die H95G-Mutation konnte somit unter diesen Voraussetzungen und unter Einsetzen des Standardprotokolls ausgeschlossen werden.

V.4 Einfluss der Kupferbindungsstelle am Histidin 95 auf neuropathologische Veränderungen nach Infektion

Der Pathomechanismus sowie die pathologische Relevanz der verschiedenen neuropathologischen Veränderungen nach Prioninfektion sind bis heute noch nicht vollständig verstanden. Möglicherweise besteht hier dennoch eine Korrelation zwischen der Neuropathologie und der frühen terminalen Phase bei den H95G-Mäusen. In der Liniencharakterisierung vor Infektion wurde gezeigt, dass keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen H95G-Mauslinien und der Wildtyplinie in den histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen bezüglich dieser Aspekte bestanden (IV.1.2). Die im Folgenden beschriebenen Unterschiede sind entsprechend erst im Rahmen der Infektion entstanden.

In diesem Teil der Arbeit werden erst der Einfluss der Kupferbindungsstelle am Histidin 95 auf die spongiformen Veränderungen, dann auf die Entstehung der PrP^{sc}-Ablagerungen – in synaptischer und plaqueartiger Form - und anschließend auf die reaktive Astrozytose zum Zeitpunkt des Eintritts der terminalen Phase dargestellt und diskutiert.

V.4.1 Einfluss auf spongiforme Veränderungen

Spongiforme Veränderungen des Gewebes sind ein Überbegriff für Hohlraumbildungen, die vor allem im Neuropil vorkommen und einem typischen Merkmal unbekannter Genese bei Prionerkrankungen entsprechen [41, 205].

Es stellte sich insgesamt eine signifikant geringere Ausprägung der spongiformen Veränderungen nach RML-Infektion bei den H95G-Linien im Vergleich zu den Wildtypmäusen dar, die in fast allen Hirnregionen – sowohl weißer als auch grauer Substanz – nachzuweisen war (IV.3.2.1). Diese Ergebnisse waren bei den Mäusen zweiter Passage ebenfalls in den meisten Regionen signifikant reproduzierbar.

Man weiß, dass die Ausprägung von spongiformen Veränderungen und die zeitliche Progredienz vom genetischen Hintergrund der Versuchstiere sowie vom inokulierten *Scrapie*-Stamm abhängen [185, 206]. Aufgrund des vergleichbaren genetischen Hintergrundes sowie der gleichen Infektionsvoraussetzungen bei den Tieren dieser Arbeit sind Unterschiede diesbezüglich jedoch äußerst unwahrscheinlich.

Ein Zusammenhang von spongiformen Veränderungen und Kupfer wurde bisher nicht beschrieben. Aufgrund verschiedener gemeinsamer Merkmale mit weiteren neurodegenerativen Erkrankungen, lassen sich hier eventuell Erklärungen für diesen Aspekt ableiten? Auffällig ist zum Beispiel, dass es im Rahmen von anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. M. Alzheimer, M. Pick oder der Amyotrophen Lateralsklerose, zu einer vermehrten Vakuolisierung mit neuronalem Zellverlust kommen kann [41], die im Endstadium – dem Status spongiosus – Ähnlichkeiten mit den Veränderungen bei fortgeschrittenen Prionerkrankungen aufweist [67]. Möglicherweise bestehen hier also Parallelen. Unter anderem wurde bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) eine Verbindung zwischen Vakuolisierung und Kupfer hergestellt. Eine erhöhte Konzentration an freiem Kupfer

Diskussion

fürte bei Mutationen der Cu/Zn-Superoxiddismutase zu neuronalem Zellverlust sowie zu Vakuolenbildung aufgrund von Mitochondriendegeneration [207]. Hier wurde die vermehrte Vakuolenbildung somit insbesondere durch gesteigerten oxidativen Stress, verursacht durch das freie Kupfer, erklärt. Bei vergleichbarem Pathomechanismus bei Prionerkrankungen wäre im Rahmen dieser Arbeit am ehesten eine deutlich höhere Ausprägung an spongiformen Veränderungen durch eine mögliche höhere Konzentration an ungebundenem Kupfer durch die gestörte Kupferbindung zu erwarten. So ist zu vermuten, dass es entweder zu keiner erhöhten Konzentration an freiem Kupfer aufgrund der Mutation gekommen ist oder die Bildung der spongiformen Veränderungen bei Prionerkrankungen nicht direkt mit freiem Kupfer oder damit verbundenem oxidativem Stress korreliert, sondern als direkte Reaktion auf das PrP^{sc} entsteht.

Die Entstehung der spongiformen Veränderungen bei Prionerkrankungen wurde unter anderem im Zusammenhang mit einer gehäuften Anzahl an autophagen Vakuolen bzw. Autophagosomen beschrieben [208, 209]. Die Autophagie ist ein wichtiger physiologischer Bestandteil des Gleichgewichtes zwischen Biogenese und Abbau verschiedener zellulärer Strukturen. Die spongiformen Veränderungen könnten somit Ausdruck des Abbaus des pathologischen Prionoproteins sein [210]. Ein örtlicher Zusammenhang zwischen PrP^{sc} und Autophagosomen wurde auch tatsächlich nachgewiesen [211]. Dieser Theorie zufolge wäre eine mögliche Erklärung für die verminderten spongiformen Veränderungen nach H95G-Mutation eine verminderte Bildung von Autophagosomen - z.B. durch eine gestörte PrP-Endozytose nach H95G-Mutation oder einen insgesamt gestörten Abbau, wie bereits dargestellt. Ein gestörter Abbau des PrP^{sc} in Zusammenhang mit der höheren Konzentration an zellulärem PrP^{sc} könnte zu den im Folgenden diskutierten Ergebnissen geführt haben.

V.4.2 Einfluss auf plaqueartige PrP^{sc}-Ablagerungen

Plaqueartige PrP^{sc}-Ablagerungen sind ein typisches Merkmal von Prionerkrankungen. Ihre Funktion und der Pathomechanismus, der zu ihrer Bildung führt, sind bisher jedoch noch nicht vollständig verstanden.

Nach der Mutation der Kupferbindungsstelle am Histidin 95 zeigten sich in den meisten Hirnregionen signifikant stärker ausgeprägte plaqueartige PrP^{sc}-Ablagerungen nach RML-Infektion, wie unter IV.3.2.3 dargestellt. Dieses Ergebnis war auch bei den H95G-Gruppen zweiter Passage im Vergleich zur jeweiligen Wildtypgruppe in den meisten beurteilten Hirnregionen signifikant reproduzierbar.

Es stellt sich die Frage, wie es also bei den H95G-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen zu dieser deutlich stärker ausgeprägten Bildung von plaqueartigen PrP^{sc}-Ablagerungen nach Infektion kommt. Da es vor Infektion zu keinen vermehrten Ablagerungen von H95G-PrP^c kommt, ist es anzunehmen, dass sich der Verlust der Kupferbindungsstelle am Histidin 95 erst nach Infektion auf diesen Aspekt auswirkt. Möglich sind hier eine verstärkte Bildung von PrP^{sc} sowie ein verminderter Abbau des PrP^{sc} auf zellulärer Ebene und/oder ein gestörter Abbau der extrazellulären PrP^{sc}-Ablagerungen.

Diskussion

Eine erhöhte zelluläre Konzentration mit möglicherweise vermehrtem Konversionssubstrat sowie der veränderte Proteinabbau wurden bereits diskutiert. Eine weitere Erklärung für die vermehrte Bildung dieser Ablagerungen wäre eine schützende Wirkung der Kupferbindung am Histidin 95 bezüglich einer Konformationsänderung des PrP^c nach Kontakt mit PrP^{sc}, die sog. Konversion zu PrP^{sc}. Wie bereits oben beschrieben, wurde gezeigt, dass die Kupferbindung am murinen Histidin 95 wahrscheinlich eine protektive Wirkung vor der PrP^{sc}-Konversion hat, da sie nicht mit der Bildung von β -Faltblatt-Anteilen in den linksgängigen Helices kompatibel zu sein scheint [167]. Möglicherweise wurde also durch die H95G-Mutation die Konversion zu PrP^{sc} erleichtert bzw. beschleunigt, was nachfolgend zu mehr extrazellulären Ablagerungen geführt hat. Diese Theorien sind gut vereinbar mit der Tatsache, dass die Bildung deutlich ausgeprägter plaqueartige PrP^{sc}-Ablagerungen fast alle Hirnregionen nach H95G-Mutation betrifft.

Die vermehrte Ausprägung von plaqueartigen H95G-PrP^{sc}-Ablagerungen könnte auch mit einer erschwerten Phagozytose von Zellen mit H95G-PrP^{sc} bzw. von den plaqueartigen Ablagerungen einhergehen. Die Phagozytose von Fremdkörpern und Zellfragmenten, Antigenpräsentation und die Eliminierung von apoptotischen Neuronen werden insbesondere den Mikroglia zugeschrieben, deren erhöhte Aktivität im Zusammenhang mit PrP-Fibrillen beschrieben wurde [212]. Sowohl die ausgeprägten plaqueartigen PrP^{sc}-Ablagerungen als auch eine reaktive gliale Aktivität können hier ursächlich für die frühe terminale Phase der H95G-Mäuse nach Infektion sein:

Es wurde gezeigt, dass die PrP^{sc}-Ablagerungen erst in späteren Krankheitsstadien entstehen [213] und somit den Beginn der terminalen Phase begünstigen könnten. Allgemein wirkt sich die Akkumulierung von PrP^{sc} über einen noch nicht ganz verstandenen Mechanismus neurotoxisch aus und führt zu Neurodegeneration [58]. Bei der Bildung von Amyloid entsteht zudem noch eine toxische Wirkung durch eine vermehrte Porenbildung an angrenzende Zellmembranen [214], was wiederum die Apoptose der Zelle induzieren und sich bei entsprechender Ausprägung in kritischen Hirnregionen durch die beschriebenen Symptome der terminalen Phase äußern könnte.

Die neurotoxische Wirkung der plaqueartigen PrP^{sc}-Ablagerungen wäre auch indirekt durch eine überschießende gliale Reaktion zu erklären. Möglicherweise hat die H95G-Mutation durch den Verlust dieser Kupferbindungsstelle zu einer deutlich ausgeprägteren Bildung an PrP^{sc} aus PrP^c geführt, die sich wiederum durch vermehrte Bildung von plaqueartigen Ablagerungen in einer vermehrten glialen Aktivität geäußert hat. Die daraus resultierende mikrogliale Überproduktion von immunaktiven Zytokinen, insbesondere der Zytokine IL-1 β und IL-6 [215], kann bekanntlich zu neuronalem Schaden führen. Insbesondere IL-1 β wurde eine Rolle bei der Induktion der Apoptose neuronaler Zellen auch im Rahmen verschiedener weiterer Erkrankungen, zum Beispiel viraler Genese, zugeschrieben [216, 217].

Die klinische Wirkung der plaqueartigen Ablagerungen ist jedoch kontrovers: es wird angenommen, dass die Bildung von plaqueartigen Ablagerungen letztlich der Abgrenzung von pathologischem PrP^{sc} dienen könnte [218]. Dies wird unter anderem durch die Tatsache gestützt, dass mutierte Mäuse, die PrP ohne GPI-Anker

Diskussion

produzieren, zwar deutlich plaque-ähnliche Ablagerungen entwickelten – jedoch keine entsprechende Symptomatik und eine deutlich geringer ausgeprägte Neurodegeneration als die Wildtypkontrolle [219].

Aufgrund dieser und im Folgenden näher dargestellten Ergebnisse wird angenommen, dass die Symptomatik nach Prioninfektion vor allem auf die synaptischen Ablagerungen zurückzuführen ist.

V.4.3 Einfluss auf die synaptische Akkumulierung von PrP^{sc}

Die synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen sind möglicherweise ursächlich für die Neurodegeneration im Rahmen von Prionerkrankungen [48]. Eine positive Korrelation mit neuronalem Zellverlust wurde beschrieben [60], allerdings scheint der Synapsenverlust dem neuronalen Verlust voranzugehen [220]. Über die Entstehung der synaptischen Ablagerungen ist aktuell jedoch noch nicht viel bekannt.

Bei der Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit unter IV.3.2.4 fällt auf, dass die Ausprägung der synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen nach Mutation der Kupferbindungsstelle am Histidin 95 und RML-Infektion bei den drei H96G-Mauslinien insgesamt vergleichbar je nach Hirnregion ist. Auch bei den H95G-Mäusen zeigten sich nach Infektion zweiter Passage vergleichbare Ausprägungen. Die Wirkung der veränderten Kupferbindung an der Aminosäure Histidin 95 scheint bezüglich dieser Ablagerungsform somit relativ einheitlich gewesen zu sein.

Auffällig ist, dass die Ausprägung der synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen signifikant geringer in den Cortexarealen ausfiel als bei den Wildtypmäusen, wo diese wie erwartet ausgeprägt waren [50]. Vereinzelt zeigte sich dieses signifikante Ergebnis bei den H95G-Mäusen auch in den Colliculi superiores, im Hypothalamus und im Hippocampus. Im Gegenzug dazu waren die synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen signifikant stärker ausgeprägt im Kleinhirn (sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz) sowie in der Medulla oblongata und im Tegmentum vorzufinden. Bei der Untersuchung dieser Ergebnisse nach Infektion zweiter Passage zeigten sich bei den H95G-Mäusen der Gruppe 5 im Vergleich zu den Wildtypmäusen der Gruppe 7 signifikant geringer ausgeprägte synaptische PrP^{sc}-Ablagerungen in den Regionen Colliculi superiores und Pyramidenbahn. Synaptische PrP^{sc}-Ablagerungen sind bei den H95G-Mäusen der Gruppe 6 in den Regionen medialer Thalamus, Septum, Hippocampus und Kortex auf Höhe des medialen Thalamus signifikant geringer ausgeprägt als den bei infizierten Wildtypmäusen der Gruppe 8.

Die Ergebnisse nach RML-Infektion sind gut mit bisherigen Ergebnissen vereinbar, in welchen beschrieben wurde, dass insbesondere das Kleinhirn besonders anfällig für synaptische PrP^{sc}-Ablagerungen nach Infektion zu sein scheint [48]. Tatsächlich könnte ein erhöhter neuronaler Zellverlust im Kleinhirn ursächlich für eine früh auftretende Ataxie nach H95G-Mutation und Infektion sein. Wie bereits oben dargestellt, könnte auch eine Kyphose kann als Zeichen eines muskulären Tonusverlustes von Rücken- und Abdominalmuskulatur, zum Beispiel im Rahmen von Störungen im Bereich des Kleinhirns oder auch der Basalganglien, gewertet werden. Ebenso kann das Auftreten von Tremor in diesem Kontext sowohl auf Störungen im Bereich des Kleinhirns als

Diskussion

auch der Basalganglien zurückgeführt werden. Dies könnte somit das frühe Eintreten verschiedener Kriterien des Beginns der terminalen Phase (s.o.) erklären.

Was könnte der Grund für die Prädilektion dieser Veränderungen im Kleinhirn im Rahmen von Prionerkrankungen sein und inwiefern kann die H95G-Mutation hier die Ausbildung dieser Ablagerungen fördern?

Bekanntlich kommt es nach Konversion zu PrP^{sc} zu vermehrtem Zelltod. Die Toxizität des PrP^{sc} im Bereich des Kleinhirns wurde insbesondere der Aktivierung der glutamaterger N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA-)Rezeptoren zugeschrieben [221] und konnte auch durch NMDA-Rezeptor-Inhibitoren gemindert werden [222]. Bei Überaktivität des NMDA-Rezeptors wird die zytotoxische Wirkung vor allem durch den damit verbundenen vermehrten zellulären Calcium-Einstrom mit entsprechenden zytotoxischen Konsequenzen erklärt. Aus diesem Grund ist eine feinmaschige Regulation der physiologischen Aktivität wichtig - diese Funktion wurde unter anderem dem PrP^c zugeschrieben [119, 223]. Ob der Zelltod nach Konversion durch eine Störung bzw. durch den Verlust einer regulierenden Funktion des PrP^c oder durch eine direkte Wirkung PrP^{sc} (z.B. durch Stimulation der NMDA-Rezeptoren) bedingt wird, ist nicht bekannt.

Ein Einfluss durch die H95G-Mutation lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass interessanterweise Kupfer diese regulierende Funktion des PrP^c zu modulieren scheint [223]: Durch Kupferchelatoren zeigte sich eine persistierende Aktivität ohne Desensibilisierung, die durch Hinzufügen von Kupfer jedoch wieder gebremst werden konnte [223]. Weiterhin scheinen die Ergebnisse nach Kupferchelation bei den Wildtypmäusen vergleichbar zu denen der *Knock-out*-Mäusen zu sein. Die Wirkung der Kupferchelatoren zeigte hingegen keinen additiven Einfluss bei *Knock-out*-Mäusen, sodass die Autoren annehmen, dass die Wirkung der Kupferchelatoren am ehesten am PrP^c entstand [223]. Bisher wurde diesbezüglich jedoch nicht der Einfluss der einzelnen Kupferbindungsstellen untersucht. Eine Beteiligung der Kupferbindungsstelle am Histidin 95 ist in Zusammenschau der Ergebnisse gut möglich. Möglicherweise führte die H95G-Mutation wie bei den PrP-*Knock-out*-Mäusen oder nach Gabe von Kupferchelation zu einem solchen Funktionsverlust und den beschriebenen Veränderungen an den NMDA-Rezeptoren [223]. Dass diese Veränderungen klinisch vor Infektion stumm bleiben wäre kompatibel mit den beschriebenen Befunden bei *Knock-out*-Mäusen [101] und lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die modulierende Funktion am NMDA-Rezeptor durch die Kupferbindung nicht ausschließlich dem Prionprotein zugeschrieben wird [223].

Dass dieser Funktionsverlust nach Infektion symptomatisch wird könnte daran liegen, dass die Prioninfektion eventuell zu einem plötzlichen Verlust führt, der nicht mehr ausgeglichen werden kann.

Im Kortex sind jedoch bekanntlich ebenfalls glutamaterge Neurone vorhanden. Damit stellt sich die Frage, wie sich die unterschiedliche Ausprägung je nach Hirnregion erklären lässt. Eine mögliche Erklärung besteht in einer unterschiedlichen Entwicklung dieser Ablagerungen je nach Hirnregion aufgrund unterschiedlicher Grundvoraussetzungen oder möglicherweise durch eine unterschiedliche chronologische Ausbreitung entlang anatomischer Strukturen. Aufgrund eines zeitlichen und regionalen unterschiedlichen Ausbreitungsmodus' wurde

Diskussion

ein solcher Ausbreitungsmechanismus bereits anhand älterer Ergebnisse vermutet [224]. Entsprechend dieser Theorie wären bei den H95G-Mäusen nach RML-Infektion die synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen wahrscheinlich zuerst im Bereich des Kleinhirns entstanden. Der Grund für die starke Ausprägung dieser Ablagerungsform im Kleinhirn nach RML-Infektion könnte in den Grundvoraussetzungen bereits vor Infektion zu finden sein: die höchste PrP^c-Konzentrationen nach H95G-Mutation wurde bei der Liniencharakterisierung im Kleinhirn dargestellt, einer Region, die – wie bereits zu Beginn beschrieben – mitunter die höchsten Kupferkonzentrationen besitzt. Weitere, bisher noch nicht bekannte Einflüsse sind hier nicht auszuschließen.

Neben verschiedenen weiteren gemeinsamen Merkmalen wurde eine solche Ausbreitung entlang anatomischer Strukturen interessanterweise auch im Rahmen der Taupathie bei M. Alzheimer beschrieben [13, 14, 225, 226]. M. Alzheimer ist bekanntlich neuropathologisch durch die Ablagerungen von β -Amyloid-Plaques und neurofibrillären *Tangles* aus hyperphosphoryliertem Tau gekennzeichnet. In frühen Stadien ist besonders die entorhinale Region, anschließend sind ebenfalls weitere Regionen wie Hippocampus und Neocortex betroffen. Es wird hier ein Ausbreitungsmodus entlang synaptischer Strukturen vermutet, was auch hier z. B. ausgehend vom Kleinhirn der Fall gewesen sein könnte.

Reproduzierbar war weiterhin die deutlich geringere Ausprägung an synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen in den kortikalen Bereichen bei den H95G-Mäusen. Um die vorherigen Theorie zu stützen, müsste die Infektion bei Wildtypmäusen einen anderen Ursprung mit entsprechender anderer Ausbreitung haben. Bei den Wildtypmäusen fällt auf, dass die synaptischen Ablagerungen reproduzierbar auch in den Regionen Septum, Hippocampus und Thalamus am stärksten ausgeprägt sind. Tatsächlich wird angenommen, dass diese Regionen bei der Ausbreitung der Infektion bei Wildtypmäusen miteinander verbunden sind [189]: Durch chronologische Analysen der Ausbreitung von Mikrogliaaktivierung, die meist PrP^{sc}-Ablagerungen begleiten, wurde *in vivo* anhand von unterschiedlichen Bildgebungsverfahren eine Ausbreitung ausgehend vom Thalamus, Ort der Infektion, zu Hippocampus und Cortex dargestellt. Diese Ausbreitung wurde anschließend mit zunehmendem Nachweis von PrP^{sc} in der Immunhistologie korreliert.

Eine plausible Theorie in Zusammenschau dieser und bisheriger Ergebnisse wäre somit, dass die synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen mit der Neurodegeneration und synaptischem Funktionsverlust korrelieren. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Ausprägung dieser Ablagerungen im Vergleich zum Wildtyp ist, dass es nach der H95G-Mutation zu einer verminderten Modulation der NMDA-Rezeptoren aufgrund der gestörten Kupferbindung kam, die durch die Konversion zu PrP^{sc} noch weiter verstärkt wurde. Die Neurodegeneration könnte primär im Bereich des Kleinhirns entstanden sein und sich entlang anatomischer Strukturen ausgebreitet haben. Auch Astrozyten spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation der synaptischen Transmission. Eine mögliche Korrelation zwischen synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen und Astrozytose wurde insbesondere auch im Kleinhirn vorbeschrieben [46] und wird nachfolgend analysiert.

Diskussion

V.4.4 Reaktive Astrozytose und H95G-PrP^{sc}

Eine reaktive Astrozytose ist ein wesentlicher Bestandteil der Reaktion auf Prionerkrankungen. Die Ausprägung der Astrozytose wurde bei den H95G-Mauslinien anhand der Darstellung des Proteins GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*, „Saures Gliafaserprotein“) beurteilt. GFAP selbst wird nicht durch das Prionprotein hochreguliert [215], sodass es ein geeigneter Marker für die reaktive Astrozytose im Rahmen dieser Arbeit darstellt.

Insgesamt stellten sich folgende Ergebnisse nach der H95G-Mutation reproduzierbar dar (IV.3.2.2): Es zeigte sich bei den meisten H95G-Mäusen nach RML-Infektion vor allem eine signifikant stärker ausgeprägte Astrozytose in den Bereichen der weißen Substanz des Kleinhirns, Tegmentum und Medulla oblongata. Im Cortex zeigte sich hingegen eine signifikant geringer ausgeprägte Astrozytose im Vergleich zum Wildtyp. Bei der H95G-Mausgruppe 5 (Infektion zweiter Passage, Maus 305 der H95G-Linie 13) war in der Medulla oblongata die Astrozytose signifikant stärker ausgeprägt als bei den infizierten Wildtypmäusen der Gruppe 7 (Infektion zweiter Passage, Maus 305 der H95G-Linie 13). Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei der H95G-Mausgruppe 6 (Infektion zweiter Passage, Maus 304 der H95G-Linie 13) im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe 8 (Infektion zweiter Passage, Maus 304 der H95G-Linie 13). Die weiteren Ergebnisse zeigen einen Trend mit einer geringer ausgeprägten Astrozytose in den kortikalen Regionen und deutlich ausgeprägterer Astrozytose im Bereich des Kleinhirns.

Wäre eine indirekte Wirkung der gestörten Kupferbindung im Prionprotein auf die unterschiedliche Ausprägung der Astrozytose möglich? Denkbar wäre eine erhöhte Konzentration an freiem Kupfer, die sich auch auf die Ausbildung der reaktiven Astrozytose auswirken kann. Neben zahlreichen weiteren Funktionen modulieren Astrozyten auch die Ionen-Homöostase, wie insbesondere auch von Kupfer [227]. Sie scheinen nicht nur die Fähigkeit zu besitzen, Kupfer aufzunehmen, sondern auch wieder zu exportieren und damit andere Zellen zu versorgen [228]. Die Kupferaufnahme durch die Astrozyten scheint dabei stark mit der extrazellulären Kupferkonzentration zu korrelieren: Im kupferreichen Milieu zeigte sich eine deutliche Zunahme der intrazellulären Kupferkonzentration, die im Verlauf auch zu zellulärer Dysfunktion führt [229]. Eine solche Zellschädigung wäre unter Annahme einer Verstärkung des Kupfereffektes nach H95G-Mutation mit der hier beschriebenen geringer ausgeprägten Astrozytose in den Regionen mit physiologisch besonders hohem Kupfergehalt, wie unter anderem im Cortex, vereinbar. Allerdings wäre dann dieses Ergebnis auch in den Regionen des Hippocampus sowie des Kleinhirns zu erwarten [186], was hier jedoch nicht der Fall war.

Interessanterweise ist diese Hirnregion-gebundene Verteilung der Astrozytose im Wesentlichen vergleichbar mit der Verteilung der synaptischen H95G-PrP^{sc}-Ablagerungen: Insbesondere in den Regionen Medulla oblongata, Tegmentum und Cortex ist dies der Fall. In den Kleinhirnregionen zeigte sich eine stärkere Ausprägung als bei den Wildtypmäusen. Dies könnte sowohl Ausdruck einer protektiven Funktion der Astrozyten bei direkter H95G-PrP^{sc}-Wirkung auf die Synapsen als auch Folge einer vermehrten Akkumulierung von synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen, z. B. zur Abgrenzung der neurotoxischen Wirkung in angrenzendes Gewebe, sein.

Wie bereits beschrieben, stehen die synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen möglicherweise im Zusammenhang mit der Dysregulation von NMDA-Rezeptoren und den damit verbundenen neurotoxischen Konsequenzen.

Diskussion

Physiologischerweise sind Astrozyten an der Stabilisierung von Synapsen sowie der Modulation von synaptischer Transmission, insbesondere bei Glutamat-Freisetzung, beteiligt [230]. Astrozyten nehmen unter anderem das freigesetzte Glutamat auf und setzen es zu Glutamin um, welches wiederum Neuronen zugeführt wird. Dadurch wird unter anderem einer Dauerstimulation durch Glutamat und der damit verbundenen toxischen Folge von vermehrtem Calcium-Einstrom entgegengewirkt. Eine reaktive Astrozytose zur Modulierung einer Überaktivität der NMDA-Rezeptoren nach der H95G-Mutation, wie sie im Bereich des Kleinhirns entstanden sein könnte (s.o.), wäre hier eine mögliche Erklärung. In diesem Fall wäre die Astrozytose vor allem in den Regionen zu erwarten, in denen noch kein kompletter Funktionsverlust an den glutamatergen Synapsen entstanden ist. Da jedoch davon auszugehen ist, dass die synaptischen Ablagerungen jedoch besonders toxisch sind, deutet eine positive Korrelation von Astrozytose und diesen Ablagerungen eher auf eine direkte Reaktion der Astrozyten auf die Ablagerungen hin.

Weitere bisherige Ergebnisse lassen annehmen, dass den Astrozyten im Rahmen von Prionerkrankungen eine neuroprotektive Wirkung zukommt und sie möglicherweise aus diesem Grund mit den synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen in Verbindung stehen, die, wie bereits beschrieben, als eine Ursache für die Neurodegeneration vermutet werden. Zugrundegehende Neurone besitzen die Fähigkeit über *Gap junctions* ein „Todessignal“ an benachbarte, intakte Zellen zu übertragen: der sog. *Bystander cell death*. Astrozyten scheinen physiologischerweise eine protektive Funktion im Rahmen von Verletzungen im Gehirn unterschiedlicher Ursache in Bezug auf den *Bystander cell death* zu übernehmen, indem sie abgestorbene Zellen aufnehmen und dadurch Kontakt mit gesundem Gewebe verhindern [231]. Möglicherweise ist der reaktiven Astrozytose im Rahmen von Prionerkrankungen also eine protektive Rolle, insbesondere im Zusammenhang mit direkter oder indirekter Wirkung von synaptischen PrP^{sc}-Ablagerungen, zuzuordnen. Eine neurotoxische Beteiligung der Astrozyten ist jedoch nicht ausschließen, da die Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia meist parallel erfolgt [232] und eine gegenseitige Modulierung der Funktion besteht [215, 227], mit den oben beschriebenen möglichen neurotoxischen Konsequenzen der Mikrogliaaktivierung.

VI Zusammenfassung

Prionerkrankungen gehören zu den neurodegenerativen Erkrankungen und können sowohl genetisch übertragen als auch erworben werden. Sie verlaufen bisher ausschließlich letal. Verursacht werden sie durch das PrP^{sc}, die pathologische Isoform des physiologisch vorkommenden PrP^c. Ein – teilweise noch kontroverser – Einfluss von Kupfer auf die Pathologie wurde mehrfach dargestellt. Bisherige Arbeiten haben diesen Einfluss jedoch insbesondere anhand der Bindung an die Oktarepeatregion untersucht; zunehmend wächst allerdings das Interesse an den Kupferbindungsstellen außerhalb dieser Region: unter anderem insbesondere am Histidin 95 (His95). Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig der Einfluss der Kupferbindung an der murinen Aminosäure Histidin 95 des Prionproteins (PrP) *in vivo* nach Infektion untersucht. Da die Erreger von Scrapie und CJD eine ähnlich Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur besitzen [51, 168], sind wahrscheinlich die Ergebnisse aus Tiermodellen - zumindest teilweise - auf das menschliche Prionprotein übertragbar. Zur Untersuchung wurden transgene Mäuse verwendet, die ein mutiertes PrP mit einem Aminosäure-Austausch von Histidin zu Glycin an der Position 95 des Prionproteins exprimieren.

Zur Abgrenzung des Einflusses der Mutation nach Infektion wurde vorab eine Charakterisierung der nicht infizierten Mäuse durchgeführt: Die Mäuse nach Mutation (H95G-Mäuse) sowie das mutierte Prionprotein (H95G-PrP) wurden vor Infektion ausführlich untersucht und mit Wildtypkontrollen verglichen. Immunhistochemisch, histologisch und klinisch zeigte sich vor Infektion kein Unterschied zwischen H95G-Mäusen und Wildtypmäusen. Anschließend erfolgten diese Untersuchungen bei RML-infizierten H95G- und Wildtypmäusen. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal anhand von homozygoten HG95^{+/+}-Mäusen mit *Pmp*^{-/-} Hintergrund und *Pmp*^{+/-}-129/Sv-C57/Bl6-Kontrollmäusen ein signifikanter Einfluss der Kupferbindungsstelle am Histidin 95 auf die Pathologie und das Überleben nach Prioninfektion gezeigt werden. Die Ergebnisse wurden bei den Mäusen nach Infektion zweiter Passage geprüft. Hierdurch konnte eine stabile, signifikant verkürzte Inkubationszeit bei den H95G-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden.

Nach Infektion konnte weiterhin gezeigt werden, dass die H95G-Mäuse in fast allen beurteilten Hirnregionen reproduzierbar signifikant mehr plaqueartige PrP^{sc}-Ablagerungen sowie reproduzierbar signifikant geringere spongiforme Veränderungen aufwiesen. Im Bereich des Kleinhirns zeigten sich signifikant deutlicher ausgeprägte, in den untersuchten Cortexbereichen signifikant geringer ausgeprägte synaptische PrP^{sc}-Ablagerungen nach RML-Infektion, die teilweise reproduzierbar waren. Wahrscheinlich werden diese Ergebnisse beeinflusst durch den hier gezeigten veränderten Abbau des H95G- PrP^{sc}, das im Gegensatz zum Wildtyp-PrP^{sc} hauptsächlich über den β -Abbaumechanismus abgebaut wird, sowie den möglichen höheren Konzentrationen von H95G-PrP^c.

Diese Ergebnisse bieten somit neue Angriffspunkte für das bessere Verständnis der Pathologie von Prionerkrankungen, das in der Folge möglicherweise auch neue therapeutische Ansätze eröffnet.

VII Literaturverzeichnis

1. Gesundheitskommission, E., *Pressemitteilung Brüssel 22.7.2009 Reference: IP/09/1171*. 2009.
2. Chapman, P.F., et al., *Genes, models and Alzheimer's disease*. Trends in genetics : TIG, 2001. **17**(5): p. 254-61.
3. Reiniger, L., et al., *Tau, prions and Abeta: the triad of neurodegeneration*. Acta Neuropathol, 2010.
4. Giaccone, G., et al., *Tauopathy in human and experimental variant Creutzfeldt-Jakob disease*. Neurobiol Aging, 2008. **29**(12): p. 1864-73.
5. Voigtlander, T., et al., *Marked increase of neuronal prion protein immunoreactivity in Alzheimer's disease and human prion diseases*. Acta Neuropathol, 2001. **101**(5): p. 417-23.
6. Kovacs, G.G., et al., *The prion protein in human neurodegenerative disorders*. Neurosci Lett, 2002. **329**(3): p. 269-72.
7. Takahashi, R.H., et al., *Accumulation of cellular prion protein within dystrophic neurites of amyloid plaques in the Alzheimer's disease brain*. Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology, 2011. **31**(3): p. 208-14.
8. Haik, S., et al., *Alpha-synuclein-immunoreactive deposits in human and animal prion diseases*. Acta Neuropathol, 2002. **103**(5): p. 516-20.
9. Adjou, K.T., et al., *Alpha-synuclein accumulates in the brain of scrapie-affected sheep and goats*. J Comp Pathol, 2007. **137**(1): p. 78-81.
10. Prusiner, S.B., *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie*. Science, 1982. **216**(4542): p. 136-44.
11. Ferri, C.P., et al., *Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study*. Lancet, 2005. **366**(9503): p. 2112-7.
12. Budka, H., et al., *Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases)*. Brain pathology, 1995. **5**(4): p. 459-66.
13. Brundin, P., R. Melki, and R. Kopito, *Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2010. **11**(4): p. 301-7.
14. Frost, B. and M.I. Diamond, *Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases*. Nature reviews. Neuroscience, 2010. **11**(3): p. 155-9.
15. Jobling, M.F., et al., *Copper and zinc binding modulates the aggregation and neurotoxic properties of the prion peptide PrP106-126*. Biochemistry, 2001. **40**(27): p. 8073-84.
16. Qin, K., et al., *Copper(II)-induced conformational changes and protease resistance in recombinant and cellular PrP. Effect of protein age and deamidation*. J Biol Chem, 2000. **275**(25): p. 19121-31.
17. Tiffany-Castiglioni, E., S. Hong, and Y. Qian, *Copper handling by astrocytes: insights into neurodegenerative diseases*. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience, 2011. **29**(8): p. 811-8.
18. Bush, A.I., *Copper, zinc, and the metallobiology of Alzheimer disease*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2003. **17**(3): p. 147-50.
19. WHO, W.H.O., *Creutzfeld-Jakob Disease (CJD) and variant Creutzfeld-Jakob Disease (vCJD)*. 2010, revised February 2012.
20. ZNP-München, *Allgemeine Informationen zu Prionerkrankungen (spongiforme Enzephalopathien) beim Menschen*.
21. Pocchiarri, M., et al., *Predictors of survival in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and other human transmissible spongiform encephalopathies*. Brain : a journal of neurology, 2004. **127**(Pt 10): p. 2348-59.
22. Medicine, N.C.S.U.a.L.S.o.H.a.T., *Creutzfeldt-Jakob disease surveillance in the UK: eleventh annual report 2002*. eleventh annual report 2002, 2002.
23. Gajdusek, D.C., C.J. Gibbs, and M. Alpers, *Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees*. Nature, 1966. **209**(5025): p. 794-6.
24. Gajdusek, D.C. and V. Zigas, *Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population*. N Engl J Med, 1957. **257**(20): p. 974-8.
25. Collinge, J., et al., *Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods*. Lancet, 2006. **367**(9528): p. 2068-74.
26. Alpers, M., eds Prusiner SB , McKinley MP (Academic, San Diego), *Prions: Novel Infectious Pathogens Causing Scrapie and Creutzfeldt-Jakob Disease*. 1987: p. pp 451-465.
27. Wadsworth, J.D., et al., *Kuru prions and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease prions have equivalent transmission properties in transgenic and wild-type mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(10): p. 3885-90.
28. Organization, W.H., *Variant Creutzfeld-Jakob Disease Factsheet*. 2010.
29. Collinge, J., *Variant Creutzfeldt-Jakob disease*. Lancet, 1999. **354**(9175): p. 317-23.
30. Collinge, J., *Molecular neurology of prion disease*. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, 2005. **76**(7): p. 906-19.

31. Neurologie, D.G.f. *Leitlinien Creutzfeldt-Jakob-Krankheit*. 2008.
32. Kretzschmar, H.A., et al., *Prion protein mutation in family first reported by Gerstmann, Straussler, and Scheinker*. *Lancet*, 1991. **337**(8750): p. 1160.
33. Hsiao, K., et al., *Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome*. *Nature*, 1989. **338**(6213): p. 342-5.
34. Collinge, J., et al., *Diagnosis of Gerstmann-Straussler syndrome in familial dementia with prion protein gene analysis*. *Lancet*, 1989. **2**(8653): p. 15-7.
35. Riede, U.-N., Werner, M., Schaefer, H.-E., *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 2004.
36. Chapman, J., et al., *Clinical heterogeneity and unusual presentations of Creutzfeldt-Jakob disease in Jewish patients with the PRNP codon 200 mutation*. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 1993. **56**(10): p. 1109-12.
37. Montagna, P., et al., *Clinical features of fatal familial insomnia: phenotypic variability in relation to a polymorphism at codon 129 of the prion protein gene*. *Brain Pathol*, 1998. **8**(3): p. 515-20.
38. Montagna, P., et al., *Familial and sporadic fatal insomnia*. *Lancet Neurol*, 2003. **2**(3): p. 167-76.
39. Creutzfeldt, H.G., *On a particular focal disease of the central nervous system (preliminary communication)*, 1920. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 1989. **3**(1-2): p. 3-25.
40. Jakob, A., *Concerning a disorder of the central nervous system clinically resembling multiple sclerosis with remarkable anatomic findings (spastic pseudosclerosis). Report of a fourth case*. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 1989. **3**(1-2): p. 26-45.
41. NCJDRSU, N.C.-J.D.R.S.U.: University of Edinburgh.
42. Levavasseur, E., et al., *Regulating factors of PrP glycosylation in Creutzfeldt-Jakob disease--implications for the dissemination and the diagnosis of human prion strains*. *PLoS One*, 2008. **3**(7): p. e2786.
43. Hauw, J.J., et al., *Neuropathologic variants of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and codon 129 of PrP gene*. *Neurology*, 2000. **54**(8): p. 1641-6.
44. Bruce, M.E., et al., *PrP in pathology and pathogenesis in scrapie-infected mice*. *Molecular neurobiology*, 1994. **8**(2-3): p. 105-12.
45. Kitamoto, T., et al., *The primary structure of the prion protein influences the distribution of abnormal prion protein in the central nervous system*. *The American journal of pathology*, 1992. **141**(2): p. 271-7.
46. Faucheux, B.A., et al., *Loss of cerebellar granule neurons is associated with punctate but not with large focal deposits of prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease*. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 2009. **68**(8): p. 892-901.
47. Armstrong, R.A., N.J. Cairns, and P.L. Lantos, *Spatial pattern of prion protein deposits in patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease*. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 2001. **21**(1): p. 19-24.
48. Kitamoto, T., et al., *Abnormal isoform of prion proteins accumulates in the synaptic structures of the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease*. *The American journal of pathology*, 1992. **140**(6): p. 1285-94.
49. Sikorska, B., et al., *Creutzfeldt-Jakob disease*. *Advances in experimental medicine and biology*, 2012. **724**: p. 76-90.
50. Beat Hörlmann, D.R., ed. *Prions in Humans And Animals*. 2007, Walter de Gruyter.
51. Kretzschmar, H., *Genetik, Pathologie und Diagnostik der Prionen-Krankheiten des Menschen*. *Nova Acta Leopoldina*, 2002. **NF 87**: p. 123-146.
52. Budka, H., *Neuropathology of prion diseases*. *British medical bulletin*, 2003. **66**: p. 121-30.
53. Armstrong, R.A., *A quantitative study of the pathological changes in the cortical white matter in variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD)*. *Clinical neuropathology*, 2010. **29**(6): p. 390-6.
54. Parchi, P., et al., *Consensus classification of human prion disease histotypes allows reliable identification of molecular subtypes: an inter-rater study among surveillance centres in Europe and USA*. *Acta neuropathologica*, 2012. **124**(4): p. 517-29.
55. Kretzschmar, H.A., et al., *Cell death in prion disease*. *Journal of neural transmission. Supplementum*, 1997. **50**: p. 191-210.
56. Lucassen, P.J., et al., *Detection of apoptosis in murine scrapie*. *Neuroscience letters*, 1995. **198**(3): p. 185-8.
57. Giese, A., et al., *Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis*. *Brain pathology*, 1995. **5**(3): p. 213-21.
58. Ma, J., R. Wollmann, and S. Lindquist, *Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol*. *Science*, 2002. **298**(5599): p. 1781-5.
59. Giese, A. and H.A. Kretzschmar, *Prion-induced neuronal damage--the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies*. *Current topics in microbiology and immunology*, 2001. **253**: p. 203-17.
60. Yang, Q., et al., *Neuropathological study of cerebellar degeneration in prion disease*. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 1999. **19**(1): p. 33-9.
61. Prusiner, S.B., *Biology and genetics of prion diseases*. *Annual review of microbiology*, 1994. **48**: p. 655-86.

62. Banati, R.B., *Neuropathological imaging: in vivo detection of glial activation as a measure of disease and adaptive change in the brain*. British medical bulletin, 2003. **65**: p. 121-31.
63. Fraser, E., et al., *Neuronal and astrocytic responses involving the serotonergic system in human spongiform encephalopathies*. Neuropathology and applied neurobiology, 2003. **29**(5): p. 482-95.
64. Borner, R., et al., *Early behavioral changes and quantitative analysis of neuropathological features in murine prion disease: stereological analysis in the albino Swiss mice model*. Prion, 2011. **5**(3): p. 215-27.
65. Giese, A., et al., *Role of microglia in neuronal cell death in prion disease*. Brain pathology, 1998. **8**(3): p. 449-57.
66. Fioriti, L., et al., *Neurotoxic and gliotrophic activity of a synthetic peptide homologous to Gerstmann-Straussler-Scheinker disease amyloid protein*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2007. **27**(7): p. 1576-83.
67. Günter Klöppel, G.N.K.P., Hans-Heinrich Kreipe, Wolfgang Remmele, Werner Paulus, J. Michael Schroder, ed. *Pathologie: Neuropathologie*. 3. Aufl. 2012 ed. 2012, Springer Berlin Heidelberg.
68. Prusiner, S.B., *Prions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13363-83.
69. Sales, N., et al., *Cellular prion protein localization in rodent and primate brain*. Eur J Neurosci, 1998. **10**(7): p. 2464-71.
70. Herms, J., et al., *Evidence of presynaptic location and function of the prion protein*. J Neurosci, 1999. **19**(20): p. 8866-75.
71. Kretzschmar, H.A., et al., *Molecular cloning of a human prion protein cDNA*. DNA, 1986. **5**(4): p. 315-24.
72. Sparkes, R.S., et al., *Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(19): p. 7358-62.
73. Burns, C.S., et al., *Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein*. Biochemistry, 2003. **42**(22): p. 6794-803.
74. Hornemann, S., et al., *Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization*. FEBS Lett, 1997. **413**(2): p. 277-81.
75. Donne, D.G., et al., *Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13452-7.
76. Millhauser, G.L., *Copper binding in the prion protein*. Acc Chem Res, 2004. **37**(2): p. 79-85.
77. Peretz, D., et al., *A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform*. J Mol Biol, 1997. **273**(3): p. 614-22.
78. Forloni, G., et al., *Neurotoxicity of a prion protein fragment*. Nature, 1993. **362**(6420): p. 543-6.
79. Muramoto, T., et al., *Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(26): p. 15457-62.
80. Aronoff-Spencer, E., et al., *Identification of the Cu²⁺ binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy*. Biochemistry, 2000. **39**(45): p. 13760-71.
81. Burns, C.S., et al., *Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein*. Biochemistry, 2002. **41**(12): p. 3991-4001.
82. Viles, J.H., et al., *Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2042-7.
83. Miura, T., et al., *Raman spectroscopic study on the copper(II) binding mode of prion octapeptide and its pH dependence*. Biochemistry, 1999. **38**(35): p. 11560-9.
84. Riek, R., et al., *NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321)*. Nature, 1996. **382**(6587): p. 180-2.
85. Stahl, N., et al., *Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing*. Biochemistry, 1993. **32**(8): p. 1991-2002.
86. Stimson, E., et al., *Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions*. Biochemistry, 1999. **38**(15): p. 4885-95.
87. Taylor, D.R. and N.M. Hooper, *The prion protein and lipid rafts*. Mol Membr Biol, 2006. **23**(1): p. 89-99.
88. Sunyach, C., et al., *The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein*. The EMBO journal, 2003. **22**(14): p. 3591-601.
89. Taylor, D.R., et al., *Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis*. Journal of cell science, 2005. **118**(Pt 21): p. 5141-53.
90. Pauly, P.C. and D.A. Harris, *Copper stimulates endocytosis of the prion protein*. J Biol Chem, 1998. **273**(50): p. 33107-10.
91. Haigh, C.L., K. Edwards, and D.R. Brown, *Copper binding is the governing determinant of prion protein turnover*. Molecular and cellular neurosciences, 2005. **30**(2): p. 186-96.
92. Mange, A., et al., *Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein*. Biol Cell, 2004. **96**(2): p. 125-32.
93. Walmsley, A.R., et al., *alpha-cleavage of the prion protein occurs in a late compartment of the secretory pathway and is independent of lipid rafts (nicht heruntergeladen)*. Mol Cell Neurosci, 2009. **40**(2): p. 242-8.

94. Watt, N.T. and N.M. Hooper, *Reactive oxygen species (ROS)-mediated beta-cleavage of the prion protein in the mechanism of the cellular response to oxidative stress*. *Biochem Soc Trans*, 2005. **33**(Pt 5): p. 1123-5.
95. Jimenez-Huete, A., et al., *Endogenous proteolytic cleavage of normal and disease-associated isoforms of the human prion protein in neural and non-neural tissues*. *Am J Pathol*, 1998. **153**(5): p. 1561-72.
96. Sunyach, C., et al., *The C-terminal products of cellular prion protein processing, C1 and C2, exert distinct influence on p53-dependent staurosporine-induced caspase-3 activation*. *The Journal of biological chemistry*, 2007. **282**(3): p. 1956-63.
97. Guillot-Sestier, M.V. and F. Checler, *alpha-Secretase-derived cleavage of cellular prion yields biologically active catabolites with distinct functions*. *Neuro-degenerative diseases*, 2012. **10**(1-4): p. 294-7.
98. Guillot-Sestier, M.V., et al., *The alpha-secretase-derived N-terminal product of cellular prion, N1, displays neuroprotective function in vitro and in vivo*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(51): p. 35973-86.
99. Lewis, V., et al., *Increased proportions of C1 truncated prion protein protect against cellular M1000 prion infection*. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 2009. **68**(10): p. 1125-35.
100. Chen, S.G., et al., *Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(32): p. 19173-80.
101. Bueler, H., et al., *Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein*. *Nature*, 1992. **356**(6370): p. 577-82.
102. Tobler, I., T. Deboer, and M. Fischer, *Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 1997. **17**(5): p. 1869-79.
103. Tobler, I., et al., *Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein*. *Nature*, 1996. **380**(6575): p. 639-42.
104. Rachidi, W., et al., *Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery*. *The Journal of biological chemistry*, 2003. **278**(11): p. 9064-72.
105. Brown, D.R., C. Clive, and S.J. Haswell, *Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein*. *J Neurochem*, 2001. **76**(1): p. 69-76.
106. Sauer, H., et al., *Regulation of intrinsic prion protein by growth factors and TNF-alpha: the role of intracellular reactive oxygen species*. *Free Radic Biol Med*, 2003. **35**(6): p. 586-94.
107. McLennan, N.F., et al., *Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage*. *The American journal of pathology*, 2004. **165**(1): p. 227-35.
108. Brown, D.R., B. Schmidt, and H.A. Kretzschmar, *Effects of oxidative stress on prion protein expression in PC12 cells*. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 1997. **15**(8): p. 961-72.
109. Brown, D.R., B. Schmidt, and H.A. Kretzschmar, *Effects of copper on survival of prion protein knockout neurons and glia*. *J Neurochem*, 1998. **70**(4): p. 1686-93.
110. Kuwahara, C., et al., *Enhanced expression of cellular prion protein gene by insulin or nerve growth factor in immortalized mouse neuronal precursor cell lines*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **268**(3): p. 763-6.
111. Zeng, F., et al., *Tethering the N-terminus of the prion protein compromises the cellular response to oxidative stress*. *J Neurochem*, 2003. **84**(3): p. 480-90.
112. Moroncini, G., et al., *Motif-grafted antibodies containing the replicative interface of cellular PrP are specific for PrP^{Sc}*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(28): p. 10404-9.
113. Dawson, V.L. and T.M. Dawson, *Nitric oxide neurotoxicity*. *Journal of chemical neuroanatomy*, 1996. **10**(3-4): p. 179-90.
114. Brown, D.R., et al., *The cellular prion protein binds copper in vivo*. *Nature*, 1997. **390**(6661): p. 684-7.
115. Miura, T., et al., *Copper reduction by the octapeptide repeat region of prion protein: pH dependence and implications in cellular copper uptake*. *Biochemistry*, 2005. **44**(24): p. 8712-20.
116. Diedrich, J.F., et al., *Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991. **88**(2): p. 375-9.
117. Mallucci, G.R., et al., *Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration*. *The EMBO journal*, 2002. **21**(3): p. 202-10.
118. Senatore, A., et al., *Mutant PrP suppresses glutamatergic neurotransmission in cerebellar granule neurons by impairing membrane delivery of VGCC alpha(2)delta-1 Subunit*. *Neuron*, 2012. **74**(2): p. 300-13.
119. Khosravani, H., et al., *Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors*. *The Journal of general physiology*, 2008. **131**(6): p. i5.
120. Walz, R., et al., *Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein*. *Epilepsia*, 1999. **40**(12): p. 1679-82.
121. Collinge, J., et al., *Prion protein is necessary for normal synaptic function*. *Nature*, 1994. **370**(6487): p. 295-7.
122. Maglio, L.E., et al., *Hippocampal synaptic plasticity in mice devoid of cellular prion protein*. *Brain research. Molecular brain research*, 2004. **131**(1-2): p. 58-64.
123. Curtis, J., et al., *Age-dependent loss of PTP and LTP in the hippocampus of PrP-null mice*. *Neurobiology of disease*, 2003. **13**(1): p. 55-62.

124. Kardos, J., et al., *Nerve endings from rat brain tissue release copper upon depolarization. A possible role in regulating neuronal excitability.* Neurosci Lett, 1989. **103**(2): p. 139-44.
125. Gibbs, C.J., Jr., D.C. Gajdusek, and R. Latarjet, *Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(12): p. 6268-70.
126. Saborio, G.P., B. Permanne, and C. Soto, *Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding.* Nature, 2001. **411**(6839): p. 810-3.
127. Bueler, H., et al., *Mice devoid of PrP are resistant to scrapie.* Cell, 1993. **73**(7): p. 1339-47.
128. Sailer, A., et al., *No propagation of prions in mice devoid of PrP.* Cell, 1994. **77**(7): p. 967-8.
129. Kocisko, D.A., et al., *Cell-free formation of protease-resistant prion protein.* Nature, 1994. **370**(6489): p. 471-4.
130. Pan, K.M., et al., *Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 10962-6.
131. Safar, J., et al., *Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein.* The Journal of biological chemistry, 1993. **268**(27): p. 20276-84.
132. Prusiner, S.B., R. Gabizon, and M.P. McKinley, *On the biology of prions.* Acta Neuropathol, 1987. **72**(4): p. 299-314.
133. Bolton, D.C., M.P. McKinley, and S.B. Prusiner, *Identification of a protein that purifies with the scrapie prion.* Science, 1982. **218**(4579): p. 1309-11.
134. Prusiner, S.B., et al., *Purification and structural studies of a major scrapie prion protein.* Cell, 1984. **38**(1): p. 127-34.
135. Prusiner, S.B., et al., *Further purification and characterization of scrapie prions.* Biochemistry, 1982. **21**(26): p. 6942-50.
136. DeArmond, S.J., et al., *Selective neuronal targeting in prion disease.* Neuron, 1997. **19**(6): p. 1337-48.
137. DeArmond, S.J., et al., *Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection.* Neurology, 1998. **50**(1): p. 1271-80; discussion 2.
138. Rudd, P.M., et al., *Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13044-9.
139. Haraguchi, T., et al., *Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins.* Arch Biochem Biophys, 1989. **274**(1): p. 1-13.
140. Stockel, J., et al., *Prion protein selectively binds copper(II) ions.* Biochemistry, 1998. **37**(20): p. 7185-93.
141. Hornshaw, M.P., et al., *Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides.* Biochem Biophys Res Commun, 1995. **214**(3): p. 993-9.
142. Kramer, M.L., et al., *Prion protein binds copper within the physiological concentration range.* J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 16711-9.
143. Brown, D.R., et al., *Copper(II) complexes of peptide fragments of the prion protein. Conformation changes induced by copper(II) and the binding motif in C-terminal protein region.* Journal of inorganic biochemistry, 2004. **98**(1): p. 133-43.
144. Walter, E.D., et al., *Copper binding extrinsic to the octarepeat region in the prion protein.* Current protein & peptide science, 2009. **10**(5): p. 529-35.
145. Qin, K., et al., *ATM-mediated transcriptional elevation of prion in response to copper-induced oxidative stress.* J Biol Chem, 2009. **284**(7): p. 4582-93.
146. Kretzschmar, H.A., et al., *Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse.* Arch Virol Suppl, 2000(16): p. 239-49.
147. Perera, W.S. and N.M. Hooper, *Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region.* Current biology : CB, 2001. **11**(7): p. 519-23.
148. Linder, M.C., and Goode, C. A., *Biochemistry of Copper.* Plenum Press, New York, 1991.
149. Quaglio, E., R. Chiesa, and D.A. Harris, *Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform.* J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 11432-8.
150. McKenzie, D., et al., *Reversibility of scrapie inactivation is enhanced by copper.* J Biol Chem, 1998. **273**(40): p. 25545-7.
151. Bocharova, O.V., et al., *Copper(II) inhibits in vitro conversion of prion protein into amyloid fibrils.* Biochemistry, 2005. **44**(18): p. 6776-87.
152. Sigurdsson, E.M., et al., *Copper chelation delays the onset of prion disease.* J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46199-202.
153. Nishina, K., S. Jenks, and S. Supattapone, *Ionic strength and transition metals control PrPSc protease resistance and conversion-inducing activity.* The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(39): p. 40788-94.
154. Hijazi, N., et al., *Copper binding to PrPC may inhibit prion disease propagation.* Brain research, 2003. **993**(1-2): p. 192-200.
155. Mitteregger, G., et al., *Role of copper and manganese in prion disease progression.* Brain research, 2009. **1292**: p. 155-64.
156. Whittal, R.M., et al., *Copper binding to octarepeat peptides of the prion protein monitored by mass spectrometry.* Protein Sci, 2000. **9**(2): p. 332-43.

157. Chattopadhyay, M., et al., *The octarepeat domain of the prion protein binds Cu(II) with three distinct coordination modes at pH 7.4*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(36): p. 12647-56.
158. Klewpatinond, M., et al., *Deconvoluting the Cu²⁺ binding modes of full-length prion protein*. J Biol Chem, 2008. **283**(4): p. 1870-81.
159. Goldfarb, L.G., et al., *Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(23): p. 10926-30.
160. Flechsig, E., et al., *Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice*. Neuron, 2000. **27**(2): p. 399-408.
161. Jones, C.E., et al., *Probing copper²⁺ binding to the prion protein using diamagnetic nickel²⁺ and ¹H NMR: the unstructured N terminus facilitates the coordination of six copper²⁺ ions at physiological concentrations*. J Mol Biol, 2005. **346**(5): p. 1393-407.
162. Jones, C.E., et al., *Preferential Cu²⁺ coordination by His96 and His111 induces beta-sheet formation in the unstructured amyloidogenic region of the prion protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 32018-27.
163. Jackson, G.S., et al., *Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8531-5.
164. Prusiner, S.B., *Inherited prion diseases*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(11): p. 4611-4.
165. Watanabe, Y., et al., *A novel copper(II) coordination at His186 in full-length murine prion protein*. Biochemical and biophysical research communications, 2010. **394**(3): p. 522-8.
166. Altmeppen, H.C., et al., *Proteolytic processing of the prion protein in health and disease*. American journal of neurodegenerative disease, 2012. **1**(1): p. 15-31.
167. Cox, D.L., J. Pan, and R.R. Singh, *A mechanism for copper inhibition of infectious prion conversion*. Biophysical journal, 2006. **91**(2): p. L11-3.
168. Bendheim, P.E., et al., *Scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease prion proteins share physical properties and antigenic determinants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(4): p. 997-1001.
169. Chandler, R.L., *Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material*. Lancet, 1961. **1**(7191): p. 1378-9.
170. Carlson, G.A., et al., *Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes*. Cell, 1986. **46**(4): p. 503-11.
171. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
172. Meyer, R.K., et al., *Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(8): p. 2310-4.
173. Breyer, J., et al., *Detergents modify proteinase K resistance of PrP^{Sc} in different transmissible spongiform encephalopathies (TSEs)*. Veterinary microbiology, 2012. **157**(1-2): p. 23-31.
174. Meyer, R.K., et al., *Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(8): p. 2310-4.
175. Xiang, W., et al., *Identification of differentially expressed genes in scrapie-infected mouse brains by using global gene expression technology*. Journal of virology, 2004. **78**(20): p. 11051-60.
176. Kascsak, R.J., et al., *Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins*. Journal of virology, 1987. **61**(12): p. 3688-93.
177. Schulz-Schaeffer, W.J., et al., *The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases*. The American journal of pathology, 2000. **156**(1): p. 51-6.
178. Krasemann, S., et al., *Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP^{0/0} mice*. Molecular medicine, 1996. **2**(6): p. 725-34.
179. Lefebvre-Roque, M., et al., *Toxic effects of intracerebral PrP antibody administration during the course of BSE infection in mice*. Prion, 2007. **1**(3): p. 198-206.
180. Kitamoto, T., et al., *Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1987. **57**(2): p. 230-6.
181. Morawietz, G., et al., *Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups*. Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie, 2004. **55**(6): p. 433-49.
182. Fraser, H. and A.G. Dickinson, *The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice*. Journal of comparative pathology, 1968. **78**(3): p. 301-11.
183. Bruce, M.E., et al., *Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent*. Nature, 1997. **389**(6650): p. 498-501.
184. Rosen GD, W.A., Capra JA, Connolly MT, Cruz B, Lu L, Airey DC, Kulkarni K, Williams RW *The Mouse Brain Library @ www.mbl.org. Int Mouse Genome Conference 14: 166. www.mbl.org. 2000.*
185. Bruce, M.E., et al., *The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis*. The Journal of general virology, 1991. **72** (Pt 3): p. 595-603.

186. Madsen, E. and J.D. Gitlin, *Copper and iron disorders of the brain*. Annual review of neuroscience, 2007. **30**: p. 317-37.
187. Kordek, R., et al., *Deposition of the prion protein (PrP) during the evolution of experimental Creutzfeldt-Jakob disease*. Acta neuropathologica, 1999. **98**(6): p. 597-602.
188. Mallucci, G.R., et al., *Targeting cellular prion protein reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice*. Neuron, 2007. **53**(3): p. 325-35.
189. Song, P.J., et al., *Evaluation of prion deposits and microglial activation in scrapie-infected mice using molecular imaging probes*. Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging, 2010. **12**(6): p. 576-82.
190. Armstrong, R.A. and N.J. Cairns, *Spatial patterns of the pathological changes in the cerebellar cortex in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD)*. Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 2003. **41**(4): p. 183-9.
191. Ferrer, I., *Synaptic pathology and cell death in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease*. Cerebellum, 2002. **1**(3): p. 213-22.
192. Armstrong, R.A., et al., *Quantification of vacuolation ("spongiform change"), surviving neurones and prion protein deposition in eleven cases of variant Creutzfeldt-Jakob disease*. Neuropathology and applied neurobiology, 2002. **28**(2): p. 129-35.
193. Nieznanski, K., et al., *Proteolytic processing and glycosylation influence formation of porcine prion protein complexes*. The Biochemical journal, 2005. **387**(Pt 1): p. 93-100.
194. Kuczius, T. and M.H. Groschup, *Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains*. Molecular medicine, 1999. **5**(6): p. 406-18.
195. Kimberlin, R.H. and C.A. Walker, *Pathogenesis of experimental scrapie*. Ciba Foundation symposium, 1988. **135**: p. 37-62.
196. Broom, K.A., et al., *MRI and MRS alterations in the preclinical phase of murine prion disease: association with neuropathological and behavioural changes*. Neurobiology of disease, 2007. **26**(3): p. 707-17.
197. Cunningham, C., et al., *Synaptic changes characterize early behavioural signs in the ME7 model of murine prion disease*. The European journal of neuroscience, 2003. **17**(10): p. 2147-55.
198. Zahn, R., *The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site*. Journal of molecular biology, 2003. **334**(3): p. 477-88.
199. Hodak, M., et al., *Functional implications of multistage copper binding to the prion protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(28): p. 11576-81.
200. Govaerts, C., et al., *Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(22): p. 8342-7.
201. Rambold, A.S., et al., *Stress-protective signalling of prion protein is corrupted by scrapie prions*. The EMBO journal, 2008. **27**(14): p. 1974-84.
202. Watt, N.T., et al., *Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress*. J Biol Chem, 2005. **280**(43): p. 35914-21.
203. Prusiner, S.B., *Chemistry and biology of prions*. Biochemistry, 1992. **31**(49): p. 12277-88.
204. Stone, L.A., et al., *Inhibition of proteinase K activity by copper(II) ions*. Biochemistry, 2007. **46**(1): p. 245-52.
205. Beat Hömli, D.R.u.H.K., ed. *Prionen und Prionkrankheiten*. 2001, von Gruyter.
206. Fraser, H., ed. *Neuropathology of scrapie: The precision of the lesions and their diversity*. In *Slow transmissible diseases of the nervous system*. ed. S.B.P.a.W.J. Hadlow. Vol. 1. 1979, Academic Press, New York. , pp. 387-406.
207. Wong, P.C., et al., *An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria*. Neuron, 1995. **14**(6): p. 1105-16.
208. Boellaard, J.W., W. Schlote, and J. Tateishi, *Neuronal autophagy in experimental Creutzfeldt-Jakob's disease*. Acta neuropathologica, 1989. **78**(4): p. 410-8.
209. Rubinsztein, D.C., et al., *Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair*. Autophagy, 2005. **1**(1): p. 11-22.
210. Liberski, P.P., et al., *Cell death and autophagy in prion diseases (transmissible spongiform encephalopathies)*. Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 2008. **46**(1): p. 1-25.
211. McKinley, M.P., et al., *Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1991. **65**(6): p. 622-30.
212. Hafner-Bratkovic, I., et al., *NLRP3 inflammasome activation in macrophage cell lines by prion protein fibrils as the source of IL-1beta and neuronal toxicity*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2012.
213. Jamieson, E., et al., *Apoptosis and dendritic dysfunction precede prion protein accumulation in 87V scrapie*. Neuroreport, 2001. **12**(10): p. 2147-53.
214. Thakur, A.K., et al., *Copper alters aggregation behavior of prion protein and induces novel interactions between its N- and C-terminal regions*. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**(44): p. 38533-45.

215. Peyrin, J.M., et al., *Microglial cells respond to amyloidogenic PrP peptide by the production of inflammatory cytokines*. Neuroreport, 1999. **10**(4): p. 723-9.
216. Takikita, S., et al., *Neuronal apoptosis mediated by IL-1 beta expression in viral encephalitis caused by a neuroadapted strain of the mumps virus (Kilham Strain) in hamsters*. Experimental neurology, 2001. **172**(1): p. 47-59.
217. Wang, X.J., et al., *Interleukin-1 beta induction of neuron apoptosis depends on p38 mitogen-activated protein kinase activity after spinal cord injury*. Acta pharmacologica Sinica, 2005. **26**(8): p. 934-42.
218. Treusch, S., D.M. Cyr, and S. Lindquist, *Amyloid deposits: protection against toxic protein species?* Cell cycle, 2009. **8**(11): p. 1668-74.
219. Chesebro, B., et al., *Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie*. Science, 2005. **308**(5727): p. 1435-9.
220. Jeffrey, M., et al., *Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus*. Neuropathology and applied neurobiology, 2000. **26**(1): p. 41-54.
221. Thellung, S., et al., *Excitotoxicity Through NMDA Receptors Mediates Cerebellar Granule Neuron Apoptosis Induced by Prion Protein 90-231 Fragment*. Neurotoxicity research, 2012.
222. Muller, W.E., et al., *Cytoprotective effect of NMDA receptor antagonists on prion protein (PrionSc)-induced toxicity in rat cortical cell cultures*. European journal of pharmacology, 1993. **246**(3): p. 261-7.
223. Stys, P.K., H. You, and G.W. Zamponi, *Copper-dependent regulation of NMDA receptors by cellular prion protein: implications for neurodegenerative disorders*. The Journal of physiology, 2012. **590**(Pt 6): p. 1357-68.
224. Jendroska, K., et al., *Proteinase-resistant prion protein accumulation in Syrian hamster brain correlates with regional pathology and scrapie infectivity*. Neurology, 1991. **41**(9): p. 1482-90.
225. Clavaguera, F., et al., *Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain*. Nature cell biology, 2009. **11**(7): p. 909-13.
226. Liu, L., et al., *Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31302.
227. Hansson, E. and L. Ronnback, *Astrocytes in glutamate neurotransmission*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1995. **9**(5): p. 343-50.
228. Scheiber, I.F., M.M. Schmidt, and R. Dringen, *Copper export from cultured astrocytes*. Neurochemistry international, 2012. **60**(3): p. 292-300.
229. Scheiber, I.F., M.M. Schmidt, and R. Dringen, *Zinc prevents the copper-induced damage of cultured astrocytes*. Neurochemistry international, 2010. **57**(3): p. 314-22.
230. Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A., Silbernagl, S., *Physiologie: Lehrbuch*2009, Stuttgart: Thieme, Stuttgart.
231. Loov, C., et al., *Engulfing astrocytes protect neurons from contact-induced apoptosis following injury*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33090.
232. Perry, V.H., C. Cunningham, and D. Boche, *Atypical inflammation in the central nervous system in prion disease*. Current opinion in neurology, 2002. **15**(3): p. 349-54.

VIII Danksagung

Ohne die Hilfe zahlreicher Personen wäre diese Arbeit undenkbar gewesen – an dieser Stelle möchte ich ihnen daher meinen ganz herzlichen Dank aussprechen.

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hans A. Kretzschmar bedanken, der mich von Beginn an für die experimentelle Forschung begeistert hat und mir dieses spannende Thema überließ. Es war eine große Ehre und Freude für mich, in einem so umfassend ausgestatteten und renommierten Labor mit so guter Betreuung forschen zu dürfen.

Vor allem hat Dr. Sabina Eigenbrod diese Arbeit begleitet. Ihr danke ich für ihr umfassendes Fachwissen, ihre Hilfsbereitschaft und ihr Engagement während der Betreuung meiner Arbeit. Auch für die professionelle Gestaltung der Versuchsserien bis hin zur Korrektur möchte ich mich herzlich bedanken.

Prof. Dr. Armin Giese gilt mein besonderer Dank, sich für die Korrektur dieser Arbeit sowie für die Übernahme der Berichterstattung so kurzfristig und aus traurigem Anlass bereit erklärt zu haben sowie für die Anregungen und konstruktive Kritik, die diese Arbeit zu einem schnellen Abschluss gebracht haben. Vielen Dank!

Janina Mielke möchte ich für die intensiven und äußerst lehrreichen Gespräche danken, die mir überhaupt erst die Grundlage dazu gaben, histologische, immunhistochemische und biochemische Denkweisen und Techniken zu verstehen und selber anzuwenden. Für die Geduld und die liebe Einarbeitung ein ganz herzliches Dankeschön.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an Frau Ulrike Voss richten, ohne die ich niemals ein Licht am Ende der Doktorarbeit gesehen hätte.

Ganz herzlich möchte ich mich zudem bei Michael Schmidt, Peer Schmitz, Michael Ruiter, Anna Krieger, Brigitte Kraft, den Tiermedizinern und –Pflegerinnen des ZNP für ihre vielfache Hilfe und Unterstützung sowie die ausgezeichnete Einarbeitung in das Laborleben bedanken.

Zu guter Letzt sei meinen Eltern und meiner Familie sowie meinen Freunden gedankt für Ihre Anregungen, ihre Geduld und ihre Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

IX Abkürzungsverzeichnis

AMPA	2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)-Propanolsäure
APS	Ammoniumperoxosulfat
AS	Aminosäure
BCIP	Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
C1	PrP-Spaltprodukt nach α -Spaltung
C2	PrP-Spaltprodukt nach β -Spaltung
CJD	Creutzfeldt-Jakob Disease
C-Terminus	Carboxy(COOH)-Terminus
Cu	Kupfer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FL	Full-Length
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
H95G	Austausch des Histidins an der Aminosäureposition 95 durch Glycin
HE-Färbung	Hämatoxylin- und Eosin-Färbung
His95	Histidin an der Aminosäureposition 95
iCJD	iatrogene CJD
kDa	Kilodalton
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
N-Terminus	NH ₂ -Terminus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OR	Oktarepeatsequenz
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	PBS-Tween
PK	Proteinase K
PNGase	Peptide-N4-(acetyl- β -glucosaminy)-Asparagin-Amidase
Prion	Proteinaceous infectious agent
Prnp	Gen des Prionproteins
Prnp ^{+/+}	Prionprotein Wildtyp
Prnp ^{-/-}	Prionprotein Knock-out
PrP ^c	Cellular Prionprotein
PrPres	Proteinase K resistent
PrP ^{sc}	Scrapie causin Prionprotein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RML	Rocky Mountain Laboratory, Infektion mit RML-strain
Rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
sCJD	sporadische CJD

SDS	Sodium Dodecylsulfate
SEM	Standardfehler
TEMED	Tetramethylethyldiamid
TSE	Transmissible Spongiform Encephalopathies
vCJD	neue Variante von CJD
ZNS	Zentrales Nervensystem
2P	Infektion zweiter Passage

Eidesstattliche Versicherung

Eickhoff, Madeleine

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Einfluss der Kupferbindung an der Aminosäureposition 95 im Prionprotein auf den Krankheitsverlauf nach Prioninfektion

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand