

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und

dem Institut für Neue und Neuartige Tierseuchenerreger
am Friedrich-Loeffler-Institut,
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
Standort Insel Riems

Untersuchung von Zelllinien unterschiedlicher eukaryotischer Spezies auf ihre Infizierbarkeit mit verschiedenen TSE-Stämmen und -Isolaten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Anja Maria Oelschlegel
aus Berlin

Leipzig, 2007

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Prof. Dr. Uwe Truyen
Prof. Dr. Martin H. Groschup

Gutachter: Prof. Dr. Uwe Truyen
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen,
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig

Prof. Dr. Martin H. Groschup
Institut für Neue und Neuartige Tierseuchenerreger,
Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems

Prof. Dr. Gotthold Gäbel
Veterinär-Physiologisches Institut,
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig

Prof. Dr. Volker Moennig
Institut für Virologie, Zentrum für Infektionsmedizin
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover

Tag der Verteidigung: 30.10.2007

1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien	3
2.1.1 TSE-Erkrankungen des Menschen	4
2.1.2 TSE-Erkrankungen der Tiere	5
2.1.2.2 Scrapie	5
2.1.2.3 BSE	6
2.1.2.4 CWD, FSE, TME	7
2.1.3 Das Prion-Protein	8
2.1.3.1 PrP ^C	8
2.1.3.2 PrP ^{Sc}	10
2.1.4 Die „Protein-only“-Hypothese	11
2.1.5 Konversionsmodelle	14
2.1.6 Übertragbarkeit der TSE-Erkrankungen	15
2.2 Zellkulturen in der TSE-Forschung	17
2.2.1 TSE-infizierte Zellen	18
2.2.2 Empfänglichkeit, Resistenz und Erregerspezifität	19
3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN	21
3.1 Tiere	21
3.2 Material	21
3.2.1 Zelllinien	21
3.2.1.1 Zelllinien aus der Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts	21
3.2.1.2 Transgene Zelllinien auf dem zellulären Hintergrund von Hpl3-4-Zellen	22
3.2.1.3 Kontrollzelllinien	23
3.2.2 Gehirnmateriale	23
3.2.2.1 Mauspassagierte Scrapie -Stämme	23
3.2.2.2 Schaf-Scrapie-Isolate	24
3.2.2.3 Ziegen-Scrapie-Isolate	25
3.2.2.4 BSE-Isolate vom Rind	25
3.2.2.5 Mauspassagierte BSE-Isolate	25
3.2.2.6 TSE-negative Kontrollgewebe	25
3.2.3 Bakterien	26
3.2.4 Plasmide	26
3.2.5 Plasmidkonstrukte	26
3.2.6 Nukleinsäuren und Oligonukleotide	26

3.2.7 Enzyme	26
3.2.8 Elektrophoresemarker	27
3.2.9 Antibiotika	27
3.2.10 Antikörper, Antiseren und Konjugate	27
3.2.11 Medien	28
3.2.11.1 Zellkultur-Nährmedien	28
3.2.11.2 Zellkultur-Einfriermedium	29
3.2.11.3 Bakterienkultur-Nährmedien	29
3.2.12 PrP ^{res} inhibierende Substanzen	29
3.2.13 Puffer und Lösungen	30
3.2.14 Komplettsysteme (Kits)	35
3.2.15 Chemikalien und biologische Produkte	35
3.2.16 Verbrauchsmaterialien	37
3.2.17 Geräte	37
3.3 Methoden	40
3.3.1 Molekularbiologische Methoden – Klonierung von Plasmidkonstrukten	40
3.3.1.1 Präparation von DNA	40
3.3.1.1.1 Präparation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen und Geweben	40
3.3.1.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Flüssigkulturen	40
3.3.1.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach enzymatischen Reaktionen	41
3.3.1.1.4 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
3.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
3.3.1.3 Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren	42
3.3.1.3.1 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren	42
3.3.1.3.2 Entfernung randständiger Phosphatgruppen	42
3.3.1.4 Agarosegelelektrophorese	42
3.3.1.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	42
3.3.1.6 Ligation in Plasmid-Vektoren	43
3.3.1.7 Transformation und Selektion von Bakterien	43
3.3.1.8 Anzucht von Flüssigkulturen und Lagerung	43
3.3.1.9 Herstellung kompetenter Bakterien	43
3.3.1.10 Sequenzierung von Nukleinsäuren	44
3.3.2 Zellkultur	44
3.3.2.1 Zellkultur und Zellpassage	44
3.3.2.2 Langzeitlagerung von Zellen	44
3.3.2.2.1 Einfrieren von Zellen	44
3.3.2.2.2 Auftauen von Zellen	45
3.3.2.3 Zellzahlbestimmung	45
3.3.2.4 Transfektion von Zellen	45
3.3.2.5 Klonierung von eukaryotischen Zellen	46

3.3.3 Infektionsprotokoll	46
3.3.3.1 Herstellung von Hirnhomogenaten	46
3.3.3.2 Inokulation von Zelllinien	46
3.3.3.3 Ausschluss von Restinokulat	47
3.3.4 Spezifischer Nachweis von Proteinen	47
3.3.4.1 Western-Blot-Analyse	47
3.3.4.2 Dot-Blot-Analyse	49
3.3.4.3 „Zell-ELISA“	49
3.3.4.4 PrP-spezifische Antikörper	50
3.3.4.5 Lösen von Antikörperbindungen	50
3.3.5 Enzymatische Behandlung des PrP	51
3.3.5.1 Proteinase K-Zeitreihe	51
3.3.5.2 Proteinase K-Konzentrationsreihe	51
3.3.5.3 Deglykosylierung mit N-Glykosidase F	51
3.3.6 Inhibition von PrP ^{res}	52
3.3.7 Inokulation von Mäusen	52
4 ERGEBNISSE	53
4.1 Vorversuche	53
4.1.1 Zelllinien	53
4.1.1.1 Kontrollzelllinien	53
4.1.1.2 Zelllinien aus der Zellbank des FLI	54
4.1.2 Inokulate	55
4.1.3 Infektionsprotokoll	56
4.1.3.1 Einfluss der Zellkulturbedingungen auf die PrP ^C -Expressionsrate	56
4.1.3.2 Herstellung und Applikationsmenge der Inokulate	58
4.1.3.3 Inokulationsprotokoll	60
4.2 TSE-Infektionsstudien an Zelllinien verschiedener Spezies	62
4.2.1 Infektionsstudien	62
4.2.1.1 Nicht infizierbare Zelllinien	64
4.2.1.2 Transiente Infektionen	64
4.2.1.3 Persistente Infektionen	65
4.2.2 Charakterisierung und Etablierung der mit Schaf-Scrapie infizierten Bov5Sc-Zelllinie	66
4.2.2.1 Ursprung und Wachstumseigenschaften nicht infizierter Bov5-Zellen	66
4.2.2.2 Akkumulation der Prion-Erreger und Stabilität der Infektion	67
4.2.2.3 Selektion infizierter Zellklone	67
4.2.2.4 Empfänglichkeit für TSE	68
4.2.3 Laufverhalten im Western-Blot	69
4.2.4 Proteinase K-Resistenz	70

4.2.5 Wirkung PrP ^{res} inhibierender Substanzen	70
4.2.6 Reinfektion nach Heilung	71
4.2.7 Verifikation der in den Zellen vorhandenen Infektiosität im Mausmodell	72
4.3.7.1 Infektion der Mäuse	72
4.2.7.2 Laufverhalten von PrP ^{Sc} im Western-Blot im Vergleich mit den infizierten Bov5-Zellen	73
4.2.7.3 Infektion der Bov5-Zellen mit mausadaptierter Bov5-Scrapie	74
4.3 TSE-Infektionsstudien an transgenen Zelllinien	75
4.3.1 Entwicklung transgener Zelllinien	75
4.3.2 Infektion von transgenen Zelllinien	76
5 DISKUSSION	78
5.1 Evaluierung und Optimierung der Infektionsbedingungen	78
5.2 TSE-Infektionsstudien an eukaryotischen Zelllinien unterschiedlicher Spezies und Gewebe	81
5.3 TSE-Infektionsstudien an transgenen, das Prion-Protein verschiedener Spezies überexprimierenden Zelllinien	86
5.4 Was kann aus dieser Arbeit geschlossen werden?	88
6 ZUSAMMENFASSUNG	89
7 SUMMARY	91
8 LITERATURVERZEICHNIS	93
9 LEBENSLAUF	121

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
AK	Antikörper
Aminosäuren: A, R, Q, H, V	Adenin, Arginin, Glutamin, Histidin, Valin
AP	alkalische Phosphatase
aqua dest bzw. dH ₂ O	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
bov	bovin
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CD	Circulardichroismus
CEA	Commissariat à l'Énergie Atomique
cm	Zentimeter
C-terminal	Carboxy-terminal
CWD	Chronisch zehrende Krankheit der Hirsche, <i>Chronic Wasting Disease</i>
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
DB	Dot-Blot-Analyse
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DNA	Desoxribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
Dox	Doxyzyklin
dsDNA	Doppelstrang-DNA
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al.	und andere, et alii bzw. et aliae
fCJD	familiäre CJD
FFI	Fatale Familiäre Insomnie (Schlaflosigkeit)
FKS	Fetales Kälberserum
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie
g	Gramm bzw. relative Zentrifugalbeschleunigung
GaM	Ziege anti-Maus, <i>goat anti-mouse</i>
GaRa	Ziege anti-Kaninchen, <i>goat anti-rabbit</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol

GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom
h	Stunde(n)
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horse radish peroxidase</i>
hu	human
HybÜ	Hybridoma-Überstand
iCJD	iatrogene CJD
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
INNT	Institut für Neue und Neuartige Tierseuchenerreger
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IR	Infrarotspektroskopie
IZ	Inkubationszeit
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	Mol
mAK	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
Mubo	Chimäre aus Maus und Rind
Mushp	Chimäre aus Maus und Schaf
NCS	Neugeborenen-Kälberserum, <i>newborn calf serum</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie, <i>nuclear magnetic resonance</i>
Nr.	Nummer
N-terminal	Amino-terminal
OD	optische Dichte
ov	ovin
pAK	polyklonaler Antikörper
Pass.	Passage
pass.	passagiert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PK	Proteinase K
PMCA	zyklische Amplifikation der Protein-Fehlfaltung, <i>protein misfolding cyclic amplification</i>
PO	Peroxidase
poly(A)	Homopolymer aus Adeninen (in Verbindung mit RNA)

poly(dT)	Homopolymer aus Thyminen (in Verbindung mit DNA)
Prnp-Gen	PrP-kodierendes Gen
PrP	Prion-Protein
PrP*	teildenaturierter Zwischenzustand von PrP
PrP ^{0/+}	PrP-hemizygot
PrP ^{0/0}	PrP-defizient
PrP ^C	zelluläres Prion-Protein (C, <i>cellular</i>)
PrP ^{res}	Proteinase K-resistentes Prion-Protein
PrP ^{Sc}	infektiöses Prion-Protein, Prion (Sc, Scrapie)
PrP ^U	PrP ^{Sc} -ähnliche PrP-Form
ra	rabbit
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SAF	Scrapie-assoziierte Fibrillen
Sc	Scrapie
sCJD	sporadische CJD
Sek	Sekunde(n)
TME	Schwammartige Hirndegeneration der Nerze, <i>Transmissible Mink Encephalopathy</i>
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
TUM	Technische Universität München
U	Maßeinheit für Enzymaktivität, <i>Units</i>
u.	und
UV	ultra-violett
v/v	Volumen/Volumen, Volumenprozent
vCJD	neue Variante der CJD
VLA	Veterinary Laboratories Agency
w/v	Gewicht/Volumen, <i>weight/volume</i> , Gewichtsprozent
WB	Western-Blot-Analyse
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Angaben zu Pufferformulierungen und chemischen Formeln finden sich im Materialteil.

Der Trab ist auch eine Krankheit der Schaaf, und ist ansteckend.

Es bekommen auch manche Schaaf den Trab, welches eine Krankheit ist, die daran zu erkennen, wenn sich das Stück, das solchen bekommt, niederlegt, und beißt mit dem Maule an den Füßen und um die Beine, und reibt sich mit dem Kreuze an denen Stangen, verlieret das Gedeihen, frisst auch nicht recht, und verlahmet endlich; sie schleppen sich lange, verzehren sich nach und nach, und zuletzt müssen sie sterben. Welches Vieh diese Staupe bekommt, wird nicht besser. Daher denn das allerbeste ist, daß ein Schäfer, welcher ein Stück von dem Trabe befallen, gewahr wird, es bald wegschafft, und vors herrschaftliche Gesinde schlachtet. Es muß ein Schäfer ein solches Stück Vieh also gleich von dem gesunden Vieh absondern, denn es steckt an, und kann vielen Schaden unter der Herde verursachen.

Johann Georg Leopold 1759

„Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zur Landwirtschaft“

Die Traberkrankheit der Schafe und Ziegen, im angelsächsischen Raum Scrapie, fand ihre früheste Erwähnung bereits zu Beginn des 18. Jahrhunderts. Für den Menschen als nicht infektiös geltend, begründete sich das Interesse an dieser Erkrankung lange Zeit nur auf die wirtschaftlichen Schäden, die ein Krankheitsausbruch für Schafzucht und Wollproduktion bedeuten konnte. Heute gilt Scrapie als Urform der **Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien** (TSE), einer Gruppe stets letal verlaufender neurodegenerativer Erkrankungen, die durch das Auftreten der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) und der Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) in den Mittelpunkt der öffentlichen Aufmerksamkeit gerückt sind. Die intensive Erforschung dieser Krankheitsgruppe in den letzten 30 Jahren trug wesentlich zu unserem heutigen Verständnis von neurodegenerativen Erkrankungen bei. Vor etwa zwanzig Jahren bedeutete die Idee von einem Protein als ursächlichem Agens einer Infektionskrankheit und die Formulierung der „Protein-only“-Hypothese (PRUSINER 1982) eine Revolution bestehender Dogmen in der Infektionsbiologie. Heutzutage wird dieses 1997 mit dem Nobelpreis für Medizin gewürdigte Modell weitgehend akzeptiert und dient als Grundlage der TSE-Forschung. Nichtsdestotrotz sind nach wie vor viele Fragen insbesondere zur Pathogenese der „Prionkrankheiten“, zur Übertragbarkeit über Artgrenzen hinweg und zur Infektiosität von Geweben ungeklärt und Gegenstand intensiver Forschung. Bis heute fehlt ein universelles, sensibles und schnelles Nachweissystem für die Frühdiagnostik. Der Nachweis der Infektiosität erfolgt weiterhin durch Tierversuche (meist *Maus-Bioassays*), deren Nachteil neben ethischen und finanziellen Gesichtspunkten vor allem in einer verhältnismäßig langen Inkubationszeit besteht. Noch immer gibt es für keine der TSE-Erkrankungen eine wirkungsvolle Therapie. Für die Erforschung der TSE-Erkrankungen stehen verschiedene Methoden und ein breites Spektrum an Untersuchungssystemen zur Verfügung. Diese reichen von den Infektionsstudien am Tier über die Zellkulturen bis zu den Studien in zellfreien Systemen.

Die **Zellkultur** verbindet die Vorteile eines *in-vivo*-Modells mit der Schnelligkeit eines durch kurze Generationszyklen charakterisierten Systems. Das macht sie zu einem wesentlichen Bestandteil der Grundlagenforschung zum Verständnis zellulärer und molekularer Vorgänge, die zur Bildung der pathogenen Form des Prion-Proteins (PrP^{Sc}) führen. Darüber hinaus leistet sie einen wertvollen Beitrag in der diagnostischen wie auch der therapeutischen TSE-Forschung. Die Grundlage dafür sind TSE-empfindliche bzw. TSE-infizierte Zelllinien, die sich durch PrP^{Sc}-Produktion und Infektiosität auszeichnen. Erstaunlicherweise scheinen aber nur sehr wenige Zelllinien für Prion-Erreger empfänglich zu sein und diese Empfänglichkeit ist immer nur auf bestimmte TSE-Stämme begrenzt. Während Maus, Schaf und Rind an Scrapie bzw. BSE erkranken, klinische Symptome aufweisen und schließlich sterben, ist es außerordentlich schwierig Zelllinien, die von diesen Tierarten stammen, mit TSE und insbesondere mit TSE-Feldisolaten zu infizieren. Bis heute scheiterten alle Versuche, eine nicht transgene Zelllinie ovinen oder bovinen Ursprungs mit einem Scrapie- oder BSE-Feldisolat zu infizieren.

Ziel dieser Arbeit war deshalb die Identifikation und Infektion neuer TSE-empfindlicher Zelllinien, wobei die Infektion oviner und boviner Zellen mit Scrapie- bzw. BSE-Feldisolaten besondere Priorität haben sollte. Dazu wurden zunächst bestehende Inokulationsverfahren evaluiert und optimiert. Im Anschluss daran erfolgten die Infektionsstudien mit zwei verschiedenen Ansätzen: In einem ersten Ansatz wurde ein breites Spektrum eukaryotischer Zelllinien unterschiedlicher Spezies und Gewebetypen hinsichtlich ihrer Empfänglichkeit für verschiedene TSE-Stämme und -Isolate untersucht. In einem parallelen zweiten Ansatz wurde anhand von neu generierten transgenen Zelllinien untersucht, ob die Kombination aus verschiedenen schon bekannten, mutmaßlich an der Infektion beteiligten Komponenten zu einer erfolgreichen TSE-Infektion von Zelllinien führen kann.

2 Literaturübersicht

2.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) oder auch Prionkrankheiten sind eine Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, die sowohl beim Menschen als auch bei Säugetieren auftreten. Zu den humanen TSE-Erkrankungen gehören die sporadische, die familiäre und die iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJD, fCJD, iCJD; CREUTZFELDT 1920, JAKOB 1921a, JAKOB 1921b, JAKOB 1921c), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom (GSS; GERSTMANN et al. 1936), die Kuru-Krankheit (Kuru; ZIGAS u. GAJDUSEK 1957), die Fatale Familiäre Schlaflosigkeit (FFI; LUGARESI et al. 1986) und die Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD; WILL et al. 1996). Die TSE-Erkrankungen der Tiere sind die Traberkrankheit der Schafe und Ziegen (Scrapie; McGOWAN 1922), die chronisch zehrende Krankheit der Hirsche (CWD; WILLIAMS u. YOUNG 1980, WILLIAMS u. YOUNG 1992), die schwammartige Hirndegeneration der Rinder und rinderartigen Wiederkäuer (BSE; WELLS et al. 1987, JEFFREY u. WELLS 1988, KIRKWOOD et al. 1990), die schwammartige Hirndegeneration der Katzen (FSE; WYATT et al. 1990, PEARSON et al. 1991) und die übertragbare Hirndegeneration der Nerze (TME; BURGER et al. 1965, HARTSOUGH et al. 1965). Experimentell gelang unter anderem eine Übertragung auf Mäuse (CHANDLER 1961), Hamster (CHANDLER u. TURFREY 1972), Rötelmäuse (CARTONI et al. 2005), Wüstenrennmäuse (CHANDLER u. TURFREY 1972), Meerschweinchen (MANUELIDIS et al. 1976), Ratten (GIBBS u. GAJDUSEK 1973), Frettchen (GIBBS u. GAJDUSEK 1973), Schweine (DAWSON et al. 1990, WELLS et al. 2003) und zahlreiche Affenarten (GIBBS u. GAJDUSEK 1973, LASMEZAS et al. 1996). Das klinische Erscheinungsbild dieser Krankheitsgruppe tritt nach einer verhältnismäßig langen Inkubationszeit von mehreren Monaten bis Jahren auf und äußert sich, tierartlich unterschiedlich, in Verhaltensänderungen, Bewegungs- und Sensibilitätsstörungen sowie darüber hinaus beim Menschen in Demenz. Nach dem Auftreten der ersten klinischen Symptome ist der Krankheitsverlauf progressiv und stets letal (BUDKA et al. 1995). Eine wirkungsvolle Therapie existiert bis heute nicht (VANA et al. 2007). Histopathologische Ursache dieser Symptome ist eine spongiforme Degeneration des Gehirns einhergehend mit astrozytärer Gliose und neuronalem Zelltod (BÉRANGER et al. 2001). Manchmal, aber nicht immer, finden sich amyloide Plaques, ähnlich denen, die auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimerschen oder der Parkinsonschen Krankheit vorkommen (SOTO 2003). Im Vergleich zu diesen anderen Protein-Fehlfaltungskrankheiten nehmen die Prionerkrankungen jedoch eine besondere Stellung ein, da sie nicht nur sporadisch oder hereditär bedingt, sondern auch infektiösen Ursprungs sein können. In der Tat konnte schon für fast alle TSE-Erkrankungen gezeigt werden, dass sie, einmal aufgetreten, unabhängig von ihrer ursprünglichen Ätiologie, transmissibel, das heißt natürlich oder experimentell übertragbar sind (HÖRNLIMANN 2001). Das übertragende Agens ist das Prion (PRUSINER 1982). Dessen Hauptkomponente, wenn

nicht sogar der alleinige Bestandteil, ist ein Protein, das als die fehlgefaltete Isoform (PrP^{Sc} , Sc für Scrapie) des körpereigenen Prion-Proteins (PrP^{C} , C für cellular = zellulär) identifiziert wurde. Spontan, durch Mutation oder durch das infektiöse Agens katalysiert, kommt es zu einer strukturellen Umfaltung (Konversionsreaktion) des körpereigenen Proteins in die pathologische Form. Diese zeichnet sich unter anderem durch ihre Stabilität gegen Hitzedenaturierung, Unlöslichkeit und ihre Neigung zur Aggregatbildung aus. Aufgrund einer partiellen Resistenz gegenüber Proteasen (z. B. Proteinase K) wird PrP^{res} (res für Proteinase K resistent) nicht bzw. nur verzögert abgebaut. In den Zellen und Geweben kommt es zur Ablagerung von aus PrP^{res} bestehenden amyloiden Fibrillen, Granulaten oder Plaques, die aber offenbar nicht die direkte Ursache des pathologischen Bildes sind. Nach neueren Hypothesen könnte eher die Beeinflussung der normalen, physiologischen Funktionen von PrP^{C} , vielleicht sogar die Umkehr seiner neuroprotektiven Wirkung in neurotoxische Aktivität, ein kausaler Faktor der Neurodegenerationen sein (HETZ et al. 2003, HARRIS u. TRUE 2006, WESTERGARD et al. 2007).

2.1.1 TSE-Erkrankungen des Menschen

Ätiologisch werden die TSE-Erkrankungen des Menschen in sporadische, erbliche und erworbene Erkrankungen unterteilt. Die sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJD) ist mit einer Inzidenz von $1-2 \times 10^{-6}$ Fällen pro Jahr die häufigste (ca. 85 % der Fälle) humane TSE-Erkrankung (LADOGANA et al. 2005) und tritt im Durchschnitt bei Personen im Alter von über 60 Jahren auf (JOHNSON u. GIBBS 1998). Der Begriff „sporadisch“ impliziert, dass es sich um ein spontanes, keinem auslösenden Faktor zuzuordnendes Geschehen handelt (COLLINS et al. 2004), allerdings ist bei den Menschen, die für Methionin an Position 129 des PrP homozygot sind, eine Entwicklung der Krankheit eher wahrscheinlich (LADOGANA et al. 2005). Für alle familiären Fälle von TSE (fCJD, GSS, FFI) wurde gezeigt, dass sie durch Mutationen im PrP-kodierenden Gen (Prnp-Gen) (Übersichtsartikel COLLINGE 2001) bedingt sind, die eine Umwandlung des zellulären Prion-Proteins in die krank machende Form im Laufe des Lebens begünstigen, und autosomal dominant vererbt werden. Dabei wurden mehr als 20 unterschiedliche Mutationen gefunden, bei denen es sich um Aminosäureaustausche oder um die Insertion zusätzlicher *Octarepeats* (sich wiederholende Sequenzen mit der Länge von acht Aminosäuren) im N-Terminus handelt (PRUSINER u. SCOTT 1997). Zur Gruppe der erworbenen humanen TSE-Erkrankungen zählen die Kuru, die iatrogene CJD und die neue Variante der CJD. Die Kuru verbreitete sich unter dem Stamm der Fore in Papua-Neuguinea durch rituellen Endokannibalismus und Einreibungen mit Hirngewebe von an Kuru verstorbenen Angehörigen (GAJDUSEK u. ZIGAS 1957). Durch das Verbot dieser Riten im Jahr 1954 und eine konsequente Unterbindung des Kannibalismus wurden ab 1959/1960 Neuinfektionen verhindert, so dass die Zahl der Krankheitsfälle sank. Die letzten Fälle von Kuru wurden, nach einer Inkubationszeit von über 50 Jahren, zwischen 1996 und 2004 beschrieben (COLLINGE et al. 2006). Die iatrogene Form von CJD (iCJD) beruht auf einer akzidentiellen Infektion während ärztlicher

Behandlungen. Nachgewiesen wurden Übertragungen durch kontaminierte Transplantate bzw. durch nicht ausreichend dekontaminierte medizinische Instrumente (BERNOULLI et al. 1977, BROWN et al. 2000). Die Variante der CJD (vCJD) wurde 1996 zum ersten Mal beschrieben (WILL et al. 1996) und weicht in verschiedenen Aspekten von den anderen humanen TSE-Erkrankungen ab. Befallene Patienten sind jünger und zeigen eher psychische Symptome sowie einen verlängerten Krankheitsverlauf (WILL et al. 1996). Durch biochemische und neuropathologische Untersuchungen sowie Übertragungsversuche auf Mäuse konnte kurz nach dem ersten Auftreten dieser Erkrankung gezeigt werden, dass diese Variante der CJD durch den BSE-Erreger hervorgerufen wird, wobei als wahrscheinlichste Ursache die Aufnahme BSE-kontaminierter Nahrungsmittel angenommen wird (WILL et al. 1996, BRUCE et al. 1997).

2.1.2 TSE-Erkrankungen der Tiere

Bei den meisten TSE-Erkrankungen der Tiere wird ätiologisch von einer Infektion durch die Aufnahme kontaminierten Futters und/oder von einer horizontalen Übertragung von Tier zu Tier ausgegangen. Allerdings werden vor allem in jüngerer Zeit auch sporadische Erkrankungen diskutiert.

2.1.2.2 Scrapie

Die Traberkrankheit, oder auch Scrapie, der Schafe und Ziegen ist die am längsten bekannte TSE-Erkrankung der Tiere. Sie wurde bereits 1732 erstmals beschrieben (McGOWAN 1922) und kommt heute nahezu weltweit bei kleinen Wiederkäuern vor. Die Symptomatik der Scrapie ist sehr vielfältig. Es kommt zu Verhaltensänderungen, Stressempfindlichkeit, Juckreiz (englisch: *to scrape* = kratzen), Zittern (französisch: „La Tremblante“), zunehmenden Bewegungsstörungen (Traberkrankheit) bis hin zum Festliegen und schließlich zum Tod der Tiere. Die Erregerausscheidung über die Amnionflüssigkeit und die Plazenta scheint bei der Übertragung auf Nachkommen und Kontakttiere aus derselben Herde eine entscheidende Rolle zu spielen (BROTHERSTON 1968, PATTISON et al. 1972, DICKINSON et al. 1974, PATTISON et al. 1974, HOURRIGAN et al. 1979, CAPLAZI et al. 2004). Die Aufnahme des Erregers erfolgt dabei primär oral (PATTISON u. MILLSON 1961, PATTISON et al. 1972, PATTISON et al. 1974, HADLOW et al. 1982), aber möglicherweise auch konjunktival (HARALAMBIEV et al. 1973) oder über Hautläsionen (STAMP et al. 1959). Es kommt zu einer Erregerausbreitung im lymphatischen System, im enterischen und peripheren Nervensystem (GROSCHUP et al. 1996) und schließlich in das ZNS (VAN KEULEN et al. 2000). Hinsichtlich der Empfänglichkeit für eine Erkrankung wurde sowohl bei Schafen als auch bei Ziegen eine starke Abhängigkeit von verschiedenen Genotypen (Polymorphismen im Prnp-Gen) festgestellt (PARRY 1962, GOLDMANN et al. 1990, GOLDMANN et al. 1991, HUNTER et al. 1994a, BOSSERS et al. 1996, HUNTER et al. 1996, GOLDMANN et al. 1996, TRANULIS et al. 1999, VACCARI et al. 2001, VACCARI et al. 2006, BILLINIS 2002). Bis vor wenigen Jahren war bei Schafen nur eine klinische, heute als klassische Scrapie benannte Form bekannt. Seit einigen Jahren werden allerdings

auch sogenannte „atypische“ Scrapiefälle diagnostiziert, die sich in der klinischen Ausprägung und in den biochemischen Eigenschaften von der klassischen Scrapie unterscheiden (Nor98; BENESTAD et al. 2003, BUSCHMANN et al. 2004). Solche atypischen Scrapiefälle wurden mittlerweile in nahezu allen europäischen Ländern und auch außerhalb Europas (Falkland-Inseln) nachgewiesen (GAVIER-WIDEN et al. 2004, ORGE et al. 2004, ONNASCH et al. 2004, EPSTEIN et al. 2005, EVEREST et al. 2006, SEUBERLICH et al. 2007). Erregerisolate aus klassischen Scrapie-Fällen lassen sich nach Passage in Maus-Inzuchtstämmen anhand ihrer Übertragungseigenschaften sowie durch die in diesen Mäusen ausgelösten histopathologischen Veränderungen in verschiedene Stämme differenzieren. Auch die biochemischen Eigenschaften dieser Erregerstämme sind reproduzierbar unterschiedlich. Bemerkenswert ist, dass in einigen natürlicherweise infizierten Schafen auch mehrere klassische Scrapiestämme gleichzeitig vorkommen können (DICKINSON 1976, FRASER 1983). Über Stammvariationen bei den atypischen Scrapie-Fällen ist dagegen bisher noch wenig bekannt.

2.1.2.3 BSE

Die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) der Hausrinder wurde 1986 zum ersten Mal beschrieben (WELLS et al. 1987). Seitdem erkrankten jedoch allein im Vereinigten Königreich annähernd 185.000 Rinder an BSE und weitere 6.500 in anderen EU-Mitgliedstaaten (OiE, Stand Juni 2007). Diese Epidemie und das Auftreten der neuen Variante der CJD beim Menschen, die ursächlich mit der BSE in Verbindung gebracht wurde, führten schließlich Anfang des neuen Jahrtausends zu einer weltweiten BSE-Krise.

Die Entstehung der BSE wird bis heute diskutiert. In Frage kommen eine Übertragung von Scrapie-Erregern aus infizierten Schafen (WILESMITH et al. 1988, WILESMITH et al. 1991) oder eine Übertragung aus ursprünglich spontan an BSE erkrankten Rindern (EDDY 1995). Kürzlich wurde auch eine Übertragung aus mit CJD-kontaminierten menschlichen Geweben (COLCHESTER u. COLCHESTER 2005) diskutiert. Als Übertragungsweg wird die Verfütterung von infektiösem Tiermehl (im Vereinigten Königreich und anderswo) oder Milchaustauschern (Deutschland, Dänemark, Belgien etc.) angenommen (WILESMITH et al. 1988; PAISLEY u. HOSTRUP-PEDERSEN 2004). Aus wirtschaftlichen Gründen wurden im Vereinigten Königreich in den siebziger Jahren die Behandlungstemperaturen und -zeiten bei der Tiermehlherstellung so weit reduziert, dass BSE-Erreger im Tiermehl überleben konnten. Gleichzeitig wurde, zur Deckung des erhöhten Calcium- und Proteinbedarfs, die Verfütterung des Tiermehls an Rinder gesteigert (HÖRNLIMANN 2001).

Die Inkubationszeit bis zum Auftreten der klinischen Symptome dauert bei der klassischen BSE dosisabhängig etwa drei bis fünf Jahre (ANDERSON 1996). Betroffene Tiere fallen zunächst durch Gewichtsverlust und Rückgang der Milchleistung auf. Im weiteren Verlauf der Krankheit zeigen sich Schreckhaftigkeit, Ängstlichkeit, selten Aggressivität, sowie deutliche Störungen im Bewegungsablauf (BRAUN 1998). Der Verlauf der Krankheit erstreckt sich über mehrere Wochen bis Monate. Obwohl die genaue Pathogenese des Erregers noch nicht vollständig aufgeklärt ist, erscheint eine Ausbreitung

über das autonome in das zentrale Nervensystem am wahrscheinlichsten (HOFFMANN et al. 2007). Im Gegensatz zu Scrapie wurden für BSE zunächst keine phänotypischen Varianten beschrieben. Inzwischen wurden jedoch zwei atypische BSE-Varianten identifiziert, die sich von der klassischen Form von BSE unter anderem durch veränderte PrP^{res}-Profile im Western-Blot abgrenzen und möglicherweise spontanen Ursprungs sind (BIACABE et al. 2004, CASALONE et al. 2004, BUSCHMANN et al. 2006, CAPOBIANCO et al. 2007). Die bisher bekannten Polymorphismen im Prion-Protein, das heißt das Vorhandensein von entweder fünf oder sechs *Octarepeats*, haben keinen Einfluss auf die Empfänglichkeit für BSE (HUNTER et al. 1994b). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass Polymorphismen in der Prnp-Promotorregion und im Intron 1 die Prion-Protein-Expression beeinflussen, rasseabhängig gehäuft auftreten und epidemiologisch mit einem höheren BSE-Risiko einhergehen können (HAASE et al. 2007).

Neben der BSE-Erkrankung beim Hausrind existiert eine identische Form bei bestimmten exotischen Wiederkäuern in zoologischen Gärten (JEFFREY u. WELLS 1988, KIRKWOOD et al. 1990). Darüber hinaus wurde im Oktober 2004 bei einer Ziege in Frankreich erstmals die natürliche BSE-Infektion eines kleinen Wiederkäuers nachgewiesen (ELOIT et al. 2005).

2.1.2.4 CWD, FSE, TME

Die chronisch zehrende Krankheit der Hirsche (*Chronic Wasting Disease*, CWD) trat zum ersten Mal 1967 bei in Gefangenschaft lebenden nordamerikanischen Maultierhirschen auf, wurde aber erst 1978 als Transmissible Spongiforme Enzephalopathie erkannt (WILLIAMS u. YOUNG 1980). Im Jahr 1981 wurde dann der erste CWD-Fall bei einem wildlebenden Hirsch gemeldet (SPRAKER et al. 1997). Bis vor kurzem waren natürliche CWD-Infektionen nur bei Edelhirschen (*Cervus*) und Wedelhirschen (*Odocoileus*) bekannt. Inzwischen wurde jedoch auch von einem natürlich aufgetretenen CWD-Fall bei Elchen berichtet (BAETEN et al. 2007). Experimentell konnten unter anderem Elche (KREEGER et al. 2006), Schafe (HAMIR et al. 2006) und Rinder (HAMIR et al. 2005) infiziert werden. Ein horizontaler Übertragungsweg erscheint wahrscheinlich, erste Anhaltspunkte dafür geben experimentelle Infektionen mit infektiösem Speichel (MATHIASON et al. 2006) bzw. die orale Infektion von Elchen (KREEGER et al. 2006).

Die Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE) wurde sowohl für Hauskatzen (WYATT et al. 1990), als auch für im Zoo gehaltene Raubkatzen (WILLOUGHBY et al. 1992, KIRKWOOD u. CUNNINGHAM 1994, KIRKWOOD et al. 1999) beschrieben. Diese Infektionen gehen auf die Verfütterung von BSE-Erreger-haltigem Rindfleisch zurück.

Die Transmissible Spongiforme Enzephalopathie der Nerze (*Transmissible Mink Encephalopathy*, TME) wurde erstmals 1947 in den USA beobachtet (HARTSOUGH et al. 1965), trat später aber auch

in Kanada, in Finnland, in der DDR und in Russland auf (HADLOW et al. 1968, HARTUNG et al. 1970, DANILOV et al. 1974, MARSH et al. 1992). Auch diese TSE-Erkrankung wird mit der Aufnahme kontaminierten Futterfleisches in Verbindung gebracht, wobei als Ausgangsquelle sowohl Scrapie-erkrankte Schafe als auch BSE-erkrankte Rinder diskutiert werden.

2.1.3 Das Prion-Protein

Die Frage nach der tatsächlichen Natur des Erregers der TSEs hat in den vergangenen Jahrzehnten zu intensiven Debatten geführt. Zunächst wurde das infektiöse Agens für ein Virus mit außergewöhnlich langer Inkubationszeit gehalten (*Slow Virus*; SIGURDSSON 1954), aber die Tatsache, dass es sich nicht durch Nukleinsäuren abbauende Verfahren deaktivieren ließ (ALPER et al. 1967), führte schließlich zu der Idee, dass das infektiöse Agens frei von Nukleinsäuren sei und stattdessen aus einem sich selbst replizierenden Protein bestehe (GRIFFITH 1967). Im Jahr 1982 isolierten Prusiner und seine Mitarbeiter ein gegen Proteinasen resistentes Glykoprotein, das sie für den Hauptbestandteil, wenn nicht sogar den alleinigen Bestandteil, des infektiösen Erregers hielten und „Prion“ nannten (für *proteinaceous infectious particle*) (PRUSINER 1982). Es stellte sich heraus, dass dieses Protein nicht aus einem fremden Erreger stammt. Stattdessen handelt es sich um die pathologische Isoform (PrP^{Sc}) eines normalen zellulären Proteins (PrP^C), das vom Körper selbst kodiert wird (OESCH et al. 1985, CHESEBRO et al. 1985, BASLER et al. 1986). Beide Proteine unterscheiden sich allerdings, vermutlich aufgrund unterschiedlicher Tertiärstrukturen, hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften (COHEN u. PRUSINER 1998). Solch ein struktureller Unterschied steht im Widerspruch zu den zentralen Dogmen der molekularen Strukturbiochemie, wonach jedes Protein in einem bestimmten Umgebungsmilieu nur eine einzigartige Raumstruktur einnimmt (ANFINSEN 1973). Die unterschiedliche Konformation von PrP^C und PrP^{Sc} wurde inzwischen jedoch durch zahlreiche Versuchsdaten belegt (CAUGHEY et al. 1991, PAN et al. 1993, SAFAR et al. 1993, RIESNER et al. 1996, WILLE et al. 2002, GOVAERTS et al. 2004).

2.1.3.1 PrP^C

Durch die Generierung von transgenen PrP-defizienten Mäusen (PrP^{0/0}-Mäusen) wurde gezeigt, dass die Expression des zellulären Prion-Proteins für die normale Funktion des Körpers nicht erforderlich ist (BUELER et al. 1992). Allerdings waren diese Tiere resistent gegen eine Prion-Infektion, also ist die Expression von PrP^C für die Pathogenese der TSE-Erkrankungen essentiell (BUELER et al. 1993, MALLUCCI et al. 2002). Das zelluläre Prion-Protein wird durch das Prnp-Gen kodiert, welches inzwischen im Genom einer Vielzahl von Säugetierspezies, Vögeln, Reptilien und Amphibien nachgewiesen wurde (WOPFNER et al. 1999, CALZOLAI et al. 2005, SCHÄTZL 2006). Des Weiteren ergaben Untersuchungen an Hamstern und Mäusen, dass PrP^C in fast allen Körpergeweben exprimiert wird (BENDHEIM et al. 1992, FORD et al. 2002). Sequenzielle Analysen und strukturelle Untersuchungen zeigten, dass es sich innerhalb der Säuger um ein hoch konserviertes Protein handelt

(RIECK et al. 1996, HORNEMANN et al. 2004, LYSEK et al. 2005, GOSSERT et al. 2005). PrP-ähnliche Proteine wurden auch bei Vögeln und Fischen nachgewiesen (HARRIS et al. 1991, GIBBS u. BOLIS 1997). Das primäre Translationsprodukt umfasst bei Säugern je nach Spezies 254-264 Aminosäuren (AS). Es enthält ein Amino-(N-)terminales Signalpeptid (AS 1 bis 22) für den Transport ins Endoplasmatische Retikulum und ein Carboxy-(C-)terminales Signalpeptid (ab AS 232) als Erkennungssequenz für einen Glykosylphosphatidylinositolanker (GPI-Anker). Die posttranslationalen Modifikationen des Proteins umfassen neben der Abspaltung dieser Signalpeptide die Anheftung des GPI-Ankers, die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten und die Glykosylierung von zwei Asparaginen (PRUSINER 1998, HARRIS 2003). Obwohl das Prion-Protein zwei Glykosylierungsstellen (bei der Maus an den Asparaginresten N180 und N196) besitzt, wird immer eine spezies- und zellabhängige Mischung aus nicht-glykosylierten, einfach-glykosylierten und zweifach-glykosylierten Varianten vorgefunden (RUSSELAKIS-CARNEIRO et al. 2002). Die physiologische Signifikanz dieser Unterschiede ist bisher unbekannt. Das reife Protein besteht, je nach Spezies, aus 208-216 Aminosäuren und besitzt in der glykosylierten Form ein Molekulargewicht von 33-35 kDa. Die Längenvarianz zwischen den Spezies begründet sich hauptsächlich durch die unterschiedliche Zahl von *Octarepeats* im N-terminalen Bereich des Proteins (PRUSINER u. SCOTT 1997). Das Prion-Protein kann in zwei unterschiedliche Bereiche unterteilt werden: eine unstrukturierte, flexible Region im Bereich der Aminosäuren 23 bis 125 und eine C-terminale, die Aminosäuren 126 bis 231 umfassende Region, die aus drei alpha-Helices und zwei kurzen, antiparallelen beta-Strängen besteht. Helix 2 und 3 sind durch die Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen stabilisiert (ZAHN et al. 2000). Durch den GPI-Anker ist das Prion-Protein mit der Zellmembran verbunden (STAHL et al. 1987, HARRIS 2003). Diese Verankerung erwies sich als entscheidend für die Ausbildung klinischer Symptome nach einer TSE-Infektion: Die Deletion des GPI-Ankers hatte in transgenen Mäusen zu ausschließlich extrazellulär vorliegenden PrP^{Sc}-Amyloidplaques, aber nicht zu einer Erkrankung mit TSE-typischen Symptomen geführt (CHESEBRO et al. 2005). An der Zelloberfläche findet sich PrP^C hauptsächlich in den cholesterol- und sphingolipidreichen Membrandomänen (Caveolae, *lipid rafts*) (TARABOULOS et al. 1995, VEY et al. 1996, MADORE et al. 1999). Von dort wird es durch Endozytose internalisiert und lysosomal degradiert. Ein Teil davon wird aber auch zur Zelloberfläche rezykliert (HARRIS 2003, SUNYACH et al. 2003). Die eigentliche Funktion des Prion-Proteins wird noch immer diskutiert (zusammengefasst durch WESTERGARD et al. 2007): Als Membranprotein und aufgrund seiner extrazellulären Lage werden ihm Interaktionen zu anderen Transmembranproteinen oder sezernierten Proteinen zugeschrieben. Es konnte eine Beteiligung an transmembranen Signalwegen und bei der synaptischen Übertragung gezeigt werden. Darüber hinaus ist PrP^C offensichtlich an der Zelladhäsion beteiligt. Insgesamt zeigten sich zytoprotektive Effekte bei oxidativem Stress und Apoptose sowie indirekte Auswirkungen auf die neuronale Differenzierung, Reifung und Regeneration. Inwiefern das

Vermögen, mittels der *Octarepeat*-Sequenz Kupfer zu binden, tatsächlich eine Rolle für den Kupferhaushalt der Zelle spielt, ist noch sehr umstritten.

PrP^{0/0}-Mäuse waren unabhängig davon, ob die Gen-Ausschaltung pränatal (BUELER et al. 1992, MANSON et al. 1994, MANSON et al. 1995) oder postnatal (MALLUCCI et al. 2002) erfolgte, überlebensfähig und erschienen in ihrer Entwicklung und ihrem Verhalten weitestgehend normal. Bei näherer Untersuchung wurden jedoch Ausfälle neurophysiologischer und biochemischer Funktionen nachgewiesen. Hierbei handelte es sich um eine gesteigerte neuronale Erregung (COLLINGE et al. 1994, COLLING et al. 1995), um eine abweichende Funktionalität der neuronalen Stickoxid-Synthase (KESHET et al. 1999) und um eine höhere Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress (BROWN et al. 1999). Außerdem wurden bei diesen Tieren Veränderungen im zirkadianen Rhythmus und beim Schlafverhalten *in sensu strictu* beobachtet (TOBLER et al. 1996).

2.1.3.2 PrP^{Sc}

Als Isoformen bestehen PrP^C und PrP^{Sc} aus der gleichen Aminosäuresequenz und es gibt offensichtlich keine unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen (STAHL et al. 1993). Dennoch unterscheiden sich die beiden Formen hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften und hinsichtlich ihrer Struktur. Während PrP^C löslich ist und verhältnismäßig leicht von Proteinasen abgebaut werden kann, zeichnet sich PrP^{Sc} durch Unlöslichkeit in wässrigen Lösungen, die Neigung zur Aggregatbildung und eine ausgesprochen hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen aus. Es ist weitgehend resistent gegen Hitzedenaturierung (HUNTER et al. 1964), UV-Strahlung (ALPER et al. 1966) und partiell gegen den Abbau von selbst aggressiven Proteinasen, wie beispielsweise Proteinase K (PK) (OESCH et al. 1985). Durch die Inkubation mit PK wird ein etwa 68 Aminosäuren umfassender N-terminaler Anteil des PrP^{Sc} abgespalten. Die tatsächliche Größe des abgespaltenen Segmentes ist stammspezifisch und die PK-Schnittstelle liegt bei Scrapie-assoziiertem PrP^{Sc} um 7 bis 15 Aminosäuren weiter N-terminal als die bei BSE-assoziiertem PrP^{Sc} (HAYASHI et al. 2005). Das verbleibende Fragment, ein (bei zweifacher Glykosylierung) etwa 27 bis 30 kDa großes Peptid (PrP27-30), bildet regelmäßige amyloide Stäbchen (Prion-Rods) bzw. „Scrapie-assoziierte Fibrillen“ (SAF) und widersteht, ebenfalls stammspezifisch, einem weiteren Abbau durch Proteinase K über Stunden (KUCZIUS u. GROSCHUP 1999). In der Gelelektrophorese läuft das PK-verdaute Peptid aufgrund seiner Verkürzung schneller als die nicht verdaute Probe. Durch die verschiedenen Glykosylierungsformen (un-, mono-, di-glykosyliert) wird ein Dreibandenmuster detektiert, das als „Glykopprofil“ zur Charakterisierung des Erregers herangezogen werden kann (KUCZIUS et al. 1998).

PrP^{Sc} (infektiös) ist nicht mit PrP^{res} (PK-resistent) gleichzusetzen. PK-resistente PrP^{res}-Moleküle können auch *in vitro* hergestellt werden, ohne dass sie über Infektiosität verfügen (KOCISKO et al. 1994, HILL et al. 1999, BOCHAROVA et al. 2005a). Andererseits erwiesen sich aufgereinigte PrP^{Sc}-Fraktionen als hoch infektiös, aber wenig PK-stabil (SILVEIRA et al. 2005). Da alle Versuche, PrP^{Sc}

unter Erhalt der Infektiosität in Lösung zu bringen, erfolglos blieben, kann davon ausgegangen werden, dass die Infektiosität eng mit der räumlichen Struktur und/oder der Ausbildung von Aggregaten in Verbindung steht. Die Unlöslichkeit des Proteins macht allerdings die Bestimmung der räumlichen Struktur mit den gängigen Verfahren der Röntgenstrukturanalyse bzw. der Kernresonanzspektroskopie (NMR) schwierig. Durch Messungen mittels Infrarotspektroskopie (IR) und Circular dichroismus (CD) konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zur alpha-Helix-reichen Struktur von PrP^C bei der Struktur von PrP^{Sc} der Anteil von beta-Faltblättern überwiegt (CAUGHEY et al. 1991, PAN et al. 1993, SAFAR et al. 1993, RIESNER et al. 1996). Neuere Untersuchungen mit Hilfe der zweidimensionalen Elektronenkristallographie visualisierten eine hexagonale Symmetrie aus wahrscheinlich drei PrP^{Sc}-Molekülen. Dabei scheinen die beta-Faltblätter in Form von beta-Helices im Inneren der hexagonalen Einheit vorzuliegen, während Helix 2 und 3 außen lokalisiert sind. Die Glykosylgruppen befinden sich zwischen den beiden Strukturen (WILLE et al. 2002, GOVAERTS et al. 2004).

2.1.4 Die „Protein-only“-Hypothese

Die „Protein-only“-Hypothese postuliert PrP^{Sc} als infektiöses Agens der Erreger-Replikation. Durch die autokatalytische Konversion von PrP^C in die pathologische Isoform soll sich PrP^{Sc} selbst replizieren können (PRUSINER 1998). Als Ort des Geschehens werden die Caveolae (spezielle *lipid rafts*) vermutet (TARABOULOS et al. 1995, VEY et al. 1996, NASLAVSKY et al. 1997), die sich von der Zellmembran abschnüren und über den Endozytoseweg mit Endosomen fusionieren können. Die „Protein-only“-Hypothese erhielt große Unterstützung durch die Beobachtungen, dass a) PrP^C *in vitro* durch PrP^{Sc} in die fehlgefaltete Form konvertiert werden konnte (GASSET et al. 1992, KOCISKO et al. 1994, NGUYEN et al. 1995), b) hoch aufgereinigtes PrP^{Sc} in Wildtypmäusen krankheitsauslösend war (PRUSINER 1982) und c) sich PrP^C-defiziente Mäuse gegen eine Infektion resistent erwiesen (BUELER et al. 1993). Nichtsdestotrotz fehlt bisher der definitive Beweis, dass zellfrei hergestelltes fehlgefaltetes Protein über Infektiosität verfügt (CHESEBRO 1998, SOTO u. CASTILLA 2004). *In vitro* konvertierte Proteine – gleich ob *Full-length*-Proteine, mutierte Proteine oder Proteinfragmente – zeigten häufig ähnliche Eigenschaften wie PrP^{Sc} (z. B. PK-Resistenz, Aggregatbildung, beta-Faltblattstrukturen) und führten zum Teil in transgenen Tieren auch zur Erkrankung. Jedoch war keines dieser *in vitro* hergestellten Proteine in der Lage, eine Prionkrankheit in Wildtyp-Tieren auszulösen (ZHANG et al. 1995, LEHMANN u. HARRIS 1996, CHIESA et al. 1998, JACKSON et al. 1999, BASKAKOV et al. 2000, LEE u. EISENBERG 2003, BOCHAROVA et al. 2005a). Rekombinant hergestellte N-terminal deletierte PrP-Fragmente, *in vitro* zu Fibrillen zusammengelagert, induzierten eine TSE-ähnliche Erkrankung in transgenen Mäusen, die das gleiche verkürzte Protein überexprimierten (LEGNAME et al. 2004). In der Subpassage war auch eine Infektion von Wildtypmäusen erfolgreich (LEGNAME et al. 2005, BASKAKOV 2007). Kritiker argumentieren jedoch auch hier, dass die erste Passage in überexprimierenden Tieren erfolgte, die

dazu neigen, eine Prionkrankheit auch spontan zu entwickeln (ABID u. SOTO 2006). Eines der jüngsten Argumente für die „Protein-only“-Hypothese ist die Demonstration, dass mittels PMCA (*protein misfolding cyclic amplification*, zyklische Amplifikation der Protein-Fehlfaltung) vollständig *in vitro* hergestelltes PrP^{Sc} in der Lage war, Wildtyp-Hamster zu infizieren (CASTILLA et al. 2005). Da bei der PMCA allerdings Hirnhomogenate an der Herstellung von PrP^{Sc} beteiligt sind, kann auch mit dieser Methode eine mögliche Beteiligung anderer Faktoren am Infektionsprozess letztlich nicht ausgeschlossen werden (ABID u. SOTO 2006).

Obwohl viele Anhaltspunkte für die „Protein-only“-Hypothese sprechen, steht insbesondere die Beteiligung von Nukleinsäuren als Bestandteil des Erregers noch immer zur Diskussion (CHESEBRO 1998, NARANG 2002, MANUELIDIS 2007). Hinsichtlich möglicher Komponenten, die neben PrP in die Übertragung von Prion-Erregern involviert sein könnten, ist es deshalb wichtig, zwischen Faktoren, die Teil des infektiösen Erregers sind, und eventuellen zellulären Faktoren, die in die Konformationsänderung oder auch nur in die Verbreitung der Krankheit involviert sein könnten, zu unterscheiden. Wenn die zusätzlichen Faktoren ein Teil des infektiösen Partikels wären, dann würde die infektiöse Einheit nicht nur aus PrP^{Sc} bestehen. Wenn es sich aber um zelluläre Faktoren handelt, die vermutlich eigentlich mit anderen Funktionen beschäftigt und nur zufällig an der Prionreplikation beteiligt sind, sollten diese zusätzlichen Faktoren (Konversionsfaktoren oder Kofaktoren genannt) nicht als Teil des Erregers betrachtet werden, sondern eher als wirtskodierte Moleküle, die die Prionreplikation fördern (ABID u. SOTO 2006).

Von retroviraler RNA wurde gezeigt, dass sie mit PrP^{Sc} cosedimentiert (MURDOCH et al. 1990, AKOWITZ et al. 1994). In infektiösen Fraktionen waren auch nach der Behandlung mit Nukleasen noch kurze (< 6 kb) RNA-Fragmente nachweisbar (AKOWITZ et al. 1990, SKLAVIADIS et al. 1992) und verschiedene Berichte haben gezeigt, dass PrP^{Sc} mit RNA interagieren kann (WEISS et al. 1997, GABUS et al. 2001, DERRINGTON et al. 2002, ADLER et al. 2003, SUPATTAPONE 2004). Die Spezifität und biologische Relevanz dieser Interaktionen ist aber noch unklar (SAFAR et al. 2005). Obwohl sehr kleine RNAs (~ 25 Nukleotide) prinzipiell in der Lage sind, biologische Prozesse zu verändern (RAMASWAMY u. SLACK 2002), zeigen die Infektionsversuche mit synthetischen Proteinen und vergleichende Untersuchungen zu den Eigenschaften von TSE-Stämmen nach UV-Bestrahlung, dass eine Beteiligung von Nukleinsäuren an der Infektiosität des TSE-Erregers und auch an seinen Stammeigenschaften eher unwahrscheinlich ist (SAFAR et al. 2005). Andererseits konnte festgestellt werden, dass die Prion-Infektion sowohl *in vivo* als auch in Zellkultur einen steigernden Einfluss auf die Expression bestimmter Retroviren haben kann (CARP et al. 1999, STENGEL et al. 2006). In anderen Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, dass wiederum eine Retrovirusexpression die Freisetzung von Prion-Erregern/Infektiosität in den Überstand förderte und damit die Verbreitung

innerhalb der Kultur (LEBLANC et al. 2006). Diese Untersuchungen legen eher eine mögliche Relevanz als Kofaktoren nahe.

Die Existenz von zusätzlichen, im Wirt vorhandenen Kofaktoren wurde erstmals vermutet, als transgene Mäuse, die sowohl humanes als auch murines PrP^C exprimierten, mit humanem TSE-Material inokuliert wurden. Überraschenderweise zeigten sich diese PrP-coexprimierenden Mäuse resistent gegen eine Infektion, während Mäuse, die nur humanes PrP^C überexprimierten, nach der Inokulation mit humanem TSE-Material erkrankten (TELLING et al. 1994). Diese Ergebnisse implizierten, dass murines PrP^C, wenn es zusammen mit humanem PrP^C exprimiert wird, in der Lage ist, die Konversion zu inhibieren. Transgene Mäuse, die ein chimäres, aus murinen und humanen Anteilen bestehendes Prion-Protein exprimierten, waren aber empfänglich für die Infektion mit humanem TSE-Material (TELLING et al. 1995). Daraus wurde geschlossen, dass das murine PrP^C die Konversion des humanen PrP^C inhibiert, indem es an einem zusätzlichen, aber bisher noch nicht näher identifizierten Faktor („Protein X“) bindet. Sollte dieses „Protein X“ mit höherer Affinität an das arteigene PrP^C binden (KANEKO et al. 1997), würde es als Katalysator für die Umfaltung des artfremden PrP^C nicht mehr zur Verfügung stehen. Als mögliche Bindungsstelle von „Protein X“ wurde das C-terminale Ende von PrP^C proklamiert (KANEKO et al. 1997). Im Fall der transgenen, chimären PrP^C-Expression befanden sich jeweils am N- und C-terminalen Ende homologe murine Anteile, so dass „Protein X“ entsprechend der Kofaktorthese effizient binden konnte.

Weitere Hinweise auf Kofaktoren ergaben sich aus genetischen Untersuchungen an Mäusen, wonach neben Prnp weitere Loci die Inkubationszeit der Erkrankung in PrP^{Sc}-inokulierten Tieren modulierten (BRUCE et al. 1991, STEPHENSON et al. 2000). Des Weiteren haben Inokulationsversuche an mit dem mausadaptierten Scrapie-Stamm RML-infizierbaren Na-Zellen (murine Neuroblastomzelllinie) offenbart, dass innerhalb einer Kultur, unabhängig vom PrP^C-Expressionslevel, nur bestimmte Zellklone infizierbar, andere aber resistent sind (BOSQUE u. PRUSINER 2000, ENARI et al. 2001). Auch diese Daten zeigen, dass einige Zellen offenbar über erforderliche Kofaktoren verfügen, andere dagegen nicht (ABID u. SOTO 2006). Anhand biochemischer Untersuchungen mittels zellfreier Konversion (Versuchsansatz: aufgereinigtes PrP^{Sc} aus Hamstergehirnen + immunpräzipitiertes PrP^C mit 3F4-Epitop aus transgenen CHO-Zellen ± Zelllysate ohne PrP^C) wurde nachgewiesen, dass die zusätzliche Zugabe von PrP^C-freien Zelllysaten die Effizienz einer Konversionsreaktion steigern konnte (SABORIO et al. 1999). Insbesondere kleine, hoch strukturierte RNA, RNA von Wirbeltieren und homopolymere Nukleinsäuren wie poly(A) und poly(dT) oder unspezifischen DNAs erleichterten *in vitro* die Konversion von rekombinant hergestelltem bzw. nativem Hamster-PrP^C (CORDEIRO et al. 2001, ADLER et al. 2003, DELEAULT et al. 2003, DELEAULT et al. 2005). Von sulfatierten Glukosaminoglykanen wurde gezeigt, dass sie in der Lage waren, PrP^C zu binden (WARNER et al. 2002) und die PrP^{res}-Formation zu stimulieren (CAUGHEY 1994). Außerdem wurden sie in amyloiden Plaques Scrapie-infizierter Mäuse detektiert (McBRIDE et al. 1998). Die Behandlung von

infizierten Zellen mit Heparinase III verminderte dagegen das PrP^{res}-Niveau (BEN ZAKEN et al. 2003). Ionen beeinflussen sehr wahrscheinlich ebenfalls die Prionreplikation: Wie bereits erwähnt, ist PrP^C durch die *Octarepeat*-Sequenz in der Lage, Kupfer zu binden. Für Kupfer wurde gezeigt, dass es die Inaktivierung von denaturiertem PrP^{Sc} umkehren (McKENZIE et al. 1998) und die PK-Resistenz von PrP^{res} steigern kann (KUCZIUS et al. 2004). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass die Induktion von Kupferchelatkomplexen den Ausbruch der Erkrankung verzögern kann (SIGURDSSON et al. 2003). Im Gegensatz dazu wurde aber auch gezeigt, dass durch die Zugabe von Kupfer die Infektion von N2a-Zellen (HIJAZI et al. 2003) und die Aggregation von rekombinantem PrP^C zu amyloiden Fibrillen (BOCHAROVA et al. 2005b) verhindert werden kann. Des Weiteren inhibierte die Zugabe von CuCl₂ und ZnCl₂ *in vitro* die Amplifikation von PrP^{res} (OREM et al. 2006).

2.1.5 Konversionsmodelle

Der molekulare Mechanismus, durch den es zur Konversion von PrP^C in die pathologische Isoform kommt, ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Ausgehend von der „Protein-only“-Hypothese wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen. Diese Modelle bauen zum Teil aufeinander auf und wurden nachfolgenden Erkenntnissen entsprechend modifiziert. Im Wesentlichen existieren jedoch drei Modellsysteme: Das „template assistance“-Modell (COHEN u. PRUSINER 1998), das „cooperative Prusiner“-Modell (EIGEN 1996) und das „seeded nucleation“-Modell (ROCHET u. LANSBURY 2000).

Das frühe „Heterodimer“-Modell (PRUSINER 1991, COHEN et al. 1994) ging davon aus, dass sich ein PrP^{Sc}-Molekül mit einem PrP^C-Molekül, oder vielmehr einem teildenaturierten Zwischenzustand (PrP*), der mit PrP^C im Gleichgewicht steht, zu einem „aktivierten“ Heterodimer verbinden kann. PrP* soll bei diesem Vorgang in PrP^{Sc} umgewandelt werden. Das daraus resultierende Homodimer würde anschließend in zwei PrP^{Sc}-Moleküle dissoziieren, die wieder für eine Reaktion mit PrP* zur Verfügung stünden. Dieser Vorgang entspräche einer linearen Autokatalyse, die zu einer exponentiellen Akkumulation von PrP^{Sc} führen würde, wobei das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite von PrP^{Sc} liegen müsste (EIGEN 1996). Später wurde dieses Modell um einen Faktor X (TELLING et al. 1995) ausgeweitet, der die Konversionsreaktion als Kofaktor unterstützen sollte. Dies führte zur Version des „Template assistance“-Modells: Faktor X bindet an PrP^C bzw. PrP*. PrP^{Sc} bindet den Komplex aus PrP* und Faktor X und induziert die Entstehung des PrP^{Sc}-Homodimers, während Faktor X wieder frei wird (COHEN u. PRUSINER 1998).

Kinetischen Berechnungen (EIGEN 1996) zufolge erschien allerdings ein Mechanismus nach dem 1994 beschriebenen Heterodimer-Modell sehr unwahrscheinlich. Der Vorgang der spontanen Konversion müsste sehr langsam ablaufen, um nicht auch ohne eine Infektion zur Akkumulation von PrP^{Sc} zu führen. Andererseits wäre dadurch eine enzymatisch katalytische Beschleunigung um den

Faktor 10^{15} notwendig, um eine Krankheit ausbrechen zu lassen. Aus diesen Überlegungen heraus entstand ein modifiziertes Modell. Dieses sieht vor, dass nicht ein einzelnes PrP^{Sc} -Molekül den Vorgang der Umfaltung katalysiert, sondern mehrere Moleküle, nach dem Prinzip der Allosterie, in Kooperation („kooperatives Prusiner“-Modell, EIGEN 1996). Damit wäre der katalytische Effekt eines einzelnen PrP^{Sc} -Moleküls geringer als im ersten Modell und die Umfaltung würde nach Erreichen einer Schwellenwertkonzentration initiiert.

Das Modell der „keimabhängigen Polymerisation“ („seeded nucleation“-Modell, COME et al. 1993, JARRETT u. LANSBURY 1993, ROCHET u. LANSBURY 2000) folgt den Prinzipien der linearen Kristallisation zur Bildung von Fibrillen und amyloiden Plaques. Das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion liegt in diesem Fall, im Gegensatz zu einer teildenaturierten, beta-faltblattreichen und damit PrP^{Sc} -ähnlichen PrP -Form (PrP^{U}), unter physiologischen Bedingungen auf Seiten von PrP^{C} . Der kritische Schritt ist die Entstehung eines Nukleus oder Kristallisationskeimes. Erst dieser verschiebt das Gleichgewicht zugunsten von PrP^{U} . Es kommt zur Anlagerung weiterer Moleküle und zur Ausbildung von Fibrillen oder auch Plaques. Die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Aggregation von PrP^{U} ist sehr gering, könnte aber durch Mutationen im Pmp-Gen erhöht werden. Im Fall einer Prioninfektion wirkt PrP^{Sc} als infektiöser Nukleus und initiiert die weitere Reaktion. Durch den Zerfall der wachsenden Aggregate in kleinere Einheiten entstehen neue Infektionskeime, was zu einer exponentiellen Zunahme an PrP^{Sc} führt. Diese Vorstellung korreliert mit anderen Untersuchungen, nach denen aggregierte Partikel aus 14-28 PrP^{Sc} -Molekülen, durch ein optimales Verhältnis von Konversionsaktivität und Stabilität, offenbar die höchste Infektiosität besitzen (SILVEIRA et al. 2005).

2.1.6 Übertragbarkeit der TSE-Erkrankungen

TSE-Erkrankungen sind übertragbar, die Effizienz der Übertragung und die Inkubationszeit hängen jedoch von bestimmten Faktoren ab. Nach heutigem Verständnis spielt, neben dem Übertragungsweg und der Infektionsdosis, vor allem die Interaktion zwischen dem infektiösen PrP^{Sc} und dem PrP^{C} der infizierten Spezies (Aminosäuresequenzen, Konformationen) eine entscheidende Rolle. Außerdem wird der Einfluss möglicher Kofaktoren diskutiert, die entweder Teil des infektiösen Agens oder zellulären Ursprungs sein könnten. Hinsichtlich einer effizienten Interaktion zwischen PrP^{Sc} und PrP^{C} sind bei den Prionkrankheiten zwei Phänomene zu beobachten: die Existenz von verschiedenen Erregerstämmen, die unterschiedliche Krankheitsphänotypen innerhalb einer Spezies hervorrufen können (BRUCE u. FRASER 1991), und die sogenannte „Speziesbarriere“ (PATTISON 1965), die die Übertragung von Prion-Erregern zwischen verschiedenen Spezies einschränkt. Beide Phänomene sind eng miteinander verknüpft.

Das Phänomen der Stammunterschiede wurde 1961 erstmalig Mal erkannt, als Schafscrapie-Isolate experimentell auf Ziegen übertragen und seriell passagiert wurden. Zwei separate Inokulate riefen innerhalb einer unselektierten Ziegenherde zwei auffallend unterschiedliche klinische Erscheinungsformen, entweder das „Scratching“-Syndrom oder das „Nervous“-Syndrome, hervor und diese Symptome blieben über mehrere Passagen erhalten (PATTISON u. MILLSON 1961). Inzwischen werden durch die Charakterisierung in Inzuchtmauslinien bereits über zwei Dutzend Scrapie-Stämme unterschieden (GROSCHUP u. KUCZIUS 2001). Die charakterisierenden Merkmale eines Stammes sind 1. die klinischen Symptome im natürlichen Wirt, 2. die Inkubationszeit im natürlichen Wirt bzw. in Inzuchtmausstämmen, 3. die Übertragbarkeit auf Inzuchtmausstämme, 4. die histopathologischen Läsionsprofile in Inzuchtmausstämmen, 5. das Inaktivierungsverhalten, 6. die PK-Resistenz und die PK-Spaltstelle von PrP^{Sc}, sowie 7. das Glykopprofil von PrP^{Sc}. Diese Merkmale bleiben erhalten, solange Wirt, Infektionsweg und Infektionsdosis konstant bleiben (BRUCE u. FRASER 1991, BIRKETT et al. 2001), können sich aber – je nach Stabilität des Erregerstammes – ändern, wenn einer dieser Parameter variiert wird. Die molekulare Basis der verschiedenen Erregerstämme ist noch nicht vollständig geklärt, ihr scheinen aber unterschiedliche Konformationszuständen zugrunde zu liegen (BESSEN u. MARSH 1994, TELLING et al. 1996, SAFAR et al. 1998, KUCZIUS u. GROSCHUP 1999, PARCHI et al. 2000, PERETZ et al. 2002), die möglicherweise durch verschiedene Glykosylierungen (ENDO et al. 1989, PAN et al. 2001), durch Polymorphismen in der Aminosäuresequenz (COLLINGE et al. 1996) oder durch zusätzliche Kofaktoren beeinflusst werden.

Als Speziesbarriere (PATTISON 1965) wird die verminderte Empfänglichkeit einer Tierart gegenüber der Infektion mit TSE-Erregern aus einer anderen Spezies bezeichnet. Sie zeigt sich in einer geringeren Infektionseffizienz und einer verlängerten Inkubationszeit. Unter Umständen kann diese länger als die natürliche Lebenszeit eines Individuums sein, so dass es nicht zum Krankheitsausbruch kommt (PRIOLA 1999). Erklärt wird das Phänomen der Speziesbarriere hauptsächlich durch Unterschiede in der Prion-Protein-Sequenz von der Ausgangs- und der neuen Wirtstierspezies (SCOTT et al. 1993, KOCISKO et al. 1995, HORIUCHI et al. 2000). Dabei sind bestimmte Bereiche bedeutsamer als andere (PRUSINER 1991, KOCISKO et al. 1995) und es konnte gezeigt werden, dass schon der Austausch einzelner Aminosäuren in einer kritischen Region ausschlaggebend für eine erfolgreiche oder erfolglose Konversion sein kann (PRIOLA u. CHESEBRO 1995, VANIK et al. 2004, KUPFER et al. 2007). Neben der Aminosäuresequenz kommt aber vor allem auch der Konformation des jeweiligen Erregerstammes eine entscheidende Rolle zu. Dies zeigen z. B. Infektionsversuche in Mäusen mit zwei Hamsterscrapie-Stämmen (HY: Hyper, DY: Drowsy) identischer Aminosäuresequenz, die sich aber konformationell unterscheiden: Während ein Stamm in in der ersten Passage noch eine längere Inkubationszeit und erst in der zweiten Passage nach seiner Adaptation kürzere Inubationszeiten und veränderte Erregerstammeigenschaften aufwies, war bei dem anderen Stamm keine Adaption notwendig (CHEN u. GAMBETTI 2002, PERETZ et al. 2002).

Durch serielle Passagen kann ein Erreger an eine neue Spezies adaptiert werden. Während die erste Passage ineffizient und verzögert abläuft, zeichnet sich schon die zweite Passage durch eine erhöhte Infektionseffizienz und eine verkürzte Inkubationszeit aus, die sich in den weiteren Passagen stabilisiert (PATTISON 1966). Bei diesem Vorgang kann es unter Umständen zum Erscheinungsbild eines neuen, in seinen Merkmalen vom ursprünglichen Erreger abweichenden Stammes kommen (PATTISON 1966, DICKINSON 1976, KIMBERLIN 1979, RIDLEY u. BAKER 1996, PERETZ et al. 2002). Die Mechanismen der Adaptation sind noch nicht genau bekannt. Auch hier werden jedoch zwei Modellsysteme, möglicherweise auch in Kombination, favorisiert: Einerseits könnte die Bindung von PrP^{Sc} an das nichthomologe PrP^C eine de novo Formation von PrP^{Sc} provozieren, das dann in seinen Eigenschaften von den Merkmalen des ursprünglichen Erregerstammes abweicht. Andererseits könnte eine kleine Subpopulation aus mehreren TSE-Erregern innerhalb des Inokulates in einer neuen Spezies bevorzugt repliziert werden. Ein ineffizienter Ablauf der Konversion während der Adaptationsphase würde in beiden Fällen die verlängerten Inkubationszeiten und den geringen PrP^{res}-Gehalt nach der ersten, aber den verstärkten PrP^{res}-Gehalt und die kürzere Inkubationszeit nach der zweiten Passage erklären (PERETZ et al. 2002).

2.2 Zellkulturen in der TSE-Forschung

In den letzten Jahrzehnten wurden bedeutende Fortschritte zum Verständnis der Prionkrankheiten gemacht. Dies geschah durch die Nutzung eines breiten Spektrums an Systemen, vom Tiermodell über die Zellkultur bis hin zur zellfreien Konversion. Untersuchungen am Tier erlauben Studien in einem komplexen Gesamtorganismus, in dem alle essentiellen Komponenten in allen denkbaren Varianten, einschließlich möglicher Kofaktoren enthalten sind, allerdings können einzelne Variablen nur schwer verändert werden. Darüber hinaus sind Tierversuche sehr zeitaufwändig und mit hohen Kosten verbunden und sollten aus ethischen Gründen soweit wie möglich vermieden werden. Mit der zellfreien Konversion kann die molekulare Basis der Prion-Konversion exakt analysiert werden. Jedoch bleibt diese Methode, obwohl die Pufferbedingungen den *in-vivo*-Verhältnissen nachempfunden werden, ein artifizielles Vergleichsmodell. Die Zellkultur verbindet die Vorteile eines *in-vivo*-Modells mit der Schnelligkeit eines durch kurze Generationszyklen charakterisierten Systems. Sie beschäftigt sich mit der Zellbiologie und der Physiopathologie von Prionkrankheiten, mit den unterschiedlichen Eigenschaften und Verteilungen der TSE-Stämme und mit der Übertragung von Prion-Erregern über Speziesgrenzen hinweg. Darüber hinaus leistet sie einen wertvollen Beitrag bei der Suche nach potentiellen Therapeutika sowie bei der Identifizierung möglicher Kofaktoren für die Prionreplikation. All das macht sie zu einem wesentlichen Bestandteil der Grundlagenforschung und fördert maßgeblich die Entwicklung der diagnostischen und der therapeutischen Forschung (SOLASSOL et al. 2003).

2.2.1 TSE-infizierte Zellen

Die Grundlage der Zellkultur bilden TSE-empfindliche bzw. TSE-infizierte Zelllinien, welche sich durch PrP^{Sc}-Produktion und Infektiosität auszeichnen. Ganz im Gegensatz zum Tiermodell erweisen sich aber die meisten Zelllinien gegen Infektionsversuche mit TSE-Erregern resistent (RUBENSTEIN et al. 1984, BUTLER et al. 1988). Nur wenige Zelllinien scheinen überhaupt für eine Infektion empfänglich zu sein und diese Empfänglichkeit ist in der Regel auf sehr spezifische Erregerstämme begrenzt. Des Weiteren werden nur wenige Zellen einer Kultur tatsächlich infiziert (RACE et al. 1987, RACE et al. 1988, BOSQUE u. PRUSINER 2000) und oft ist die Infektion nicht stabil, sondern wird nach einer gewissen Zeitspanne wieder „verloren“ (BOSQUE u. PRUSINER 2000, ENARI et al. 2001, VORBERG et al. 2004).

Prinzipiell existieren zwei Modelle, PrP^{Sc}-replizierende Zelllinien zu erhalten: Einerseits ist es möglich, Zelllinien aus den Geweben von bereits infizierten Tieren zu etablieren, andererseits können nicht infizierte, aber empfindliche Zelllinien in der Kultur mit TSE-Material inokuliert werden. In der Regel hat sich die Applikation von Hirnhomogenaten bewährt (BOSQUE u. PRUSINER 2000), aber auch eine teilweise Aufreinigung von Prion-Erregern vor der Inokulation (CLARKE u. MILLSON 1976) und Zell-zu-Zell-Infektionen wurden beschrieben (SCHAETZL et al. 1997, KANU et al. 2002, DLAKIC et al. 2007).

Die ersten Versuche TSE-infizierte Zelllinien zu etablieren, wurden bereits 1965 unternommen (GUSTAFSON u. KANITZ 1965); aber erst 1970 gelang es, durch die Kultivierung von Gehirnzellen aus einer mit dem mausadaptierten Scrapie-Stamm RML (Chandler) infizierten Maus, eine nachweislich PrP^{res} produzierende Zelllinie (SMB, *scrapie mouse brain*) zu etablieren (CLARKE u. HAIG 1970a, CLARKE u. HAIG 1970b). Mit den SMB-Zellen war somit bewiesen, dass die Replikation von Prion-Erregern prinzipiell in Zellkulturen möglich ist. Die erste tatsächliche Infektion einer Zelllinie erfolgte 1976 durch die erfolgreiche Inokulation der murinen Fibroblastenzelllinie L929 mit RML (CLARKE u. MILLSON 1976). In den darauf folgenden Jahren wurden weitere neuronale und auch nicht-neuronale murine Zelllinien mit verschiedenen mauspassagierten Scrapiestämmen infiziert (MARKOVITS et al. 1983, RACE et al. 1987, BUTLER et al. 1988, SCHAETZL et al. 1997, NISHIDA et al. 2000, FOLLET et al. 2002, ARCHER et al. 2004, CRONIER et al. 2004, DLAKIC et al. 2007). Unter diesen ist die für den mausadaptierten Scrapie-Stamm RML empfindliche murine Neuroblastomzelllinie N₂a (RACE et al. 1987, BUTLER et al. 1988) die am besten beschriebene und auch heute noch am meisten in der TSE-Forschung genutzte Zelllinie. Durch serielle Klonierung wurden aus der ursprünglichen Zelllinie hoch infizierte (ScN₂a-Zellen), hoch empfindliche aber auch gegen Prion-Erreger resistente Zellklone selektiert (BOSQUE u. PRUSINER 2000, KLOEHN et al. 2003) und inzwischen existieren sogar PrP^C überexprimierende Sublinien, die sich mit unterschiedlichen mauspassagierten Scrapiestämmen infizieren lassen (NISHIDA et al. 2000).

Durch die erfolgreiche Infektion von Rattenzellen mit murinen Prion-Erregern wurde 1984 erstmalig eine Speziesbarriere in der Zellkultur durchbrochen (RUBENSTEIN et al. 1984, RUBENSTEIN et al. 1992) und durch die Infektion von Hamsterzellen (HaB) mit an Hamster adaptierter Scrapie entstand 1990 die erste nicht mit murinen Prion-Erregern infizierte Zelllinie (SchHaB, TARABOULOS et al. 1990). Die transgene Rov-Zelllinie (VILETTE et al. 2001), eine Kaninchennierenepithelzelllinie, die ovines Prionprotein überexprimiert, war die erste Zelllinie, die erfolgreich mit natürlicher Schafscrapie infiziert werden konnte, und in jüngerer Zeit wurde gezeigt, dass sich auch neuronale Stammzellen als Modellsystem für eine Prion-Infektion eignen können (GIRI et al. 2006, MILHAVET et al. 2006).

2.2.2 Empfänglichkeit, Resistenz und Erregerspezifität

Aus heutiger Sicht erfordert die Infektion von Zelllinien bzw. die effiziente Vermehrung der Prion-Erreger ein Zusammenspiel noch weitestgehend unbekannter molekularer Faktoren in der Zelle und gelingt deshalb bisher nur mit wenigen Zelltypen (ETESSAMI et al. 2005). Unbestritten ist auch hier, dass PrP^C absolut notwendig für die Erreger-Vermehrung ist. Aber auch die Überexpression von PrP^C allein garantiert keinen Infektionserfolg (CHESEBRO et al. 1993). Stattdessen sind die Infektionen, die auf PrP^C-überexprimierenden Zelllinien beruhen, unabhängig davon, ob PrP^C einer homologen (NISHIDA et al. 2000, MAAS et al. 2007) oder einer heterologen Spezies (VILETTE et al. 2001) exprimiert wird, eher einer gesteigerten Infektionseffizienz bei vorhandener Empfänglichkeit geschuldet. Diese könnte einerseits daraus resultieren, dass initial mehr Zellen infiziert werden, oder aber dass eine schnellere Replikation in den einzelnen Zellen erfolgt (GIRI et al. 2006). Eine weit größere Rolle für die erfolgreiche Infektion einer Zelllinie spielt die sequenzielle bzw. stammabhängige Entsprechung des zellulären PrP^C und des jeweiligen PrP^{Sc} (SCOTT et al. 1992, PRIOLA u. CHESEBRO 1995, BOSQUE u. PRUSINER 2000). Der Nachweis unterschiedlicher Läsionsprofile in den Gehirnen TSE-infizierter Tiere führte zu der Vermutung, dass unterschiedliche Erreger bestimmte Hirnregionen bzw. bestimmte neuronale Zellpopulationen bevorzugen würden („Target-Theorie“, BRUCE et al. 1989). Tatsächlich wurden in unterschiedlichen Zelltypen auch verschiedene Glykosylierungsformen von PrP^C nachgewiesen (BERINGUE et al. 2003). Da es sich bei Zelllinien aber in der Regel um klonale Monokulturen handelt, ist es sehr wahrscheinlich, dass ein Großteil der resistenten Zelllinien nicht dem mit dem Erreger kompatiblen, favorisierten Zelltyp entspricht. Die Tatsache, dass in TSE-empfindlichen Kulturen immer nur ein bestimmter Anteil der Zellen infiziert wird, bei Wildtypen etwa 1 % der Kultur (RACE 1991), bei selektierten oder transgenen Zellen bestenfalls 30 % der Kultur (BOSQUE u. PRUSINER 2000, NISHIDA et al. 2000), spricht außerdem dafür, dass zelluläre Kofaktoren bei der Infektion von Zellen eine wesentliche Rolle spielen, aber nicht notwendigerweise in allen Zelltypen und allen Zellklonen gleichermaßen vorhanden sein müssen (ABID u. SOTO 2006). Die ungleiche Verteilung solcher Faktoren könnte prinzipiell auch für die Entwicklung von Sublinien mit unterschiedlicher Erregerempfindlichkeit (RUBENSTEIN et al. 1992, BIRKETT et al. 2001) verantwortlich sein.

Obwohl Scrapie und BSE die natürlichen Wirte von Schaf, Ziege und Rind darstellen, stehen bisher ausschließlich TSE-infizierte Zelllinien zur Verfügung, die auf dem zellulären Hintergrund von Maus, Hamster, Ratte und Kaninchen basieren. Die erfolgreiche Infektion von Rov-Zellen, eine Kaninchennierenepithelzelllinie, die ovines Prionprotein überexprimiert (VILETTE et al. 2001), hat gezeigt, dass die Replikation von PrP^{Sc} aus Feldisolaten in Zellkulturen prinzipiell möglich ist. Allerdings konnte bis heute keine nicht-transgene Zelllinie mit einem ovinen Scrapie-Feldisolat infiziert werden. Weiterhin ist der Erreger von BSE zwar *in vivo* auf zahlreiche Spezies übertragbar, eine mit BSE-infizierte Zelllinie existiert jedoch noch nicht. Eine Identifikation von Zelllinien aus Schaf oder Rind, die für Scrapie- oder BSE-Feldisolate empfänglich sind und ihre Etablierung als stabil infizierte Kultur, könnte zur Klärung des Infektionsmechanismus und damit wesentlich zu einem besseren Verständnis der molekularen und zellulären Vorgänge der TSE-Infektion bei Wiederkäuern beitragen. Darüber hinaus würden Möglichkeiten eröffnet, schneller und effektiver nach essentiellen Faktoren und potentiellen Therapeutika zu suchen, als das mit den bisherigen Zelllinien möglich ist.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 TIERE

Zur Verifikation von in den Zellen vorhandener Infektiosität im Mausmodell wurden jeweils sechs Tiere von den drei folgenden Mauslinien verwendet:

- TgbovXV (transgene, bovines PrP^C exprimierende Mauslinie) BUSCHMANN et al. 2000
 - TgshpIX (transgene, ovines PrP^C exprimierende Mauslinie) KUPFER et al. 2007
 - C57BL/6 (Wildtyp-PrP^C exprimierende Mauslinie) Charles River Laboratories, Sulzfeld
- Die drei Mauslinien werden am Friedrich-Loeffler-Institut in der Tierzucht gehalten.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in den nachfolgenden Tabellen 3.1 bis 3.5 aufgeführt.

3.1.1.1 Zelllinien aus der Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts

Alle in Tabelle 3.1 aufgeführten Zelllinien wurden aus der Zellbank (ZB) des Friedrich-Loeffler-Institutes (FLI) bezogen. In der Zellbank werden die einzelnen Linien unter einer spezifischen Nummer (ZB-Nr.) und ihrem Liniennamen geführt. Für die vorliegende Studie wurden die bovinen und ovinen Linien durchgehend nummeriert (z. B. Bov1: bovine Linie 89 KM-R2, fetales Milzgewebe).

Tab. 3.1 Zelllinien aus der Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts

ZB-Nr.	Name	Spezies	Alter	Organ	Umsetzrate	Medium
89	Bov1/KM-R2	Rind	fetal	Milz	1 : 2	21
93	Bov2/KZ-R	Rind	fetal	Zunge	1 : 2	21
96	Bov3/KNN-R	Rind	fetal	Nebenniere	1 : 2	21
98	Bov4/KMU-R	Rind	neonatal	Muskel	1 : 2	21
154	Bov5/PES	Rind	unbekannt	unbekannt	1 : 2	5
239	Bov6/KHY	Rind	neonatal	Hypophyse	1 : 2	21
244	Bov7/KOP-R	Rind	neonatal	Oesopharynx	1 : 2	21
84	Bov8/MDBK	Rind	adult	Niere, BVDV +	1 : 6	5
261	Bov9/MDBK	Rind	adult	Niere	1 : 6	5
456	Bov10/GGE-R	Rind	embryonal	Gehirn	1 : 2	5
458	Bov11/GRE-R	Rind	embryonal	Gehirn	1 : 2	21
970	Bov12/FKD-R1	Rind	fetal	Darm	1 : 2	28
972	Bov13/FP-R	Rind	fetal	Pansen	1 : 2	28
979	Bov14/FRD-R	Rind	fetal	Darm	1 : 2	28
11	Shp1/PT	Schaf	unbekannt	Niere	1 : 6	5
17	Shp2/PO	Schaf	adult	Niere	1 : 6	5
39	Shp3/SFN-R	Schaf	neonatal	Niere	1 : 2	21
42	Shp4/SFH-R	Schaf	neonatal	Hoden	1 : 2	21
43	Shp5/SFT-R	Schaf	neonatal	Thymus	1 : 3	21

ZB-Nr.	Name	Spezies	Alter	Organ	Umsetzrate	Medium
150	Shp6/SPLW -R	Schaf	Lamm	Plexus chorioideus	1 : 6	5
151	Shp7/SLU -L	Schaf	adult	Lungentumor	1 : 6	5
157	Shp8/OFC	Schaf	fetal	Kornea	1 : 2	28
174	Shp9/SE-R	Schaf	embryonal	Vollembryo	1 : 2	21
201	Shp10/ESP	Schaf	embryonal	Plexus chorioideus	1 : 2	21
213	Shp11/SCP	Schaf	embryonal	Plexus chorioideus	1 : 2	21
279	Shp12/SP-R	Schaf	adult	Plexus chorioideus	1 : 2	5
120	ZLU-R	Ziege	Fetal	Lunge	1 : 2	5
130	ZLI-R	Ziege	fetal	Lippe	1 : 2	21
242	ENG-R	Nerz	embryo	Gehirn	1 : 2	21
252	KG-R	Katze	neonatal	Gehirn	1 : 2	21
378	WSG-R	Wildschwein	fetal	Vollgehirn	1 : 4	5
266	CBS	Hausschwein	fetal	Cerebellum	1 : 4	5
565	SGW-R	Hausschwein	Absatzferkel	Stammhirn	1 : 4	5
766	DWM-R	Damwild	embryonal	Magen	1 : 2	28
822	REH-R	Reh	fetal	Hoden	1 : 2	28
821	REN-R	Reh	fetal	Niere	1 : 2	28
824	RPS-R	Reh	fetal	Pansenschleimhaut	1 : 2	28
197	HEK293	Mensch	embryonal	Niere	1 : 4	19
221	Oligo	Mensch	embryonal	Oligodendroglia	1 : 4	5
439	K562	Mensch	unbekannt	Leukemiezellen	1 : 4	28
675	U373	Mensch	adult	Astrozytom	1 : 2	5
14	L929	Maus (Klon 929)	adult	Bindegewebe	1 : 6	5
132	N2a	Maus	adult	Neuroblastom	1 : 3/1 : 10	5
229	N2a	Maus	adult	Neuroblastom	1 : 3	5
864	M ^{0/0}	Maus (PrP ^{0/0})	neonatal	Gehirn	1 : 2/1 : 10	19
900	MG bov	Maus (^{0/0} PrPbovine)	embryonal	Gehirn	1 : 3	28
969	MGov-R	Maus (^{0/0} PrPovine)	embryonal	Gehirn	1 : 4	23a
969	MGov-R	Maus (^{0/0} PrPovine)	embryonal	Gehirn	1 : 3	28
134	CHO-K1	Hamster	adult	Ovar	1 : 6	28
109	RK13	Kaninchen	adult	Epithelzellen	1 : 4	21
750	RLI-R	Kaninchen	adult	Leber, immortalisiert	1 : 6	5
795	JKM	Kaninchen	jung	Milz	1 : 2	28
830	T34	Kaninchen	adult	Milz	1 : 2	5
901	KMK-R	Kaninchen	adult	Knochenmark	1 : 2	5

3.2.1.2 Transgene Zelllinien auf dem zellulären Hintergrund von Hpl3-4-Zellen

Durch Dr. M. Geißen standen für diese Arbeit transgene Zelllinien zur Verfügung (s. Tab. 3.2), die das Prion-Protein verschiedener Spezies auf dem zellulären Hintergrund muriner PrP-defizienter Hpl3-4-Zellen (KUWAHARA et al. 1999) überexprimierten.

Tab. 3.2 Transgene Zelllinien auf dem zellulären Hintergrund von Hpl3-4-Zellen

Hpl3-4+ PrP ^C	Spezies	Alter	Gewebe	Umsetzrate	zur Verfügung gestellt von:
Hpl3-4Mu	Maus (^{0/0} PrPmurin)	unbekannt	Hippokampus	1 : 10	Alle Hpl3-4+PrP ^C -Zellen wurden durch M. Geißen (FLI, Riems) zur Verfügung gestellt.
Hpl3-4Mink	Maus (^{0/0} PrPmink)	unbekannt	Hippokampus	1 : 10	
Hpl3-4Can	Maus (^{0/0} PrPcanin)	unbekannt	Hippokampus	1 : 10	
Hpl3-4Shp	Maus (^{0/0} PrPovin)	unbekannt	Hippokampus	1 : 10	
Hpl3-4Mushp	Maus (^{0/0} PrPmushp)	unbekannt	Hippokampus	1 : 10	

3.2.1.3 Kontrollzelllinien

Als Kontrollzelllinien wurden TSE-infizierte (s. Tab. 3.3), TSE-empfindliche (s. Tab.3.4) und TSE-resistente (s. Tab. 3.5) Zelllinien verwendet.

Tab. 3.3 TSE-infizierte Kontrollzelllinien

TSE-infiziert	Spezies	Infektion	Umsetzrate	Medium	zur Verfügung gestellt von:
ScN _{2a}	Maus	RML	1 : 2	30	S. Priola (Rocky Mountain Laboratories, Montana)
SMBRC040	Maus	RML	1 : 2	199	TSE Resource Centre, Compton Newbury

Tab. 3.4 TSE-empfindliche Kontrollzelllinien

TSE-infizierbar	Spezies	Umsetzrate	Medium	zur Verfügung gestellt von:
N _{2a} Gilch	Maus	1 : 10	30	S. Gilch/H. Schätzl (TUM, München)
N _{2a} PK1 PCK	Maus	1 : 10	30	P. Klöhn/J. Collinge (Institute of Neurology, London)
N _{2a} 132	Maus	1 : 3	5	R. Riebe (FLI, Riems)
N _{2a} 229	Maus	1 : 3	5	R. Riebe (FLI, Riems)
Hpl3-4 Maus	Maus (^{0/0} PrP ^{murin})	1 : 10	9	M. Geißen (FLI, Riems)
Rov-Zellen*	Kaninchen (PrP ^{ov})	1 : 4	22 + Dox	D. Vilette/H. Laude (INRA, Jouy en Josas)

Tab. 3.5 TSE-resistente Kontrollzelllinien

TSE-resistent	Spezies	Umsetzrate	Medium	zur Verfügung gestellt von:
N _{2a} R33 PCK	Maus	1 : 10	30	P. Klöhn/J. Collinge (Institute of Neurology, London)
M0/0 864	Maus (PrP ^{0/0})	1 : 10	5	A. Buschmann (FLI, Riems)
Hpl3-4	Maus (PrP ^{0/0})	1 : 10	9	I. Vorberg/H. Schätzl (TMU, München)
Rov-Zellen*	Kaninchen (PrP ^{ov})	1 : 4	22 - Dox	D. Vilette/H. Laude (INRA, Jouy en Josas)

* Die transgene Rov-Zelllinie basiert auf dem zellulären Hintergrund der Kaninchennierenepithelzelllinie RK13. Die Expression ovinen Prion-Proteins wird durch ein „Tet-on“-System gesteuert, das heißt durch die Zugabe von Doxycyclin (Dox) zum Nährmedium der Zellen induziert.

3.2.2 Gehirnmateriale

Die Herstellung der für die Inokulation bestimmten Homogenate erfolgte aus Gehirnen von an TSE erkrankten Tieren oder von Tieren, die durch immunhistochemische oder immunbiochemische PrP^{res}-Nachweisverfahren TSE-positiv getestet worden waren, darüber hinaus aus PrP^{res}-negativen Kontrolltieren.

3.2.2.1 Mauspassagierte Scrapie-Stämme

- Der mausadaptierte Scrapie-Stamm 127S (VILETTE et al. 2001) wurde in Tg338-Mäusen vermehrt und freundlicherweise von H. Laude (INRA, Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy en Josas) für die Inokulationsstudien zur Verfügung gestellt.
- Der mausadaptierte Scrapie-Stamm 22F wurde in Tg20-Mäusen vermehrt, nachdem diese zuvor durch SMB[22F]-Zellen (Scrapie Mouse Brain, SMB) infiziert worden waren. Die infizierten Zellen

waren ursprünglich vom TSE Resource Centre am Institute for Animal Health (Compton, Newbury) erworben und in der Zellkultur des INNT/FLI als permanent TSE-infizierte Zelllinie weitergezogen worden.

- Der mausadaptierte Scrapie-Stamm 22L (C398 USA) wurde in C57BL/10-Mäusen vermehrt und freundlicherweise von I. Vorberg und H. Schätzl (TUM, Technische Universität München) für die Inokulationsstudien zur Verfügung gestellt.
- Der mausadaptierte Scrapie-Stamm ME7 (DICKINSON u. MEIKLE 1969) wurde ursprünglich von M.E. Bruce (Institute for Animal Health, Edinburgh) zur Verfügung gestellt und am FLI in C57BL/6-Mäusen vermehrt.
- Der mausadaptierte Scrapie-Stamm RML (CHANDLER 1961) wurde ursprünglich von C. Weissmann (The Scripps Research Institute, Florida) zur Verfügung gestellt und am FLI in CD1-Mäusen vermehrt.

3.2.2.2 Schaf-Scrapie-Isolate

Bei den ovinen Scrapie-Inokulaten handelte es sich um Hirnmaterial von Schafen, die im Rahmen der Verdachtsfalldiagnostik (FLI, Referenzlabor für BSE und Scrapie) oder als Kohortentier aus einem Scrapie-Ausbruch in der Immunhistochemie (IHC) TSE-positiv befundet worden waren. Alle bis auf zwei der verwendeten Isolate waren der klassischen Scrapie zuzuordnen, unterschieden sich aber hinsichtlich ihres Genotyps und/oder Ausbruchs. Bei den zwei atypischen Scrapie-Isolaten handelte es sich um Vertreter des Stammes Nor98. Tabelle 3.6 führt die verwendeten Scrapie-Isolate im Detail auf.

Tab. 3.6 Scrapie-Feldisolate aus dem Schaf

Isolat	PrP-Genotyp	Ausbruch	Scrapie-Typ
S66/04	ARQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S71/04	ARQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S73/04	ARQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S74/04	ARQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S75/04	ARQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S76/04	ARQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S77/04	ARQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S91/04	ARQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S92/04	ARQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S93/04	ARQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S94/04	ARQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S95/04	ARQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S96/04	ARQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S101/04	ARQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S102/04	ARQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S107/04	ARQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S120/04	ARQ/ARQ	Frankfurt/O.	klassische Scrapie
S126/04	ARQ/ARQ	Frankfurt/O.	klassische Scrapie
S1/06	ARQ/ARQ	Niedersachsen	klassische Scrapie

Isolat	PrP-Genotyp	Ausbruch	Scrapie-Typ
S90/04	AHQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S100/04	AHQ/ARQ	Stendal	klassische Scrapie
S13/04	VRQ/ARH	Oldenburg	klassische Scrapie
S6/06	ARQ/VRQ	Thüringen	klassische Scrapie
S12/04	ARQ/VRQ	Niedersachsen	klassische Scrapie
S52/04	ARQ/VRQ	Erfurt	klassische Scrapie
S27/05	ARR/AHQ	Brandenburg	atypische Scrapie AIV(Nor98)
S16/06	ARR/ARR	Thüringen	atypische Scrapie AIV(Nor98)

3.2.2.3 Ziegen-Scrapie-Isolate

Für die Inokulation der caprinen Zelllinien wurde Hirnmaterial aus der Medulla einer am FLI (vormals BFAV, Tübingen) experimentell mit Schaf-Scrapie infizierten Ziege (Tier Nr. 362) verwendet. Für deren Inokulation war Gehirngewebe des Schafbockes „Hessen 1“ verwendet worden. „Hessen 1“ gehörte zu einer Schafherde aus Hessen, in der im Jahr 1991 Scrapie festgestellt wurde. Das Tier stand seit diesem Ausbruch in der BFAV zur Beobachtung ein und erkrankte im Jahr 1993 ebenfalls an Scrapie.

3.2.2.4 BSE-Isolate vom Rind

Für die Inokulation mit bovinem BSE-Material wurde Gehirngewebe von drei BSE-positiven Rindern vermischt. Dabei handelte es sich um gesund geschlachtete Tiere (R13/04 eingesandt vom Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit Oberschleißheim, R14/04 eingesandt vom Tiergesundheitsdienst Bonn sowie R18/04 eingesandt vom Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Detmold), die im Rahmen der Verdachtsfalldiagnostik in der Immunhistochemie (IHC) positiv befundet worden waren. Alle drei Isolate wurden der klassischen Form der BSE zugeordnet.

3.2.2.5 Mauspassagierte BSE-Isolate

Das freundlicherweise von D. Mathews (VLA, Veterinary Laboratories Agencies, Weybridge) zur Verfügung gestellte, bovine BSE-Isolat BSE-UK-A-26 wurde sowohl in TgbovXV-Mäusen als auch in C57BL/6-Mäusen vermehrt und für die Inokulation von MGbov-Zellen genutzt.

3.2.2.6 TSE-negative Kontrollgewebe

Als Negativkontrollmaterial wurde Hirngewebe von nicht infizierten Tieren verwandt.

- Das Hirngewebe vom Rind entstammte einem gesund geschlachteten Tier, das dem INNT/FLI vom Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Mecklenburg Vorpommern als Negativkontrollmaterial zur Verfügung gestellt worden war.
- Das ovine Hirngewebe entstammte einem im Institut für Tierzucht und Haustiergenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen gezogenen und später vom FLI erworbenen Tier.
- Das murine Kontrollgewebe wurde dem Gehirn einer, der Kleintierzucht des Friedrich-Loeffler-Institutes entstammenden, Tg20-Maus entnommen.

3.2.3 Bakterien

E.coli XL₁-Blue

Stratagene, Heidelberg

3.2.4 Plasmide

pcDNA3

Invitrogen, Karlsruhe

3.2.5 Plasmidkonstrukte

Für die Transfektion von RK13-Zellen (s. Kap. 4.3.1) standen durch Dr. M. Geißen (FLI-INNT, Riems) vier Plasmidkonstrukte zur Verfügung. Diese enthielten die kodierende Sequenz für das Prion-Protein von Nerz, Hund, Schaf bzw. einer Maus/Schaf-Chimäre (PrPMushp: chimäres murines PrP mit ovinen Anteilen zwischen Positionen 94 und 188 der murinen Sequenz) und waren in den pcDNA3.1/Zeo⁺-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert worden.

3.2.6 Nukleinsäuren und Oligonukleotide

Für die Herstellung des chimären PrP^C-Mubo-Konstruktes (PrPMubo: chimäres murines PrP mit bovinen Anteilen zwischen Positionen 94 und 188 der murinen Sequenz) wurde durch L. Kupfer (FLI-INNT, Riems) genomische DNA zur Verfügung gestellt, die aus der Schwanzspitze einer Tgmubo XIII-Maus (BUSCHMANN 1998) gewonnen worden war.

Nukleosidtriphosphate

dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Promega, Mannheim

Oligonukleotide:

BamHI/Maus Zelle

Invitrogen, Karlsruhe

5'-CGG GAT CCA CAA TGG CGA ACC TTG GC-3'

Maus + XhoI

Invitrogen, Karlsruhe

5'-CCC TCG AGG GAA GGC CTC CC-3'

3.2.7 Enzyme

Alsever's Trypsin-Versen (ATV)

Zellbank/ FLI, Riems

Deoxyribonuclease I (DNaseI)

Roche, Mannheim

N-Glycosidase F

Roche, Mannheim

Proteinase K (PK)

Sigma-Aldrich, Steinheim

Ribonuclease A (RNase)

Sigma-Aldrich, Steinheim

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)

Roche, Mannheim

Taq-DNA-Polymerase

Qiagen, Hilden

T4-DNA-Ligase

Roche, Mannheim

Restriktionsendonukleasen:

<i>Bam</i> HI	NEB, Frankfurt
<i>Xho</i> I	NEB, Frankfurt
<i>Eco</i> RI	NEB, Frankfurt

3.2.8 Elektrophoresemarker

DNA-Längenstandard 100 bp	NEB, Frankfurt
BenchMark™ Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe

3.2.9 Antibiotika

Tabelle 3.7 gibt eine Übersicht über in der Zell- oder Bakterienkultur verwendeten Antibiotika und deren jeweilige Arbeitskonzentration.

Tab. 3.7 Antibiotika

Antibiotika	Stammlösung	Eingesetzte Konzentration in der		Herkunft
		Zellkultur	Bakterienkultur	
Ampicillin	100 mg/ml	1 µl/ml	1 µl/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Doxycyclin	5 mg/ml	0,2 µl/ml	-----	Sigma-Aldrich, Steinheim
Geneticin	50 mg/ml	20 µl/ml	-----	Invitrogen, Karlsruhe
Kanamycin	50 mg/ml	1 µl/ml	-----	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin	126 mg/ml	1 µl/ml	-----	Sigma-Aldrich, Steinheim
Streptomycin	250 mg/ml	0,5 µl/ml	-----	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetrazyklin	12,5 mg/ml	-----	0,06 µl/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zeocin	100 mg/ml	10 µl/ml bzw. 3 µl/ml	1 µl/ml	Invitrogen, Karlsruhe

3.2.10 Antikörper, Antiseren und Konjugate

Die in den Tabellen 3.8, 3.9 und 3.10 aufgeführten Antikörper wurden in den angegebenen Verdünnungen in, für die jeweiligen Detektionsassays erforderlichen, Inkubationspuffern angesetzt.

- Western-Blot (WB) und Dot-Blot (DB): 5 %ige (w/v) Magermilch (Magermilchpulver in PBST)
- „Zell-ELISA“: 5 %ige (w/v) Magermilch (Magermilchpulver in TNT)

Tab. 3.8 Mono- und polyklonale Antikörper gegen das Prion-Protein

Name	AK*	Epitop**	Eingesetzte Konzentration im		Herkunft***
			WB und DB	„Zell-ELISA“	
ICSM18	mAK	143-153 huPrP	1 : 10000	1 : 5000	D-Gen, London
6H4	mAK	144-152 huPrP	1 : 10000	1 : 5000	Prionics AG, Schlieren
3F4-Berlin	mAK	109-112	1 : 3000	1 : 1000	M. Beekes, RKI, Berlin (HybÜ)
L42	mAK	145-163 ovPrP	1 : 100	1 : 50	M.H. Groschup, FLI, Riems (HybÜ)
P4	mAK	89-104 ovPrP	1 : 1000	1 : 100	M.H. Groschup, FLI, Riems (HybÜ)
SAF84	mAK	160-170	1 : 1000	-----	J. Grassi, CEA, Gif-sur-Yvette Cedex
Ra10	pAK	107-122 ovPrP	1 : 3000	1 : 1000	Groschup, FLI, Riems (Kaninchenserum)

* mAK/pAK: monoklonaler/polyklonaler Antikörper; ** hu/ovPrP: humanes/ovines Prion-Protein; *** HybÜ: Hybridoma-Überstand; RKI: Robert Koch-Institut, CEA: Commissariat à l'Énergie Atomique

Tab. 3.9 Alkalische Phosphatase gekoppelte Konjugate

Name	Epitop	Eingesetzte Konzentration im		Herkunft
		WB und DB	„Zell-ELISA“	
Ziege anti-Maus IgG (GaMAP)	H + L-Ketten	1 : 3000	1 : 2000	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Kaninchen IgG (GaRaAP)	H + L-Ketten	1 : 3000	1 : 2000	Dianova, Hamburg

Tab. 3.10 Peroxidase gekoppelte Konjugate

Name	Epitop	Eingesetzte Konzentration im		Herkunft
		WB und DB	„Zell-ELISA“	
Ziege anti-Maus IgG (GaMPO)	H + L-Ketten	1 : 3000	-----	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Kaninchen IgG (GaRaPO)	H + L-Ketten	1 : 3000	-----	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Maus IgG (GaMHRP)	H + L-Ketten	1 : 10000	-----	Promega, Mannheim
Ziege anti-Kaninchen IgG (GaRaHRP)	H + L-Ketten	1 : 10000	-----	Promega, Mannheim

3.2.11 Medien

3.2.11.1 Zellkultur-Nährmedien

Bis auf das Medium 199 wurden alle für die Kultur der Zellen verwendeten Nährmedien (s. Tab. 3.11) von der Zellbank des FLI bezogen. In der Zellbank des FLI erfolgt die Herstellung der mit hauseigenen Nummern betitelten Fertignährmedien aus Pulvermedien der Firma Gibco (Karlsruhe).

Tab. 3.11 Zellkultur-Nährmedien

Nr.	Grundmedium	Salzbasis	Serum	Abweichende Inhalte
5	MEM“H“ + MEM“E“ 1 : 1 / NEAS	Hanks + Earle	10 % FKS	-----
9	DMEM	Earle	10 % FKS	-----
19	RPMI 1640	-----	10 % FKS	-----
21	MEM“H“ + 850 mg/l NaHCO ₃	Hanks	10 % FKS	-----
22	MEM“E“	Earle	10 % FKS	-----
23a	MEM Glasgow BHK 21	Earle	10 % FKS	2 ml/l essentielle AS/Kaseine/Hefeextrakt
28	IscoveDMEM + F12 1 : 1	-----	10 % FKS	-----
30c	Opti-MEM	-----	-----	-----
Medium 199 (1x) + Earle + L-Glutamin			GIBCO, Karlsruhe	

- Zur Verminderung der Kontaminationsgefahr durch Bakterien wurden die Nährmedien mit Penicillin und Streptomycin, dazu gegebenenfalls auch Kanamycin oder Ampicillin supplementiert.
- Das Nährmedium „30c“ wurde serumfrei geliefert und durch gesondertes FKS (fetales Kälberserum; Invitrogen, Karlsruhe), das zuvor einer Chargentestung hinsichtlich seines Einflusses auf den PrP^{res}-Gehalt der Zellen unterzogen worden war, ergänzt.
- Das Nährmedium 199 wurde sowohl durch 10 % FKS und als auch durch 5 % NCS (*newborn calf serum*; Invitrogen, Karlsruhe) ergänzt. Letzteres wurde zuvor ebenfalls einer Chargentestung hinsichtlich seines Einflusses auf den PrP^{res}-Gehalt der Zellen unterzogen.
- Das Nährmedium 22 wurde, um das Tet-on-System in den Rov-Zellen (s. Tab. 3.4, 3.5) und damit ihre PrP^c-Expression zu aktivieren, mit Doxycyclin versetzt.

- Der Zusatz von Geneticin oder Zeocin in die Kulturmedien transfizierter Zellen diente der Selektion Plasmid exprimierender Zellen. Ab einer Zelllinien-abhängigen Konzentration sind Antibiotika für Zellen toxisch. Plasmide enthalten ein oder mehrere Antibiotika-Resistenzgene, durch deren Expression die transfizierten Zellen im Gegensatz zu den nicht transfizierten Zellen eine entsprechende Resistenz erhalten.

3.2.11.2 Zellkultur-Einfriermedium

10 % (v/v) DMSO

in entsprechendem Zellkulturmedium

3.2.11.3 Bakterienkultur-Nährmedien

LB (Lysogeny-Broth) - Medium

1 % (w/v) Bactotrypton

5 % (w/v) Hefeextrakt

1 % (w/v) NaCl

autoklavieren (121 °C, 20 min)

LB-Agar

dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 15 g Agar-Agar pro Liter hinzufügen

3.2.12 PrP^{res} inhibierende Substanzen

Für die Inhibition von PrP^{res} und die „Heilung“ von TSE-infizierten Zellkulturen wurden die in Tab. 3.12 aufgeführten PrP^{res}-Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen verwendet.

Tab. 3.12 PrP^{res} inhibierende Substanzen

Inhibitoren	Stammlösung	Einsatz	Endkonzentration	Herkunft
Imatinib	10 mM	1 µl/ml	10 µM (589,7 µg/L)	Novartis, Basel
Na-Pentosansulfat	50 mg/0,5 ml	1 µl/ml	100 mg/L	bene Arzneimittel GmbH, München
Suramin	200 µg/ml	1 µl/ml	0,1 µM (200 µg/L)	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.2.13 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Puffer und Lösungen in aqua dest angesetzt.

Acrylamidgele

Trenngel, 16 %ig (zwei Gele)

aqua dest	3,0 ml
1,5 M TrisHCl (pH 8,8)	3,75 ml
30 % Bis-Acrylamid	8,0 ml
10 % SDS	750 µl
10 % APS	100 µl
TEMED	10 µl

Sammelgel (zwei Gele)

aqua dest	6 ml
0,5 M TrisHCl (pH 6,8)	2,5 ml
30 % Bis-Acrylamid	1,3 ml
10 % SDS	500 µl
10 % APS	200 µl
TEMED	20 µl

Alkaline Phosphatase (AP) Conjugate Substrate Kit (Biorad)

(für eine 96-Loch-Platte/ Ansatz unmittelbar vor Gebrauch):

aqua dest	5,5 ml
AP Farbentwicklungspuffer	220 µl
AP Farbreagenz A	55 µl
AP Farbreagenz B	55 µl

APS 10 %

1 g Ammoniumpersulfat
in 10 ml aqua dest

Auftragepuffer für Agarosegele (10x Stop)

0,2 M EDTA pH 8,8
25 % (w/v) Saccharose
0,25 % (w/v) Bromphenolblau

Blottingpuffer für Western-Blot, pH 8,3

25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % (v/v) Methanol
0,2 % (w/v) SDS

3 Material

Ca/Mg-Puffer für kompetente Zellen

75 mM CaCl₂

25 mM MgCl₂

steril filtrieren, bei 4°C lagern

CVL-Puffer (10x)

10 % (w/v) SDS

0,25 M Tris

25 % (v/v) β-Mercaptoethanol

15 % (w/v) Saccharose

0,05 % (w/v) Bromphenolblau

pH 6,8 mit HCl einstellen, bei -20 °C lagern

Denaturierungspuffer für Deglykosylierung

5 % (w/v) SDS

10 % (w/v) β-Mercaptoethanol

DNAse

100 mg Deoxyribonuclease I

5 ml TE-Puffer (pH 8)

5 ml Glycerin (96 %)

Elektrophoresepuffer (10x)

0,25 M Tris

1,92 M Glycin

10 % (w/v) SDS

Ethidiumbromidbad

1 µg Ethidiumbromidstammlösung (1 %ig)

pro 1 ml aqua dest

in dunkler Umgebung lagern

Gleevec[®] (Imatinib 10 mM)

100 mg Gleevec[®] (1 Kapsel)

in 5,9 ml DMSO

3 Material

Guanidinium-Hydrochlorid

6 M Guanidinium-Hydrochlorid
in 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)

Guanidinium-Thiocyanat

3 M Guanidinium-Thiocyanat
in 10 mM TrisHCl (pH 8)

Lysispuffer

50 mM TrisHCl (pH8)
150 mM NaCl
0,5 % Na-deoxycholat
0,5 % Triton X-100

Magermilch

für Western- und Dot-Blot: 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS-Tween
für „Zell-ELISA“: 5% (w/v) Magermilchpulver in TNT

Maus-Lysis-Puffer

50 mM KCl
10 M TrisHCl (pH 9,0)
0,45 % (v/v) NP40
0,45 % (v/v) Tween 20

Natriumhypochlorid (2,4 %ig)

1 L Natriumhypochlorid (12 %ig)
4 L aqua dest

Na₂HPO₄-Puffer (0,5 M; pH 8,9 – 9,2)

89 g Na₂HPO₄
auf 1L aqua dest

NaH₂PO₄-Puffer (0,5 M; pH 4,0-4,5)

69 g NaH₂PO₄
auf 1L aqua dest

3 Material

Natriumphosphat-Puffer (0,5 M; pH 7,2)

Na₂HPO₄-Puffer (0,5 M; pH 8.9 - 9,2)

pH-Wert von 7,2 mit NaH₂PO₄-Puffer (0,5 M; pH 4,0 - 4,5) einstellen

Natronlauge (2 M)

80 g Natriumhydroxid

in 1 L aqua dest.

Paraformaldehyd (5 %)

5% (w/v) Paraformaldehyd

1mM MgCl₂

in PBS

PBS (10x)

1,4 M NaCl

27 mM KCl

65 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

15 mM KH₂PO₄

pH 6,9 überprüfen; autoklavieren (121 °C, 20 min)

PBS-Tween

1 L 1x PBS

0,1 % (v/v) Tween 20

PMSF

100 mM PMSF

in 2-Propanol

dunkel bei 4 °C lagern

Powerstrippuffer

0,2 M Glycin

1 % (w/v) SDS

pH 2,0 mit konzentrierter Salzsäure einstellen

Proteinase K (10x)

10 mg PK

in 1 ml aqua dest

3 Material

RNAse

1 mg Ribonuclease A
in 10 ml aqua dest

SDS (10 %)

1 g Natriumdodecylsulfat (SDS)
in 10 ml aqua dest

Saccharose 5 %

5 g Saccharose
in 100 ml aqua dest

Suramin

2 mg Suramin
in 10 ml aqua dest

TAE-Puffer (20x)

0,8 M Tris
0,4 M Natriumacetat
40 mM EDTA
pH 8,3 mit Essigsäure einstellen

TE-Puffer (pH 8,0)

10 mM TrisHCl (pH 8,0)
1 mM EDTA (pH 8,0)

TNT

150 mM NaCl
10 mM Tris
0,05 % Tween 20

TrisHCl (1,5 M; pH 8,8)

90,86 g Tris
in 500 ml aqua dest
pH 8,8 mit konzentrierter Salzsäure einstellen

TrisHCl (1 M; pH 7,4)

121 g Tris

in 1 L aqua dest

pH 7,4 mit konzentrierter Salzsäure einstellen

TrisHCl (0,5 M; pH 6,8)

30,29 g Tris

in 500 ml aqua dest

pH 6,8 mit konzentrierter Salzsäure einstellen

TritonX-100 (0,4 %)

0,4 % (v/v) TritonX-100

in PBS

Trypanblau 0,4 %

0,4 g Trypanblau

in 100 ml aqua dest

3.2.14 Komplettsysteme (Kits)

QIAprep Spin Miniprep Kit

Qiagen, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit

Qiagen, Hilden

QIAquick PCR Purification Kit

Qiagen, Hilden

3.2.15 Chemikalien und biologische Produkte

Acrylamid-Stammlösung (30%) mit Bisacrylamid (0,8%)

Roth, Karlsruhe

Agar-Agar

MP Biomedicals, Eschwege

Agarose

Invitrogen, Karlsruhe

Alkaline Phosphatase (AP) Conjugate Substrate Kit

BioRad, München

Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Merck, Darmstadt

Bactotrypton (Caseinhydrolysat)

Oxoid, Basingstoke, UK

β-Mercaptoethanol

Sigma-Aldrich, Steinheim

Bovines Serum Albumin (BSA)

NEB, Frankfurt

Bromphenolblau Natriumsalz

Riedel-de Haen, Seelze

Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)

Merck, Darmstadt

Chloroform

Roth, Karlsruhe

Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)

Roth, Karlsruhe

Dimethyl Sulphoxid (DMSO)

Sigma-Aldrich, Steinheim

ECL (Enhanced Chemilumineszenz) Detection Reagent	Amersham, Braunschweig
EDTA (Di-Natrium EDTA)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol p. a.	Roth, Karlsruhe
Ethanol (technisch)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Glycerol (Glycerin 96 %)	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidiumhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Guanidiumthiocyanat	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Humana, Herford
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumhypochlorid	Roth, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Nonidet P40 (NP40)	Roche, Mannheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyoxyethylensorbitanmonolaureat (Tween 20)	Merck, Darmstadt
Saccharose (Succrose)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SuperFect Transfection Reagenz	Qiagen, Hilden
Tris	Invitrogen, Karlsruhe
TritonX-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe

3.2.16 Verbrauchsmaterialien

Bakterienkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
Blotmembranen (Immobilon-P Transfer Membran)	Millipore Corp., Bedford, USA
Einfrierplatten (96-Well Deep Well Plates)	Brand, Wertheim
Einfrierröhrchen für Zellen (Kryo-Röhrchen 1,5ml)	Greiner, Frickenhausen
Filtermembraneinsätze (Nunc Tissue Culture Inserts)	Nalge Nunc, New York, USA
Glasbehälter (Flaschen, Bechergläser, Erlenmeyerkolben)	ILMABOR, Ilmenau
Kanülen (Einmalkanülen, gelb 20 G, 0,9 mm)	Terumo, Leuven, B
Kunststoffküvetten (UVette®)	Eppendorf, Hamburg
Messzylinder	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
PCR-Probenröhrchen (PCR 8-Strip Tubes)	Eppendorf, Hamburg
Photopapier für Videoprinter (K65HM-CE/ KP65HM-CE)	Mitsubishi Electric, Ratingen
Röntgen-Entwicklerlösung (Roentogen liquid)	Tetenal AG, Norderstedt
Röntgenfilm (ECL-Hyperfilm™)	Amersham, Braunschweig
Röntgen-Fixierlösung (Roentogen Superfix)	Tetenal AG, Norderstedt
Schiffchen (Reagenzreservoir für Mehrkanalpipetten)	Brand, Wertheim
Vakuumfiltrationssystem (Express™ PLUS, 0,22 µm)	Millipore Corp., Bedford, USA
Whatman®Chromatographiepapier	Whatman, Maistone, UK
Zellkulturgefäße (Flaschen, Schalen, Platten)	Corning, New York, USA
Zentrifugenröhrchen:	
Polyallomer Quick Seals 13 x 51 mm	Beckmann Coulter, Stuttgart
Polycarbonate Centrifuge Tubes 13 x 51 mm	Beckmann Coulter, Stuttgart
Röhrchen, konisch 15 ml und 50 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht

3.2.17 Geräte

Abzug (Typ 2-450-DAHD)	Köttermann, Uetze-Hänigsen
Bestecke (Klemmen, Pinzetten, Scheren, usw.)	Heiland, Hamburg
Blotapparatur (Trans-Blotapparatur, Semi-Dry)	BioRad, München
Brutschränke:	
Bakterienkulturbrutschrank (Incucell)	MMM Medcenter, Schwerte
Zellkulturbrutschrank (Steri-Cycle Co2 Inkubator)	Thermo Forma, Marietta, USA
Dot-Blotter (Hybridisierungstransfergerät)	Roth, Karlsruhe
Einfrierbox (Nalgene™Cryo 1 °C Freezing Container)	Nalge Nunc, New York, USA
Elispotreader (Bioreader® - 4000)	BioSys, Karben
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Gasbrenner:	

Bunsenbrenner (Labogaz 206)	Camping Gaz AG, Givisiez, CH
Sicherheitsbrenner (gasprofi1)	WLD-TEC, Göttingen
Gefriertruhe (Ultra Low Temperature Freezer MDF792)	Sanyo Electric Co., Osaka, J
Gelelektrophoreseapparaturen:	
Mini-Protean® II Multi Casting Chamber	BioRad, München
ReadySub-Cell GT Cells	BioRad, München
Inkubationsöfen für Membranen:	
Mini-Brutschrank (Thermexact 55)	Leo Kübler GmbH, Karlsruhe
Universalofen (Typ UNB 200)	Memmert GmbH, Schwabach
Inkubationsschalen für Membranen	Eigenbau, FLI, Tübingen/ Riems
Mikroskope :	
Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Axiovert 200 (einschließlich AxioCam MRc5)	Zeiss, Göttingen
pH-Meter (MP220)	Mettler Toledo, Gießen
Photodokumentationssystem	Intas, Göttingen
Photometer (Biophotometer 8,5 mm)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilmkassette (Gevamatic 24 x 30 cm)	Agfa, Köln
Schweißgerät (Cordless Tube Topper)	Beckmann Coulter, Krefeld
Spannungsquelle (Power Pac 200 und 300)	BioRad, München
Sterilwerkbänke:	
Holten Lamin Air Model 1,2 und 1,8	Mahl Reinraumtechnik, Kaarst
Kojar Sicherheitswerkbank	Kojar, Villppula, FIN
Thermocycler (T3 Thermocycler)	Biometra, Göttingen
Thermomixer (Thermomixer comfort 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Thermoschüttler (Modell 3033)	GFL, Großburgwedel
Ultraschallgerät (Sonoplus 2070 und 2200)	Bandelin, Berlin
UV-Lichtquelle (UV-Transilluminator)	AGS, Heidelberg
VersaDoc™ (Model 5000)	BioRad, München
Vortexer (Minishaker MS2)	IKA Labortechnik, Staufen
Waagen:	
Navigator™	Ohaus GmbH, Gießen
Scaltec	Armin Baack, Schwerin
Wasserbäder:	
Thermostat mit Badgefäß	JulaboU3 Labortechnik, Seelbach
Wasserbad (GFL-1003, ca. 14 L)	GFL, Großburgwedel
Wippschüttler:	
Wippschüttler (Ethidumbromidbad)	Heidolph, Schwabach

Wippschüttler KICK II (Inkubationsschalen)	Armin Baack, Schwerin
Zentrifugen:	
Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Galaxy Mini	Merck, Darmstadt
Kühlzentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
Labofuge 400R	Heraeus, Hanau
Optima TM Max Ultrazentrifuge 130 000 RPM	Beckmann Coulter, Krefeld
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Vakuumzentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg

3.3 METHODEN

3.3.1 Molekularbiologische Methoden – Klonierung von Plasmidkonstrukten

Zur Klonierung von Plasmidkonstrukten wurde genomische DNA aus Geweben oder Zelllinien gewonnen (s. Kap. 3.3.1.1.1) und über eine PCR-Reaktion amplifiziert (s. Kap. 3.3.1.2). Das PCR-Produkt wurde anschließend aufgereinigt (s. Kap. 3.3.1.1.3) und einem Restriktionsverdau unterzogen (s. Kap. 3.3.1.3.1). Parallel dazu wurde gegebenenfalls auch der Vektor (pcDNA3) mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaut (s. Kap. 3.3.1.3.1) und zur Entfernung randständiger Phosphatgruppen mit Shrimp Alkaline Phosphatase behandelt (s. Kap. 3.3.1.3.2). Konstrukt und Vektor wurden über ein Agarosegel aufgereinigt (s. Kap. 3.3.1.4, 3.3.1.1.4) und nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung (s. Kap. 3.3.1.5) miteinander ligiert (s. Kap. 3.3.1.6.1). Zur Vermehrung der Plasmidkonstrukte wurden kompetente Bakterien (s. Kap. 3.3.1.9) mit der Plasmid-DNA transformiert und auf Selektionsplatten angezogen (s. Kap. 3.3.1.7). Nach Anzucht von Flüssigkulturen (s. Kap. 3.3.1.8) wurde die Plasmid-DNA präpariert (s. Kap. 3.3.1.1.2) und verifiziert (s. Kap. 3.3.1.3.1, 3.3.1.4, 3.3.1.10).

3.3.1.1 Präparation von DNA

3.3.1.1.1 Präparation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen und Geweben

Zur Präparation genomischer DNA wurden die Gewebeproben bzw. Zellpellets zunächst in 500 µl Maus-Lysispuffer lysiert und nach Zugabe von 10x Proteinase K (10 mg/ml) über Nacht im Thermomixer bei 56 °C verdaut. Zur weiteren Aufreinigung wurden die Proben anschließend einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen. Dazu wurde das Lysat mit einem Volumen Phenol versetzt, gemischt und fünf Minuten bei 11.400 g zentrifugiert. Aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen blieben die Nukleinsäuren in der oberen wässrigen Phase gelöst, während sich Proteine bzw. Fette in der Interphase bzw. der phenolischen Phase anordneten. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Probenröhrchen überführt. Dieser Extraktionsschritt wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden Phenolreste aus der wässrigen Phase durch die Zugabe eines Volumens Chloroform extrahiert. Dazu wurde die Probe wiederum gründlich gemischt, fünf Minuten bei 11.400 g zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Probenröhrchen überführt. Dieser Prozess wurde dreimal wiederholt.

3.3.1.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Flüssigkulturen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien einer Flüssigkultur erfolgte mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers. Zunächst wurde die Plasmid-DNA durch alkalische Lyse aus den Bakterien freigesetzt, anschließend durch Zentrifugation (Mikrozentrifuge) von größeren bakteriellen Zellbestandteilen befreit, über Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt

und in 50 µl Elutionspuffer aufgenommen.

3.3.1.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach enzymatischen Reaktionen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten (nach PCR-Amplifikation oder enzymatischer Spaltung) erfolgte unter Verwendung des „QIAquick PCR Purification Kits“ (Qiagen) über das Prinzip der Ionenaustauschchromatographie den Angaben des Herstellers entsprechend. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden in 50 µl Elutionspuffer aufgenommen.

3.3.1.1.4 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Agarosegelelektrophorese und Inkubation in wässriger Ethidiumbromidlösung (s. Kap. 3.3.1.4) wurde das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Lichtkontrolle mit einer Skalpellklinge aus dem Gel herausgeschnitten und in ein Probenröhrchen überführt. Die weitere Aufreinigung erfolgte unter Verwendung des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers.

3.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die „*Polymerase Chain Reaction*“ (PCR, SAIKI et al. 1985) war es möglich, selbst kleinste Mengen von DNA selektiv zu vervielfältigen. Zur Durchführung der Reaktion wurden folgende Komponenten benötigt:

- die DNA als Matrize
- ein gegenläufiges Paar Oligonukleotide (*sensePrimer* und *antisensePrimer*), die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankieren
- ein Gemisch von Desoxy-Nukleosidtriphosphaten (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP) als Bausteine der neusynthetisierten DNA-Stränge
- eine für die Reaktion geeignete Pufferlösung (10x Taq-Puffer)
- eine DNA-Polymerase (Taq-DNA-Polymerase aus „*Thermus aquaticus*“) zur Katalyse der DNA-Synthesereaktion

Für einen Standard-PCR-Ansatz wurden 1 µl DNA (10 - 100 ng), 1 µl *sensePrimer* (100 µM), 1 µl *antisensePrimer* (100 µM), 1 µl dNTPs (je 10 mM) und 5 µl 10x PCR-Puffer auf Eis gemischt und mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 49 µl aufgefüllt. Die Amplifikationsreaktion erfolgte in einem T3 Thermocycler (Biometra). Ein initialer Denaturierungsschritt von fünf Minuten bei 95 °C diente der Verringerung unspezifischer Produkte. Nach Zugabe eines Mikroliters Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl) wurden 35 Zyklen aufeinander folgender Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Elongationsintervalle nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung:	95°C	1 min	} 35 Zyklen
Hybridisierung:	58°C	45 sek	
Elongation:	72°C	1 min	
Kühlung:	4°C	8	

3.3.1.3 Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren

3.3.1.3.1 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Die enzymatische Spaltung von Nukleinsäuren erfolgte den Angaben des Herstellers folgend unter geeigneten Pufferbedingungen je nach Enzym mit 25 U Restriktionsenzym pro 1 µg DNA. Die Inkubation verlief bei 37 °C über 2-3 Stunden (optional über Nacht).

3.3.1.3.2 Entfernung randständiger Phosphatgruppen

Um eine Rezirkularisation eines linearisierten Vektors zu verhindern, wurden die randständigen 5'-Phosphatgruppen durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, SAP) entfernt. Dazu wurde der in Elutionspuffer gelöste Vektor (s. Kap. 3.3.1.1.3) nach Zugabe von 10x Dephosphorylierungspuffer und 2 µl (1 U/µl) SAP für 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 3 µl NaAcetat (pH 5,2) wurde der basische pH der SAP gepuffert und im Anschluss die DNA wie unter Kapitel 3.3.1.1.3 beschrieben aufgereinigt.

3.3.1.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Größenbestimmung unbekannter DNA-Moleküle, zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten oder zur Überprüfung von Restriktionsverdaus wurden Nukleinsäuren unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes (10-20 Volt/cm) in Agarosegelen (nach MEYERS et al. 1976) aufgetrennt. Dabei wanderten die negativ geladenen Moleküle ihrer Größe entsprechend unterschiedlich schnell durch das als Molekularsieb fungierende Agarosennetz. In Abhängigkeit zur Größe der zu analysierenden Fragmente wurde eine Agarosekonzentration von 0,7 bis 1,2 % gewählt. Die entsprechende Menge Agarose wurde durch Aufkochen in 1x TAE-Puffer gelöst. Die Proben wurden in einen farbmarkerhaltigen Probenpuffer aufgenommen. Anhand der Farbfront war der Fortschritt der Probenauftrennung ablesbar. Zur Ermittlung der Molekülgröße wurde ein 100 bp-Marker mitgeführt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) für 10-30 min inkubiert. Anschließend wurden die zwischen den Basen der Nukleinsäuren interkalierten Ethidiumbromid-Moleküle durch ultraviolettes Licht (254 nm) angeregt. Die daraus resultierende Fluoreszenz wurde mittels Sofortbildkamera und Polaroidfilm dokumentiert.

3.3.1.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte über photometrische Absorptionsmessung (Biophotometer, Eppendorf). Grundlage dieses Verfahrens war das „Lambert-Beersche-Gesetz“. Die Absorption der verdünnten Nukleinsäurelösung wurde in einer Kunststoffküvette (UVette®, Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gegen das Lösungsmittel gemessen. Über den gemessenen OD_{260 nm}-Wert erfolgte dann die Bestimmung der dsDNA-Konzentration nach folgender Formel: OD_{260 nm} x Verdünnung der DNA-Lösung x 50 = µg DNA/ml.

Der Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung wurde durch den Quotienten der Extinktionsmesswerte bei 260 nm/280 nm bestimmt. Der Quotient sollte für DNA-Lösungen im Toleranzbereich von 1,5 bis 2 liegen.

3.3.1.6 Ligation in Plasmid-Vektoren

Das zu klonierende geschnittene DNA-Fragment (Insert) und der linearisierte dephosphorylierte Vektor wurden in einem molaren Verhältnis von 3 : 1 eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte in einem 10 µl Ansatz über Nacht bei 4 °C durch die katalysierende Wirkung der T4-DNA-Ligase (1 U/µl) unter den vom Hersteller (Roche) empfohlenen Pufferbedingungen.

3.3.1.7 Transformation und Selektion von Bakterien

Die Vermehrung des ligierten Insert-Plasmid-Konstruktes (Plasmid-DNA) erfolgte durch die Transformation des *E.coli*-Stammes XL₁-Blue. Ein bei -70 °C gelagertes Aliquot der Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis, wurde die DNA-Aufnahme durch eine Hitzeschockbehandlung von 40 Sekunden bei 42 °C initiiert. Die Bakterien wurden für zwei Minuten auf Eis abgekühlt und in 1 ml LB-Medium aufgenommen. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde der Transformationsansatz in unterschiedlichen Konzentrationen (z. B. 100 µl, 200 µl) auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3.1.8 Anzucht von Flüssigkulturen und Lagerung

Zur Anzucht von Flüssigkulturen wurde eine vereinzelt Bakterienkolonie unter sterilen Bedingungen in ein geeignetes Volumen („Mini-Prep“: 5 ml; s. Kap. 3.3.1.1.2) Selektionsmedium überimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C kultiviert.

Für einen begrenzten Zeitraum von 1-2 Wochen war eine Aufbewahrung der Bakterienkulturen bei 4 °C möglich. Zur Langzeitlagerung wurden 800 µl der Flüssigkultur mit 200 µl 60 %-igen sterilen Glycerins gemischt und bei -70 °C eingefroren.

3.3.1.9 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter *E.coli*-Bakterien wurde zunächst eine Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstammes (XL1-blue) in 10 ml LB-Medium + 0,625 µl Tetrazyklin (12,5 mg/ml) angelegt. Davon wurden am folgenden Tag 1 ml in 30 ml frisches LB-Medium + 0,625 µl Tetrazyklin (12,5 mg/ml) überimpft und dieser Ansatz bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf Eis abgekühlt und für 10 Minuten bei 2.123 g und 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 15 ml eiskaltem Ca/Mg-Puffer resuspendiert, 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann erneut zentrifugiert. Diesmal erfolgte die Resuspension des entstandenen Pellets in 1,5 ml Ca/Mg-Puffer. Nach Zugabe von 225 µl sterilem,

96 %igem Glycerin (in H₂O) wurde der Ansatz zu je 120 µl aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert. Das Auftauen der Zellen erfolgte auf Eis.

3.3.1.10 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die Sequenzierung der aufgereinigten DNA-Proben (s. Kap. 3.3.1.1.2, 3.3.1.1.3) erfolgte durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg). Nach photometrischer Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration (s. Kap. 3.3.1.5) wurde die benötigte DNA-Menge mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert und gegebenenfalls mit entsprechenden Primern zur Analyse gegeben. Die Auswertung der Sequenzanalyse erfolgte über die online verfügbare NCBI-Blast-Datenbank.

3.3.2 Zellkultur

3.3.2.1 Zellkultur und Zellpassage

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und einer Gaszufuhr von 5 % CO₂ kultiviert. In der Wahl des Zellkulturmediums und der, für die einzelne Zelllinie, optimalen Splitrate wurde sich an den Empfehlungen der Zellbank orientiert. Zusätzlich wurden alle Zelllinien auch unter Opti-MEM hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens (morphologische Stabilität, Teilungsrate und Ablöseverhalten, Empfindlichkeit gegenüber Passagestress) und ihrer PrP^C-Expression beurteilt und wenn möglich auf dieses Medium umgestellt. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Wechsel des Nährmediums. Bei konfluentem Zellrasen wurden die Zellen geteilt. Dazu wurde der Überstand abgezogen, die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und durch ATV abgelöst. Die weitestgehend vereinzelter Zellen wurden in Medium resuspendiert. Ihrer Umsetzrate entsprechend wurde ein Teil der Zellen erneut ausgesät und mit Medium versorgt. Bei nicht infizierten Zellen erfolgte eine Passage auf neue Zellkulturgefäße in einem Abstand von circa vier Wochen.

3.3.2.2 Langzeitlagerung von Zellen

3.3.2.2.1 Einfrieren von Zellen

➤ Kryo-Kulturen:

Die Langzeitlagerung von Zellen erfolgte in Form von Kryo-Kulturen. Dazu wurden konfluente Zellkulturen wie bei der normalen Passage mit Trypsin (ATV) vom Kulturgefäß gelöst und in Zellkulturmedium resuspendiert. Während ein Teil der Zellen weiterhin in Kultur verblieb, wurde der andere Teil bei 1.215 g für zwei Minuten zentrifugiert (RT). Das entstehende Zellpellet wurde in 10 % DMSO enthaltendes Zellkulturmedium (37 °C) resuspendiert und in 1,5 ml Kryo-Röhrchen aliquotiert. Nach 24-stündiger Lagerung in einer Isopropanol enthaltenden Einfrierbox bei -70 °C wurden die Kryo-Röhrchen zur Langzeitlagerung in die Gasphase über flüssigem Stickstoff überführt.

➤ 96-Loch-Platten:

Um Zellen einer 96-Loch-Platte einzufrieren, wurden diese mit Trypsin vom Gefäßboden abgelöst, in Einfriermedium (10 % DMSO enthaltendes Zellkulturmedium) resuspendiert und in eine 96-*DeepWell*-Platte überführt. Diese wurde, umgeben von Isopropanol, bei -70 °C eingefroren.

3.3.2.2 Auftauen von Zellen

Um die im Stickstoff gelagerten Zellen erneut zu kultivieren, wurde das entsprechende Kryoröhrchen bzw. die entsprechende Platte in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden in vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen, resuspendiert und in einer T25er-Flasche/neuen 96-*DeepWell*-Platte ausgesät. Nach Ab- und Festsetzen der Zellen, wurde der DMSO-haltige Überstand entfernt und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.

3.3.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte durch mikroskopische Auszählung in einer Fuchs-Rosental-Zählkammer nach folgender Berechnung:

$$\frac{\text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnung} \times 1000}{256 \times 0,0125} = \text{Zellen/ml}$$

Zur Vitalitätsbestimmung wurde der „Trypanblau-Exklusionstest“ durchgeführt. Dessen Prinzip beruht auf der veränderten Permeabilität der Zellmembran abgestorbener Zellen, durch welche Farbstoffe (z. B. Trypanblau) aufgenommen werden, die nicht membrangängig sind. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde nach Herstellerangaben mit Trypanblaulösung versetzt. Anschließend wurden die ungefärbten Zellen ausgezählt und in Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt.

3.3.2.4 Transfektion von Zellen

Um das gewünschte Plasmid in das Genom der entsprechenden Zielzelle dauerhaft zu integrieren (stabile Transfektion), wurde das molekularbiologische Verfahren der Lipotransfektion (SuperFect Transfection, Qiagen) gewählt. Dazu wurden die zu transfizierenden Zellen in verschiedenen Verdünnungen in 6-Loch-Schalen ausgesät und einen Tag lang kultiviert. Am folgenden Tag sollte die Dichte des Zellrasens 40-80 % betragen. 5 µg des Plasmids wurden in serum- und antibiotikafreiem Medium auf ein Endvolumen von 150 µl verdünnt, vermischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden 30 µl des SuperFect Transfektionsreagenz zugegeben. Die Proben wurden kurz gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Von den Zellen wurde in der Zwischenzeit das Zellkulturmedium abgezogen und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Nach Abschluss der Inkubation wurden 1 ml serum- und antibiotikahaltigen Mediums zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Der Komplex wurde gut vermischt und umgehend auf die vorbereiteten Zellen appliziert. Nach einer

Inkubation von zwei bis drei Stunden bei 37 °C wurde der Überstand vorsichtig abgezogen, die Zellen wurden drei- bis viermal mit PBS gewaschen und nach Zugabe frischen Mediums für 24 bis 48 Stunden inkubiert. Die weitere Kultivierung und Passagierung der Zellen erfolgte in geeignetem Selektionsmedium. Die erfolgreiche Transfektion wurde mit geeigneten Detektionsassays (s. Kap. 3.3.4) überprüft.

3.3.2.5 Klonierung von eukaryotischen Zellen

Um einzelne Zellklone zu erhalten, wurden Zellen der entsprechenden Zelllinie auf Zehnzentimeter-Schalen sehr dünn ausgesät. Nachdem sich aus den Einzelzellen durch Zellteilung kleine Kolonien von wenigen Zellen gebildet hatten (7 - 10 Tage), wurden diese unter mikroskopischer Kontrolle mit einer Pipette aufgenommen und jeweils in eine 96-Loch-Plattenvertiefung überführt. Unter gelegentlicher Zugabe frischen Mediums wurden die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert und einmal auf eine neue 96-Loch-Platte passagiert. Abhängig von der Bestimmung der Zellen, wurden diese im weiteren Verlauf auf dem 96-Loch-Plattenformat belassen oder einzelne Zellkolonien in größeren Kulturgefäßen vermehrt.

3.3.3 Infektionsprotokoll

3.3.3.1 Herstellung von Hirnhomogenaten

Für die Infektionsversuche wurden 10 %-ige Hirnhomogenate aus zuvor aliquotierten und bei -20 °C gelagerten Gehirnproben frisch hergestellt. Die Herstellung erfolgte jeweils am Tag der Erstinokulation eines Infektionsansatzes für beide aufeinander folgenden Inokulationen (erste Inokulation, zweite Inokulation). Die benötigte Gewebemenge wurde unter sterilen Bedingungen abgewogen und fein zerkleinert. Nach Zugabe von sterilem PBS bzw. einer 5 %-igen (w/v) Saccharoselösung wurde das Hirnmaterial unter Verwendung einer 100 µl Pipette homogenisiert und anschließend für zwei Minuten in einem Ultraschallbad beschallt. Bei autolytischem Ausgangsmaterial wurden die Homogenate vor der Ultraschallbehandlung 10 Minuten bei 70 °C erhitzt, um die Kontaminationsgefahr durch Bakterien zu reduzieren. Der für die zweite Inokulation bestimmte Teil des Hirnhomogenates wurde bei -20 °C gelagert.

3.3.3.2 Inokulation von Zelllinien

Zur Inokulation der Zellen wurden diese unter Berücksichtigung ihres individuellen Wachstumsverhaltens in Kulturflaschen (T75, T25) bzw. -platten (6-, 12-, 96-Loch) ausgesät und einen Tag lang kultiviert. Am folgenden Tag sollte die Konfluenz des Zellrasens etwa 80 % betragen. Die Inokulation erfolgte durch die Zugabe TSE-positiven Hirnhomogenates in einer Endkonzentration von 0,33 % in das Nährmedium der Zellen. Aufgrund der erhöhten Kontaminationsgefahr durch das Inokulat wurde allen Medien 0,126 µg/ml Penicillin und 0,125 µg/ml Streptomycin (gegebenenfalls

auch 0,05 µg/ml Kanamycin) zugesetzt. Zur methodischen Vergleichbarkeit wurden nicht infizierte Kontrollzellen unter gleichen Bedingungen mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wurde frisches Medium zugegeben bzw. ein zweites Mal wie beschrieben inokuliert. Weitere drei Tage später wurde erneut frisches Medium zum vorhandenen Überstand hinzugegeben und am Tag darauf wurde das Inokulat durch Medienwechsel weitgehend abgezogen. Die Zellen wurden wiederholt passagiert, wobei jeweils ein Teil der Zellen für die PrP^{res}-Detektion zurückbehalten wurde. Nach einer splitratenabhängigen Anzahl von Passagen (Endverdünnung ~ 1 : 1000), die dem Ausschluss möglichen Restinokulates und der Anreicherung von neugebildetem PrP^{res} dienen sollte, erfolgte die Testung auf eine erfolgreiche Infektion der Zellen durch die Detektion von PrP^{res}. Dazu standen drei Methoden, der Western-Blot, der Dot-Blot und der „Zell-ELISA“ (s. Kap. 3.3.4), zur Verfügung.

3.3.3.3 Ausschluss von Restinokulat

Für die einzelnen Zelllinien war entsprechend ihrer Umsetzraten eine verschieden hohe Anzahl von Passagen (3 x 1 : 10, 4 x 1 : 6, 7 x 1 : 3 oder 10 x 1 : 2) notwendig, um eine vollständige Entfernung des Inokulates sicherstellen zu können (kumulative Umsetzrate 1 : 1000). Dabei wurden die Zellen bei jedem Teilen auf eine neue Zellkulturflasche oder -schale ausgesät, um ein eventuelles Anhaften des Inokulates an Gefäßwand oder -boden zu vermeiden. Ein Teil der Zellen wurde während dieses Vorgangs für die Detektion von PrP^{res} zurückbehalten und als „Passagereihe“ (s. Kap. 4.2.1, s. Abb. 4.6) nach den Protokollen der Western-Blot- bzw. Dot-Blot-Detektion aufgearbeitet.

3.3.4 Spezifischer Nachweis von Proteinen

Zum Nachweis von Proteinen wurden gemäß der Fragestellung unterschiedliche Verfahren angewandt. Prinzipiell standen drei Detektionssysteme zur Verfügung: Bei der Dot-Blot-Analyse handelte es sich um ein hoch-sensitives Verfahren, das die simultane Testung von 96 Einzelproben ermöglichte. Die Western-Blot-Analyse war weniger sensitiv, ermöglichte aber den direkten Vergleich von Proteinase K (PK) -verdauten und -unverdauten Proben und lieferte Informationen über die molekulare Masse und das Glykosylierungsmuster des detektierten Prion-Proteins. Der „Zell-ELISA“ wurde eingesetzt, um PrP^{res} auf dem Niveau von Einzelzellen zu detektieren.

3.3.4.1 Western-Blot-Analyse

➤ Aufarbeitung von Proteinen aus Zellkulturen und Geweben

Zur Aufarbeitung von Proteinen über das Protokoll des Western-Blots eigneten sich Zellkulturen in 6-Loch-Schalen, T25er-Flaschen und T75er-Flaschen bzw. Gewebeproben. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

Für die Aufarbeitung von Zellen wurde ein Anteil bei der Passage zurückbehalten und durch einen Zentrifugationsschritt bei 1.215 g für 10 Minuten pelletiert. Aus diesem Zellpellet oder aus fein

zerkleinerten Geweben (bei der Analyse von Gewebeproben) wurde durch Resuspension in Lysispuffer ein 10 %-iges Lysat (w/v) hergestellt. Dieses wurde nach zehnminütiger Inkubation erneut zentrifugiert, dabei der Zelldetritus verworfen und der Überstand einem RNase- (3,3 µg/ml) und DNase- (100 µg/ml) Verdau von einer Stunde bei 37 °C unterzogen. Zum spezifischen Nachweis von PrP^{res} wurde der Überstand anschließend in zwei Aliquots geteilt. Einem Aliquot wurde Proteinase K (Zellen: 25 µg/ml, Gewebeproben: 50 µg/ml) zugesetzt, das andere Aliquot blieb als Kontrolle unbehandelt. Nach einer weiteren Stunde Inkubation beider Aliquots bei 37 °C wurde die Wirkung der Proteinase K durch Zugabe von 2 mM PMSF (10 µl/ml) abgestoppt. Den Proben wurde 10x CVL-Puffer zugesetzt, anschließend wurden sie für ca. 20 Sekunden zur Lösung von Aggregaten in einem Ultraschallbad beschallt und fünf Minuten bei 95 °C denaturiert.

Optional (vorzugsweise bei Proben aus T75er- und T25er-Flaschen und Geweben) schloss sich nach der Zugabe von PMSF ein Ultrazentrifugationsschritt von einer Stunde bei 281.595 g und 4 °C an. Durch diesen wurde das gesamte in der Probe vorhandene Protein in einem geringen Probenvolumen angereichert. Nach der Ultrazentrifugation wurde das erhaltene Pellet in 2x CVL-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden geschallt und bei 95 °C fünf Minuten denaturiert.

➤ SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970) in einer Mini-Gelelektrophorese-Apparatur (BioRad). Dazu wurden die Proben zunächst in einem 4 %-igen Sammel- oder Taschengel bei 100 Volt fokussiert und nach Erreichen des 16 %-igen Trenngels bei 200 Volt ihren unterschiedlichen Molekulargewichten entsprechend aufgetrennt. Zur Ermittlung der Molekulargewichte wurde jeweils ein Proteinmarker (10 µl) mitgeführt.

➤ Western-Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden nach dem „Semi-dry“-Verfahren mit einer Trans-Blot-Apparatur (BioRad) auf Polyvinylpyrrolidon-Membranen transferiert. Diese war zuvor in Methanol aktiviert und durch Blottingpuffer äquilibriert worden. Für den 45-minütigen Transfer der Proteine auf die Membran wurde eine Spannung von 15 Volt bei einer Stromstärke von 0,3 Ampere pro Gel angelegt.

➤ Detektion

Anschließend erfolgte zur Absättigung unspezifischer Bindungen eine mindestens einstündige Inkubation der Membran in Blockingpuffer (5 %-ige Magermilch: Magermilchpulver in PBST), bevor der in Blockingpuffer verdünnte Erstantikörper ebenfalls für mindestens eine Stunde (optional auch über Nacht) zugegeben wurde. Zur Entfernung von nicht gebundenem Antikörper wurde die Membran danach dreimal jeweils zehn Minuten mit PBST gewaschen, dann eine weitere Stunde mit in Blockingpuffer verdünntem, *Horse Radish Peroxidase* (HRP, Meerrettichperoxidase) gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je zehn Minuten mit PBST erfolgte die Detektion der Proteinbanden mittels *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) unter Belichtung und Entwicklung eines Röntgenfilms oder alternativ unter Nutzung der Versadoc-Software. Die Belichtungszeit betrug jeweils eine bzw. drei Minuten.

3.3.4.2 Dot-Blot-Analyse

Die Dot-Blot-Analyse diente der parallelen Bearbeitung einer großen Probenanzahl (z. B. 96-Loch-Platten) oder der Aufarbeitung von Proben, in denen ein geringer Proteingehalt vermutet wurde. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

➤ Herstellung der Zell- und Gewebelysate

Wie beim Protokoll der Western-Blot-Analyse konnten entweder Lysate zunächst trypsinierter und pelletierter Kulturen (s. Kap. 3.3.4.1) oder im Kulturgefäß lysierte Zellen und Gewebe als Ausgangsmaterial eingesetzt werden.

➤ Dot-Blot

Die Lysate (100-150 µl/Loch) wurden mit einer Dot-Blot-Apparatur auf eine Polyvinylpyrrolidon-Membran transferiert. Die Membran war zuvor durch Methanol aktiviert und durch Lysispuffer äquilibriert worden. Der angelegte Unterdruck betrug 600 mmHg/0,8 bar. Zur Fixierung der Proben wurde die Membran anschließend für eine Stunde bei 37 °C getrocknet.

• Verdau

Die auf der Membran fixierten Proben wurden für eine Stunde bei 37 °C einem DNase-Verdau (100 µg/ml) unterzogen und zweimal mit dH₂O gespült. Zum spezifischen Nachweis von PrP^{res} wurde ein neunzigminütiger Proteinase K-Verdau (25 µg/ml) bei 37 °C angeschlossen. Nach zweimaligem Spülen mit dH₂O wurde die Wirkung der Proteinase K durch Zugabe von 2 mM PMSF (10 µl/ml) abgestoppt.

➤ Detektion

Durch zehnminütiges Schwenken der Membran in 3 M Guanidinium-Thiocyanat (in 10 mM TrisHCl; pH 8) wurden die Proben denaturiert. Das Guanidinium-Thiocyanat wurde anschließend durch fünfmaliges Spülen mit dH₂O entfernt, bevor sich die Immunodetektion der Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper anschloss (s. Kap. 3.3.4.1 Detektion).

In Abwandlung zum beschriebenen Prozedere wurden Proben bzw. Anteile von Proben größerer Ansätze (T25er-Flaschen, T75er-Flaschen) auch nach einer Vorbehandlung mit DNase, RNase und/oder Proteinase K auf die Membran transferiert. In diesem Fall entfiel ein späterer Verdau der Membran.

3.3.4.3 „Zell-ELISA“

Der „Zell-ELISA“ wurde modifiziert nach HÖLSCHER et al. (1998) durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, erfolgten alle Schritte bei Raumtemperatur.

➤ Ansatz der Zellen

Für den „Zell-ELISA“ wurden die Zellen am Vortag ihrem individuellen Wachstumsverhalten entsprechend in 6-Loch-Platten so ausgesät, dass sie am folgenden Tag in Form eines dichten Monolayers vorlagen. Nach Abzug des Zellkulturüberstandes wurden die Zellen sehr vorsichtig zweimal mit PBS (+ 1 mM MgCl₂) gewaschen.

➤ Fixierung

Im Anschluss daran erfolgte eine *in-situ*-Fixierung mit 5 %-igem Paraformaldehyd (Paraformaldehyd, 1 mM MgCl_2 in PBS). Die Dauer der Fixierung variierte je nach Zelllinie von 30 Minuten bis zu einer Stunde.

➤ Verdau

Nach der Fixierung wurden die Zellen einmal mit PBS (PBS + 1 mM MgCl_2) gewaschen, dann durch 0,4 %iges TritonX-100 (TritonX-100 in PBS) für drei Minuten permeabilisiert und zum spezifischen Nachweis von PrP^{res} für 15 Minuten einem Proteinase K-Verdau (25 $\mu\text{g/ml}$) bei 37 °C unterzogen. Die Wirkung der Proteinase K wurde durch Inkubation mit 2 mM PMSF (10 $\mu\text{l/ml}$; 15 min) beendet.

➤ Detektion

Im Anschluss daran folgte eine zehnminütige Denaturierung durch 6 M Guanidinium Hydrochlorid (6 M Guanidinium Hydrochlorid in 50 mM Tris-HCl; pH 7,4), welches durch die zweimalige sehr vorsichtige Inkubation mit TNT (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,05 % Tween 20) wieder entfernt wurde. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen dann für eine Stunde mit Blockingpuffer (5 % Magermilch: Magermilch in TNT) inkubiert, bevor in Blockingpuffer verdünnte Erstantikörper für eine Übernachtinkubation bei 4 °C zugegeben wurden. Nicht gebundene Antikörper wurden am nächsten Tag durch dreimaliges Waschen mit TNT entfernt. Die Zellen wurden mit in Blockingpuffer verdünnten Zweitantikörpern (Alkalische Phosphatase(AP)-gekoppelt) für eine Stunde inkubiert und dreimal mit TNT gewaschen. Zur Detektion wurde das AP Conjugate Substrate Kit (Biorad) verwendet. Die Auswertung erfolgte an einem Standard Zellkultur-Invert-Mikroskop.

3.3.4.4 PrP-spezifische Antikörper

Der PrP-spezifische monoklonale Antikörper (mAK) ICSM18 wurde aufgrund seiner hohen Sensitivität und seines im Prion-Protein der Säugetiere hoch konservierten Epitops sowohl für die Detektion von PrP^{C} in nicht-infizierten Zellen als auch zum Ausschluss vorhandenen Restinokulates und zur primären Überprüfung des Infektionserfolges für der Detektion von PrP^{res} in den inokulierten Zelllinien verwendet. Die Verifizierung von Infektionserfolgen wie auch die Charakterisierung infizierter Zellen erfolgte darüber hinaus mit anderen PrP-spezifischen Antikörpern wie z.B. 6H4, L42, P4.

3.3.4.5 Lösen von Antikörperbindungen

Durch Veränderung des pH-Wertes und des Salzgehaltes war es möglich, die Bindung zwischen Antikörper und Epitop zu lösen. Auf diese Weise konnten Membranen mehrfach verwendet und eine Probe mit unterschiedlichen Antikörpern inkubiert werden.

Reste der ECL-Lösung wurden zunächst durch zweimaliges Spülen mit PBST entfernt, bevor die Membran zweimal für jeweils zehn Minuten mit *Powerstrip* (0,2 M Glycin, 1 % (w/v) SDS, pH 2,0) inkubiert wurde. Um das Glycin vollständig zu entfernen und den pH-Wert zu neutralisieren, wurde

anschließend dreimal mit PBST gespült und zweimal je fünf Minuten mit PBST gewaschen. Die weiteren Schritte zur Immunodetektion erfolgten wie beschrieben (s. Kap. 3.3.4.1 Detektion).

3.3.5 Enzymatische Behandlung des PrP

3.3.5.1 Proteinase K-Zeitreihe

Zur Erstellung einer Proteinase K-Zeitreihe wurde aus mehreren vermischten Zellpellets der zu untersuchenden Zelllinie eine 10 %-ige Suspension (w/v) in Lysispuffer hergestellt. Diese wurde einem einstündigen DNase-Verdau (100 µg/ml) bei 37 °C unterzogen und anschließend aliquotiert. Im Folgenden wurden die aliquotierten Proben mit Proteinase K (25 µg/ml) versetzt und bei 37 °C inkubiert. Alle zwei Stunden – vom Zeitpunkt null bis 24h nach Proteinase K-Zugabe – wurde der Verdau eines Probenaliquots durch Zugabe von 2 mM PMSF (10 µl/ml) beendet. Die weitere Aufarbeitung der Proben und die Detektion des PrP^{res} erfolgten über die Western-Blot- bzw. Dot-Blot-Analyse (s. Kap. 3.3.4.1, 3.3.4.2).

3.3.5.2 Proteinase K-Konzentrationsreihe

Zur Erstellung einer Proteinase K-Konzentrationsreihe wurde aus mehreren miteinander vermischten Zellpellets der zu untersuchenden Zelllinie eine 10 %-ige (w/v) Suspension in Lysispuffer hergestellt. Diese wurde einem einstündigen DNase-Verdau (100 µg/ml) bei 37 °C unterzogen und anschließend in sechs Aliquots zu je 100 µl unterteilt. Vier der Aliquots wurden in aufsteigenden Konzentrationen (25 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml) mit Proteinase K versetzt, ein Aliquot blieb als Kontrolle unbehandelt. Nach einer weiteren Stunde Inkubation aller sechs Aliquots bei 37 °C wurde die Wirkung der Proteinase K durch Zugabe von 2 mM PMSF (10 µl/ml) abgestoppt. Die weitere Aufarbeitung der Proben und die Detektion des PrP^{res} erfolgten über die Western-Blot- bzw. Dot-Blot-Analyse (s. Kap. 3.3.4.1, 3.3.4.2).

3.3.5.3 Deglykosylierung mit N-Glykosidase F

Zur Entfernung der Zuckerseitenketten am Prion-Protein wurde zunächst aus einem Zellpellet bzw. einer Gewebeprobe eine 10 %-ige Suspension (w/v) in Lysispuffer hergestellt und dieses für eine Stunde bei 37 °C mit DNase (100 µg/ml) und RNase (3,3 µg/ml) verdaut. Nach anschließender zehnminütiger Zentrifugation der Proben bei 5.193 g wurde der Überstand in zwei Aliquots geteilt. Einem Aliquot wurde Proteinase K (Zellen: 25 µg/ml, Gewebeproben: 50 µg/ml) zugesetzt, das andere Aliquot blieb als Kontrolle unbehandelt. Nach einer weiteren Stunde Inkubation beider Aliquots bei 37 °C wurden jeweils 90 µl Probenvolumen mit 10 µl Denaturierungspuffer (5 % SDS, 10 % Mercaptoethanol) versetzt und für zehn Minuten bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl N-Glykosidase F (Roche) und 4 µl 0,5 M NaPO₄ (pH 7,2) zu einem Probenvolumen von 25 µl gegeben und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Detektion von PrP^{res} erfolgte wie unter Kapitel 3.3.4.1

beschrieben.

3.3.6 Inhibition von PrP^{res}

Zur provozierten Entfernung von PrP^{res} aus infizierten Zellkulturen wurden drei verschiedene Substanzen eingesetzt: Pentosansulphat (CAUGHEY u RAYMOND 1993), Suramin (GILCH et al. 2001) und Imatinib (ERTMER et al. 2004). Die Applikation der Substanzen (Pentosansulphat: 100 mg/L, Suramin: 200 µg/L, Imatinib 589,7 µg/L) erfolgte während der Kultivierung und Passage der Zellen mit dem Kulturmedium. Der Rückgang von PrP^{res} wurde mittels Dot-Blot- und/oder Western-Blot-Analyse überprüft (s. Kap. 3.3.4.1, 3.3.4.2).

3.3.7 Inokulation von Mäusen

Die Applikation der infizierten Zellen erfolgte unter Narkose durch die intrazerebrale Injektion (30 µl/Tier) von 10 %-igen Zellsuspensionen (in PBS). Beim Auftreten terminaler Symptome einer Prionerkrankung wurden die Tiere getötet und das Gehirn zur Detektion von PrP^{res} entnommen.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation neuer Zelllinien, die sich mit TSE, insbesondere mit Prion-Erregern ovinen oder bovinen Ursprungs, infizieren lassen. Zu diesem Zweck wurde zunächst analysiert, inwiefern der Infektionserfolg durch bestimmte Umgebungsparameter (Zellkulturbedingungen, methodische Variationen) beeinflusst und gegebenenfalls gesteigert werden kann. Aufbauend auf diesen Ergebnissen erfolgten die Infektionsversuche durch die Testung einer Vielzahl von Zelllinien unterschiedlicher Spezies und Gewebe auf ihre Empfänglichkeit für BSE- und Scrapie-Feldisolate sowie für verschiedene mausadaptierte TSE-Stämme. Dabei wurde eine bovine Zelllinie identifiziert, die sich – die Speziesbarriere von Rind und Schaf durchbrechend – mit zwei Scrapie-Feldisolaten infizieren ließ. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde diese Zelllinie näher charakterisiert und als stabil infizierte Linie etabliert. In einem parallelen zweiten Ansatz wurden transgene, das PrP^C verschiedener Spezies überexprimierende, Zelllinien etabliert und auf ihre Infizierbarkeit durch unterschiedliche TSE-Homogenaten überprüft.

4.1 Vorversuche

Vor den eigentlichen Infektionsversuchen erfolgte zunächst eine Auswahl von geeigneten Zelllinien und Inokulaten sowie die Entwicklung bzw. Optimierung des Inokulationsverfahrens. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die eigentlichen Infektionsversuche durchgeführt.

4.1.1 Zelllinien

4.1.1.1 Kontrollzelllinien

Die in Tabelle 4.1 aufgeführten Kontrollzellen dienten der Optimierung und methodischen Absicherung der Infektionsprotokolle und bildeten die theoretische Basis zur Entwicklung transgener Zelllinien (s. Kap. 4.3). Darüber hinaus boten sie über die grundlegenden Infektionsstudien hinaus die Möglichkeit, Stammspezifitäten, Speziesbarrieren und Infektionscharakteristika näher zu untersuchen.

Tab. 4.1: Kontrollzelllinien und Erregerstämme

Positivkontrollen – TSE-sensitive Zelllinien	Erregerstämme
N ₂ a PK1 PCK	RML
N ₂ a Gilch	22L
Hpl3-4 Maus (^{0/0} PrP ^{murin})	22L
Rov-Zellen (PrP _{ovin}) (durch Doxycyclin induziert)	S127 (Schaf/Maus)
Negativkontrollen – TSE-resistente Zelllinien	
N ₂ a PK33 PCK	-----
M ^{0/0} 864 (PrP ^{0/0})	-----
Hpl3-4 (PrP ^{0/0})	-----
Rov-Zellen (PrP _{ovin}) (nicht durch Doxycyclin induziert)	-----

4.1.1.2 Zelllinien aus der Zellbank des Friedrich-Loeffler-Institutes

Die Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts (Insel Riems) charakterisiert und verwaltet über 1000 Zelllinien unterschiedlichster Spezies und Entwicklungsstadien. Aus dieser Vielzahl potentieller Testzelllinien erfolgte zunächst eine Vorauswahl von für Infektionsstudien besonders viel versprechenden Linien. Zwei Kriterien hierfür waren die Spezies der Zelllinie und ihr ursprünglicher Gewebetyp. Hatte sich die entsprechende Spezies auf natürlichem Weg bzw. experimentell mit TSE infizieren lassen? In welchen Geweben war *in vivo* bereits PrP^c bzw. PrP^{res} nachgewiesen worden? Darüber hinaus wurden die in Kultur genommenen Zelllinien auf ihre detektierbare PrP^c-Expression und auf die Stabilität der PrP^c-Expression über einen längeren Passagezeitraum hinweg untersucht.

➤ Spezies

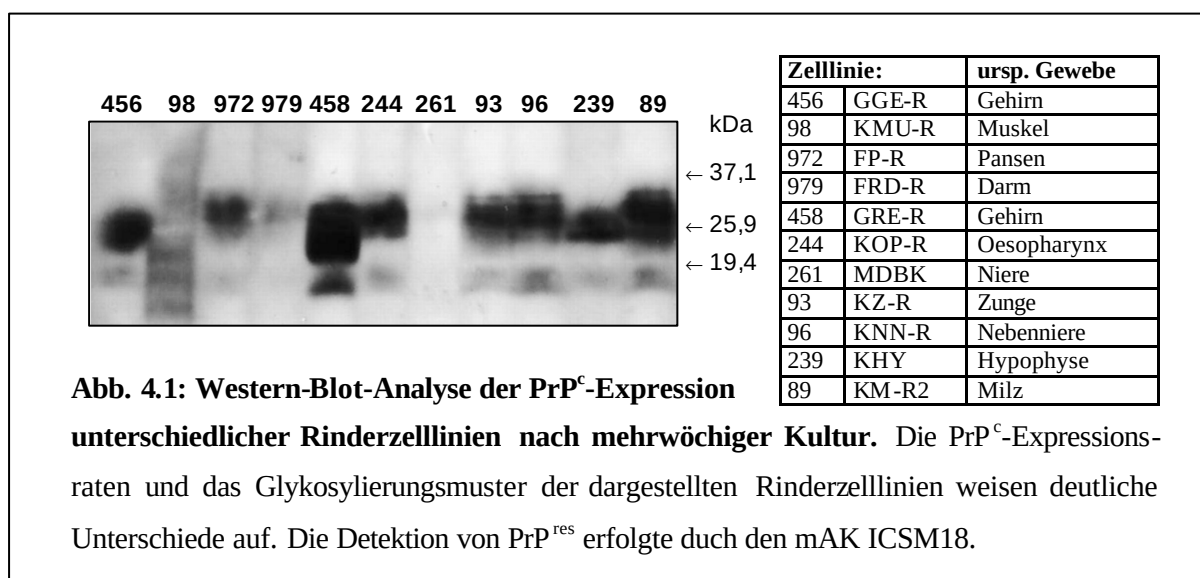
Um eine für BSE oder Scrapie empfängliche Zelllinie zu erhalten, waren die Untersuchungen auf Zelllinien bovinen, ovinen, caprinen und humanen Ursprungs konzentriert, da diese, wie bereits in der Literaturübersicht ausführlich beschrieben, empfänglich für die häufigsten TSE-Erreger sind. Rind, Schaf und Ziege stellen die natürlichen Wirte für BSE bzw. Scrapie dar. Bei Zelllinien dieser Spezies ist daher anzunehmen, dass der Erreger nicht erst eine Speziesbarriere überwinden und sich an den Wirt adaptieren muss. Beim Menschen wird im Zusammenhang mit dem Auftreten der neuen Variante von CJD (vCJD) die Aufnahme BSE-kontaminierter Nahrungsmittel als die wahrscheinlichste Hauptursache diskutiert. Auch hier ist also von der Möglichkeit einer Übertragbarkeit des BSE-Erregers auf den humanen Organismus auszugehen. Weiterhin wurden Zelllinien aus Nerz, Katze, Schwein und verschiedenen Wildwiederkäuern untersucht, da auch diese Spezies natürlich oder experimentell mit TSE infizierbar sind. Die dritte Gruppe von zu untersuchenden Zelllinien umfasste die der typischen Labortiere Maus, Hamster und Kaninchen. Maus und Hamster sind experimentell sehr gut mit verschiedensten TSE-Stämmen infizierbar. Kaninchen konnten zwar *in vivo* bisher nicht infiziert werden, aber Untersuchungen an transgenen Kaninchenzelllinien haben gezeigt, dass diese prinzipiell in der Lage sind, PrP^{res} zu bilden.

➤ Gewebetyp

Untersuchungen klinischer TSE-Fälle (WELLS et al. 1995, VAN KEULEN et al. 1995, BEEKES et al. 1998) haben einen ausgeprägten Tropismus des PrP^{res} zum nervalen Gewebe festgestellt. Darüber hinaus lässt sich die pathogene, aber vor allem auch die zelluläre, nicht pathogene Form des Prion-Proteins in zahlreichen weiteren Geweben nachweisen (BENDHEIM et al. 1992). Aus diesem Grund wurden vor allem Zelllinien des nervalen Systems ausgewählt, darüber hinaus aber auch Zelllinien des Verdauungssystems, des Lymphsystems, des endokrinen Systems, des Harn- und Geschlechtssystems, Zelllinien der Muskulatur, des Knochenmarks, des Bindegewebes, Epithelzelllinien und Zelllinien einiger tumoröser Gewebe.

➤ PrP^C-Expression und PrP^C-Stabilität

Eine weitere Voraussetzung war die Detektierbarkeit und stabile Expression des endogenen Prion-Proteins der Zellen in Kultur. Grundlage hierfür waren Untersuchungen (BÜELER et al. 1993) an PrP-defizienten Mäusen (PrP^{0/0}) bzw. an PrP-hemizygoten Mäusen (PrP^{0/+}), die zeigten, dass die Vermehrung von PrP^{Sc} durch die Umfaltung (Konversion) des zellulären PrP in die pathogene Form erfolgt. In einem nächsten Schritt wurden daher die ausgewählten Zelllinien über einen längeren Zeitraum kultiviert (s. Kap. 3.3.2.1) und mittels Western-Blot-Analyse (s. Kap. 3.3.4.1) wiederholt auf ihre tatsächliche und aktuelle PrP^C-Expression hin untersucht (s. Abb. 4.1). Bei der Untersuchung der Zelllinien wurde festgestellt, dass das PrP-Expressionsniveau für jede Zelllinie sehr individuell ist und sogar durch den Einfluss bestimmter Kulturbedingungen (s. Kap. 4.1.3.1) temporären Schwankungen unterliegen kann. Die Herkunft aus einer bestimmten Spezies oder einem bestimmten Gewebe garantiert nicht notwendig eine gute PrP^C-Expression. Darüber hinaus wiesen die individuellen Zelllinien ein zelltypspezifisches Glykosylierungsmuster auf.



34 von 53 getesteten Zelllinien wiesen eine detektierbare PrP^C-Expression auf und wurden in die Infektionsstudien einbezogen. Tabelle 4.1 (s. Kap. 4.2.1) gibt eine Übersicht über die ausgewählten Zelllinien.

4.1.2 Inokulate

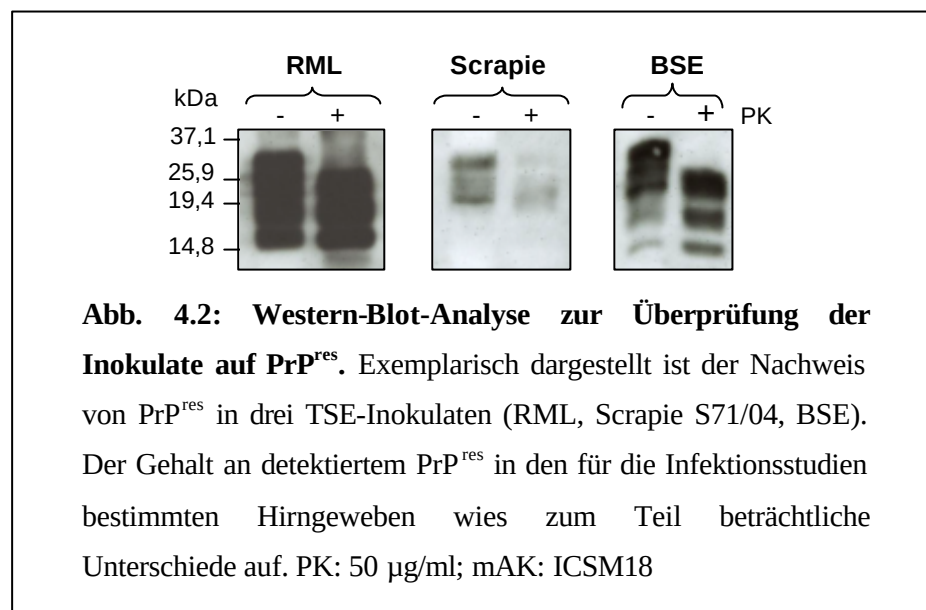
➤ Herkunft der Inokulate

Für die Infektionsversuche mit den Zellen wurde Hirngewebe von an TSE erkrankten oder PrP^{res}-positiv getesteten Tieren verwendet (s. Kap. 3.2.2). Dabei musste, wie auch bei den Testzelllinien, eine Auswahl geeigneter Spezies und TSE-Stämme bzw. -Isolate erfolgen. Neben verschiedenen mauspassagierten Scrapie-Stämmen (RML, ME7, 22L, 22F und 127S) und zwei mauspassagierten BSE-Isolaten wurden ovine Feldisolate von klassischer Scrapie unterschiedlicher Stämme, Ausbrüche

und Genotypen, sowie zwei atypische Scrapie-Isolate ausgewählt. Für die Inokulation der Zellen mit BSE wurden drei bovine Feldisolate klassischer BSE verwendet. Hirnhomogenate von gesunden Tieren fungierten als PrP^{res}-negative Kontrollinokulate.

➤ Überprüfung der Inokulate auf PrP^{res}

Die Inokulate wurden alternativ zur Infektiositätskontrolle durch den Tierversuch auf das Vorhandensein von PrP^{res} überprüft (s. Abb. 4.2). Dies erfolgte bei der Auswahl der Hirngewebe mittels Western-Blot- oder Dot-Blot-Analyse (s. Kap. 3.3.4) bzw. im weiteren Inokulationsverfahren im Zusammenhang mit der Überprüfung der Passageproben (s. Abb. 4.5).



4.1.3 Infektionsprotokoll

Um ein generell auf alle Zellen anwendbares Infektionsprotokoll zu erhalten, wurde sich zunächst an bereits etablierten Protokollen orientiert (BOSQUE u. PRUSINER 2000, VILETTE et al. 2001). Mit Hilfe der für TSE empfänglichen bzw. resistenten Kontrollzelllinien, aber auch anhand der ausgewählten Testzelllinien wurden bestimmte Kulturbedingungen (Zellkultursysteme, Temperatur, Kulturmedium, Umsatzrate) und Inokulationsparameter (Präparation der Inokulate, Inkubationszeit, Inkubationshäufigkeit) gezielt modifiziert.

4.1.3.1 Einfluss der Zellkulturbedingungen auf die PrP^C-Expressionsrate

➤ Zellkultursysteme

Für verschiedene Zellkultursysteme (Kulturflaschen: T25er, T75er; Kulturplatten: 6-Loch, 12-Loch, 96-Loch) war hinsichtlich des Wachstumsverhaltens der Zellen und der PrP^C-Expression kein Unterschied feststellbar. Ein direkter bzw. indirekter Einfluss auf den Infektionserfolg konnte nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der Handhabung und zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen

wurden bei den weiteren Infektionsversuchen T25er-Kulturflaschen verwendet. Die 96-Loch-Platten fanden unter anderem in den Klonierungsversuchen (s. Kap. 3.3.2.5) Verwendung.

➤ Temperatur

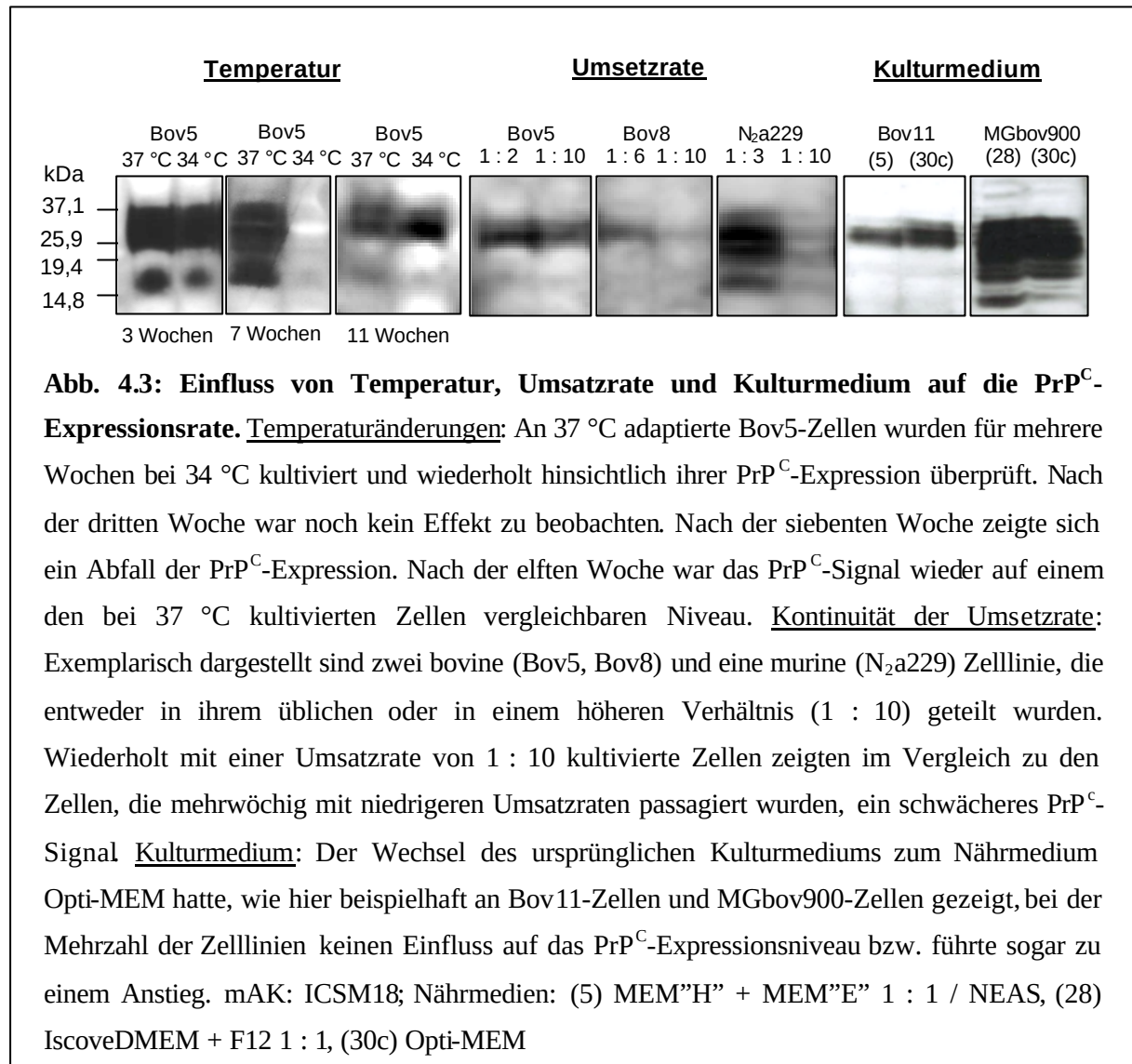
Die meisten der zur Verfügung stehenden Zelllinien haben unabhängig von einer Infektion mit TSE ihr Temperaturoptimum bei 37 °C. Im Gegensatz dazu werden aber SMB-Zellen (BIRKETT et al. 2001) bei 33 °C kultiviert. Um zu untersuchen, inwieweit sich eine Veränderung der Temperatur auch auf das Wachstumsverhalten und die PrP^C-Expression der verschiedenen Testzelllinien auswirken könnte, wurden an 37 °C adaptierte Zellen über einen längeren Zeitraum bei 34 °C kultiviert. Dies hatte jedoch nur einen geringen Einfluss bzw. führte nur zu einem temporären Abfall des PrP^C-Signals. Nach einer Adaptationsphase stieg die PrP^C-Expression wieder auf das frühere Niveau (s. Abb. 4.3). Aufgrund dieser Beobachtung wurden alle Infektionsversuche bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt.

➤ Kulturmedium

Bereits in früheren Infektionsversuchen (ScN₂a-Zellen) hatten Kulturmedien mit einem erhöhten Gehalt an Glukose (DMEM) eine positive Auswirkung auf den Infektionserfolg (BOSQUE u. PRUSINER 2000), ohne die mögliche Wirkungsweise genauer zu untersuchen. Um einen möglichen positiven Effekt dieser Kulturmedien zu ermitteln, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit alle Zelllinien zusätzlich zur Kultivierung unter den durch die Zellbank empfohlenen Kulturmedien (s. Kap. 3.2.1.1) auch unter Opti-MEM-Medium beurteilt. Die Mehrzahl der Zelllinien zeigte dabei gleich bleibende Wachstumseigenschaften mit unveränderter Morphologie und stabiler PrP^C-Expression. Bei einigen Zelllinien konnte im Vergleich zu den mit ihrem Ursprungsmedium kultivierten Kontrollzellen sogar eine geringfügig erhöhte PrP^C-Expression verzeichnet werden (Bov5, s. Abb. 4.3). Nur für sehr wenige Zelllinien (Bov12, Bov13, Bov14) war das Opti-MEM-Nährmedium nicht geeignet. Bei diesen Linien und den zur Verfügung gestellten Kontrollzelllinien (Hpl3-4, Rov) wurde in den weiteren Untersuchungen das ursprüngliche Medium beibehalten. Alle anderen Zelllinien wurden auf Opti-MEM umgestellt.

➤ Umsetzrate

Um inokulierte Zellen möglichst zügig von Restinokulat zu reinigen, wären hohe Umsetzraten von 1 zu 10 wünschenswert gewesen (KLOEHN et al. 2003), wie sie bei Tumorzelllinien (N₂a-Zellen) oder bei anderen sich schnell teilenden Zellen möglich sind. Dementsprechende Versuche zeigten jedoch, dass die Mehrzahl der Testzelllinien eine zu hohe Umsetzrate nicht tolerierte und sich das starke Vereinzeln der Zellen stattdessen negativ auf die PrP^C-Expression auswirkte (s. Abb. 4.3). Um das zu verhindern, wurde das individuelle Teilungsverhältnis der einzelnen Zelllinien beibehalten (s. Kap. 3.2.1.1).



4.1.3.2 Herstellung und Applikationsmenge der Inokulate

➤ Herstellung

Die Infektion der Zellen sollte durch die Applikation 10 %-iger Hirnhomogenate erfolgen. Dies hatte sich bereits in anderen Infektionsstudien bewährt (BOSQUE u. PRUSINER 2000, VILETTE et al. 2001). Um die Qualität und den Infektiositätsgehalt der Inokulate zu erhalten, wurden selbige unmittelbar vor der ersten Inokulation (s. Kap. 3.3.3) aus in geringen Mengen portioniert gelagerten Hirngeweben hergestellt. In frühen Versuchen hatten die Langzeitlagerung von Homogenaten, wiederholte Tau-Frier-Zyklen der Hirngewebe oder zunehmende Autolyse sowohl zu einem Abfall des PrP^{res}-Signals (ZIEGLER et al. 2004) als auch des Infektionserfolges geführt und wurden deshalb vermieden.

Für die Herstellung der Homogenate wurden zunächst verschiedene Lösungspuffer miteinander verglichen: Zellkultur-Medium, PBS, Glukose- und Saccharoselösung. Im Rahmen vergleichender Studien wiesen die Zuckerlösungen, insbesondere der Saccharosepuffer, neben ausgezeichneten

Suspensionseigenschaften einen stabilisierenden Effekt auf den PrP^{res}-Gehalt der Inokulate auf (s. Abb. 4.4). Für die weiteren Studien wurden deshalb in Saccharosepuffer hergestellte Inokulate verwendet.

➤ Applikationsmenge

Zur Bestimmung der zu applizierenden Homogenatmenge (Minimum, Maximum) wurden Infektionsstudien mit Verdünnungsstufen der hochpositiven, mauspassagierten Scrapie-Stämme 22L und 127S auf den für diese Stämme empfänglichen Kontrollzelllinien (N₂aGilch- bzw. Rov-Zellen) durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Maximalmenge applizierbaren Homogenates durch die Toleranzgrenze der Zellen auf unter 3 % (w/v) (Endkonzentration) limitiert war. Oberhalb dieser Menge war ein vermehrtes Absterben der Zellen zu beobachten. Außerdem kam es bei hohen Konzentrationen anstelle der gewünschten Feinverteilung über den Zellrasen eher zu einer direkten Aggregatbildung und Verklumpung des applizierten Gewebes. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Inokulate auch noch bei sehr niedrigen Endkonzentration (0,0003 % (w/v)) infektiös blieben. Im Vergleich zu den mit höher konzentriertem Inokulat infizierten Zellen gleicher Passagezahl war die Akkumulation von neu gebildetem PrP^{res} jedoch deutlich verzögert. Für die Infektionsstudien sollten hauptsächlich untitrierte Feldisolate unbekannten Infektiositätsgehaltes verwendet werden. Daher wurde, um eine ausreichende Infektionsdosis und eine adäquate Akkumulation neuer Prion-Erreger zu gewährleisten, basierend auf den eigenen Ergebnissen eine Endkonzentration von 0,33 % (w/v) festgelegt, die eine hohe Gewebetoleranz der Zellen mit einer maximalen Erregermenge kombiniert.

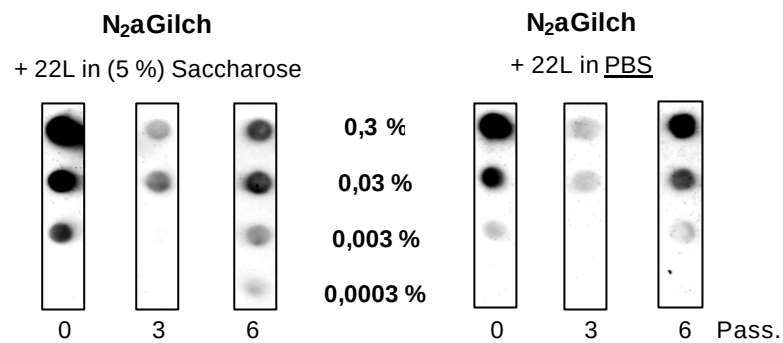


Abb. 4.4: Einfluss des Lösungspuffers zur Herstellung der Homogenate und der Endkonzentration des Inokulums auf den Infektionserfolg. N2aGilch-Zellen wurden mit dem mauspassagierten Scrapie-Stamm 22L infiziert. Dabei wurden zwei verschiedene Puffer zur Homogenisierung des Hirngewebes und verschiedene Endkonzentrationen des Inokulums eingesetzt. Dargestellt ist die Detektion von PrP^{res} mittels Dot-Blot-Analyse nicht passagierter (Pass. 0), 3x passagierter (Pass. 3) und 6x passagierter (Pass. 6) Zellen. Die Aufarbeitung der Passage 0 erfolgte zum Ende der Inkubationszeit und enthielt damit neben den Zellen auch Inokulat. Lösungspuffer: Der Vergleich der beiden Homogenisierungspuffer (Saccharose und PBS) zeigte einen stabilisierenden Effekt der Saccharose, da initial mehr PrP^{res} auf die Zellen gelangte (Passage 0) und außerdem eine schnellere Akkumulation des neu gebildeten PrP^{res} (Passage 6; 0,003%) beobachtet werden konnte. Inokulatverdünnung: Auch sehr gering konzentrierte Inokulate (22L) führten noch zur Infektion der N2aGilch-Zellen. Verglichen mit Infektionsversuchen, die mit einem höheren Gehalt an Inokulat begonnen wurden, war die Akkumulation des neu gebildeten PrP^{res} jedoch deutlich verzögert. Der Nachweis des PrP^{res} erfolgte unter Verwendung des mAK: ICSM18.

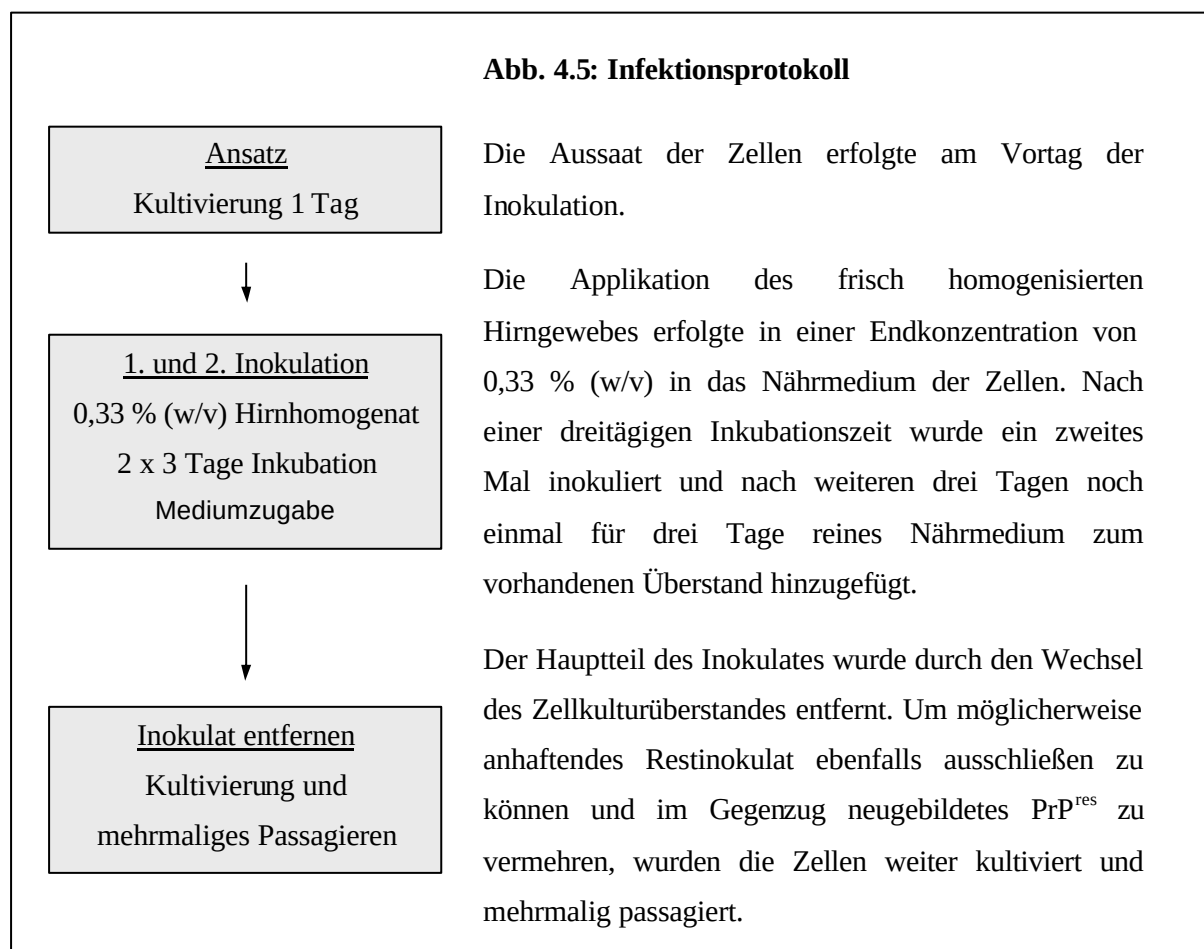
4.1.3.3 Inokulationsprotokoll

Die erfolgreiche Etablierung und Publikation einer TSE-infizierten Zelllinie war in der Vergangenheit immer begleitet von einem exakten Infektionsprotokoll, das auf die speziellen Bedürfnisse der Zelllinie abgestimmt war (VILETTE et al. 2001, KLOEHN et al. 2003). Dabei unterschieden sich unter anderem die Herstellung und die Art des Inokulates, die Applikationsmenge oder die Applikationsdauer zum Teil erheblich voneinander. Um zu untersuchen, ob der Infektionserfolg tatsächlich von der genauen Befolgung dieser Protokolle abhängt oder ob ein in gewissen Grenzen vorhandener Spielraum für ein generelles Infektionsprotokoll besteht, wurden TSE-empfindliche Kontrollzelllinien (verschiedene Na Zelllinien, Hpl3-4-Maus-Zellen, Rov-Zellen) abweichend von den für sie vorgegebenen Infektionsprotokollen inokuliert. Die entsprechenden Abweichungen bezogen sich auf die Herstellung und Konzentration der Inokulate (s. Kap. 4.1.3.2) sowie die Inkubationszeit und die Inkubationshäufigkeit. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die Modifikation der Protokolle keinen negativen Einfluss auf den prinzipiellen Infektionserfolg hatte und

dass alle TSE-empfindlichen Kontrollzelllinien, für die eigens spezielle Infektionsprotokolle entwickelt worden waren, auch mittels der in dieser Arbeit verwandten Methodik erfolgreich infiziert werden konnten.

Für die Entwicklung eines vorrangig auf nicht mausadaptierte TSE-Isolate angelegten Inokulationsprotokolles wurde, um die Aufnahme und Adaptation des Erregers zu unterstützen, eine möglichst lange Inkubationszeit festgesetzt. Durch die zweimalige Inokulation der Testzellen mit einer jeweiligen Inkubationszeit von drei Tagen und einer anschließenden zusätzlichen Nährmedienapplikation, ohne den Kulturüberstand und somit das zweite Inokulat zu entfernen, betrug der Gesamtzeitraum der Inkubation neun Tage. Auf diese Art und Weise wurde ein Dreifaches der ursprünglichen Inkubationszeit erreicht, ohne den Zellen durch verbrauchtes Nährmedium zu schaden, und die Zellen wurden zweimalig mit frischem, infektiösem Material konfrontiert.

Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen und unterstützt durch optimierte Zellkulturbedingungen, wurde ein universales Infektionsprotokoll erstellt, das im weiteren Verlauf für alle Testzelllinien dieser Studie angewendet wurde (s. Abb. 4.5).



4.2 TSE-Infektionsstudien an Zelllinien verschiedener Spezies

4.2.1 Infektionsstudien

Die 34 in den Vorversuchen ausgewählten Testzelllinien wurden mit unterschiedlichen TSE-Stämmen und -Isolaten inokuliert (s. Tab. 4.2 - 4.4): Die Inokulation mit bovinem BSE-Material erfolgte auf nahezu allen Testzelllinien. Das Scrapie-Material vom Schaf diente vorwiegend der Inokulation von Schafzelllinien, wurde aber ebenfalls auf murine, caprine und bovine Zelllinien appliziert. Des Weiteren stand eigens für die caprinen Zelllinien auch Scrapie-Material aus der Ziege zur Verfügung. Die Inokulation der eher für die Kontroll- und Vorversuche bestimmten, mauspassagierten Scrapie-Stämme wurde bei den verschiedenen Testzelllinien nur stichprobenartig durchgeführt. Das mauspassagierte BSE-Material diente speziell der Inokulation von MGbov900-Zellen, deren Entwicklung aus dem Hirngewebe einer TgbovXV-Maus erfolgt war. Als Kontrolle wurden PrP^{res}-negative Inokulate in der entsprechenden Endkonzentration mitgeführt. Die Kultur und Inokulation der Zellen erfolgte gemäß dem beschriebenen Infektionsprotokoll (s. Kap. 4.1.3.3). Um das Restinokulat aus den inokulierten Zellen zu entfernen (s. Kap. 4.3.4) und eine Anreicherung neu gebildeten PrP^{res} zu ermöglichen, wurden die Zellen nach der Zeit der Inkubation weiter kultiviert und entsprechend ihren individuellen Teilungsverhältnissen mindestens bis zu einer Verdünnungsstufe von 1 : 1000 (KLOEHN et al. 2003) passagiert. Ein Aliquot der Zellen wurde bei jeder Passage für die Detektion von PrP^{res} zurückbehalten. Mittels Dot-Blot-Analyse konnte somit zunächst der Rückgang des Restinokulates verfolgt werden (s. Abb. 4.6). Anschließend wurden die Proben hinsichtlich neu akkumulierten PrP^{res} untersucht. Folgende Resultate waren während bzw. nach der Entfernung des Restinokulates zu erwarten: A) Keine Infektion: Das PrP^{res}-Signal fällt mit der Entfernung des Restinokulates ab. Anschließend ist kein PrP^{res}-Signal mehr in der Kultur nachweisbar. B) Transiente Infektion: Während bzw. nach der Entfernung des Restinokulates ist ein Anstieg neu gebildeten PrP^{res} nachweisbar, welches jedoch nach weiteren Passagen wieder aus der Kultur eliminiert wird. C) Persistente Infektion: Das PrP^{res}-Signal bleibt in der Zellkultur stabil nachweisbar.

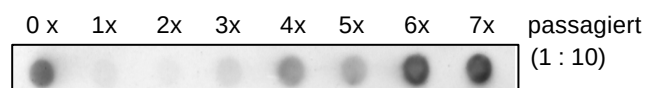


Abb. 4.6: Passagereihe von mit 22L inokulierten N₂aGilch-Zellen. Passage 0 erfolgte unmittelbar nach dem Ende der Inkubationszeit und enthält neben den beprobten Zellen auch Reste des applizierten Inokulates. Im Verlauf der Passagen (Passage 1/2) zeigt sich ein Abfall des PrP^{res}-Signals, gleichbedeutend mit der verdünnungsbedingten Entfernung des Restinokulates. Ab Passage 3 bis Passage 7 ist ein deutlicher Anstieg von neu gebildetem PrP^{res} zu erkennen. Der Nachweis des PrP^{res} erfolgte unter Verwendung des mAK: ICSM18.

Die Tabellen 4.2 bis 4.4 zeigen die Infektionsstudien an den Zelllinien im Überblick. Die erfolgreichen Infektionen wurden **rot** dargestellt. Die Inokulationen der murinen Zelllinie M^{0/0}, der ovinen Zelllinie 11 und der Wildwiederkäuerzelllinien 766 und 822 erfolgten zu Kontrollzwecken.

Tab. 4.2: Inokulationsstudien an Zelllinien von Rind und Schaf

ZB-Nr.	Name	Spezies	Alter	Organ	Umsetzrate	PrP ^c	Verwendete Inokulate
89	Bov1/KM-R2	Rind	fetal	Milz	1 : 2	+	BSE
93	Bov2/KZ-R	Rind	fetal	Zunge	1 : 2	+	BSE
96	Bov3/KNN-R	Rind	fetal	Nebenniere	1 : 2	+	BSE
154	Bov5/PES	Rind	unbekannt	unbekannt	1 : 2	+	BSE, Scrapie, RML
239	Bov6/KHY	Rind	neonatal	Hypophyse	1 : 2	+	BSE, RML, ME7
244	Bov7/KOP-R	Rind	neonatal	Oesopharynx	1 : 2	+	BSE
84	Bov8/MDBK	Rind	adult	Niere, BVDV +	1 : 6	+	BSE, Scrapie
261	Bov9/MDBK	Rind	adult	Niere	1 : 6	+	BSE, Scrapie
456	Bov10/GGE-R	Rind	embryonal	Gehirn	1 : 2	+	BSE, RML, ME7
458	Bov11/GRE-R	Rind	embryonal	Gehirn	1 : 2	+	BSE, Scrapie, RML, ME7
970	Bov12/FKD-R1	Rind	fetal	Darm	1 : 2	+	BSE
972	Bov13/FP-R	Rind	fetal	Pansen	1 : 2	+	BSE
979	Bov14/FRD-R	Rind	fetal	Darm	1 : 2	+	BSE
11	Shp1/PT	Schaf	unbekannt	Niere	1 : 6	-	BSE, Scrapie
39	Shp3/SFN-R	Schaf	neonatal	Niere	1 : 2	+	Scrapie
151	Shp7/SLU-L	Schaf	adult	Lungentumor	1 : 6	+	Scrapie
201	Shp10/ESP	Schaf	embryonal	Plexus chorioideus	1 : 2	+	BSE, Scrapie, RML, ME7
213	Shp11/SCP	Schaf	embryonal	Plexus chorioideus	1 : 2	+	BSE, Scrapie, RML, ME7

Tab. 4.3: Inokulationsstudien an Zelllinien anderer Spezies

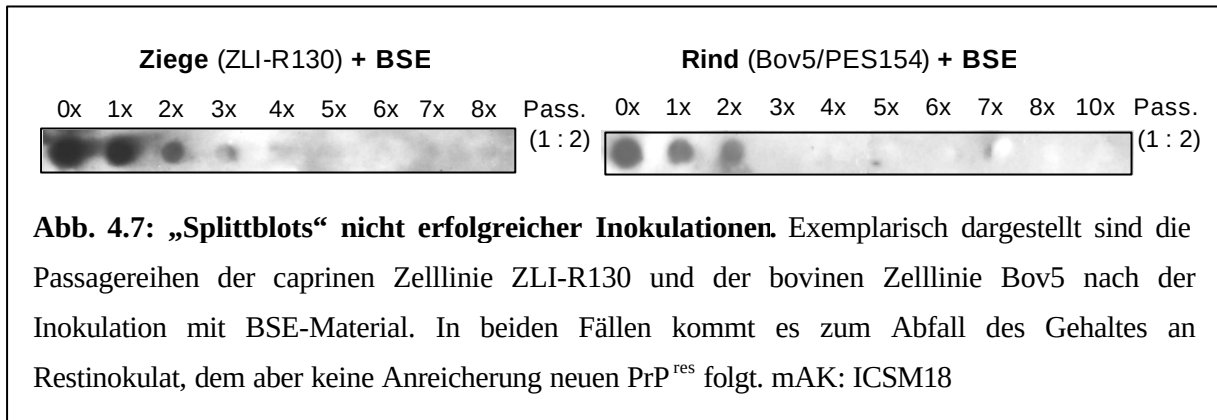
ZB-Nr.	Name	Spezies	Alter	Organ	Umsetzrate	PrP ^c	Verwendete Inokulate
120	ZLU-R	Ziege	fetal	Lunge	1 : 2	+	BSE, Scrapie, caprine Scrapie
130	ZLI-R	Ziege	fetal	Lippe	1 : 2	+	BSE, Scrapie, caprine Scrapie
242	ENG-R	Nerz	embryonal	Gehirn	1 : 2	+	BSE, ME7, RML
252	KG-R	Katze	neonatal	Gehirn	1 : 2	+	BSE, ME7, RML
378	WSG-R	Wildschwein	fetal	Vollgehirn	1 : 4	+	BSE
266	CBS	Hausschwein	fetal	Cerebellum	1 : 4	+	BSE
565	SGW-R	Hausschwein	Absetzer	Stammhirn	1 : 4	+	BSE, ME7, RML
766	DWM-R	Damwild	embryonal	Magen	1 : 2	-	BSE
822	REH-R	Reh	fetal	Hoden	1 : 2	-	BSE
197	HEK 293	Mensch	embryonal	Niere	1 : 4	+	BSE
221	Oligo	Mensch	embryonal	Oligodendroglia	1 : 4	+	nicht inokuliert
439	K562	Mensch	unbekannt	Leukemiezellen	1 : 4	+	nicht inokuliert
675	U373	Mensch	adult	Astrozytom	1 : 2	+	BSE

Tab. 4.4 Inokulationsstudien an Zelllinien der klassischen Labortiere

ZB-Nr.	Name	Spezies	Alter	Organ	Umsetzrate	PrP ^c	Verwendete Inokulate
14	L,NCTC/L929	Maus (Klon 929)	adult	Bindegewebe	1 : 6	+	BSE, RML
132	N ₂ a	Maus	adult	Neuroblastom	1 : 3/10	+	RML
229	N ₂ a	Maus	adult	Neuroblastom	1 : 3	+	BSE, Scrapie, RML
864	M0/0	Maus (PrP ^{0/0})	neonatal	Gehirn	1 : 2/10	-	BSE
900	MGbov	Maus (^{0/0} PrPbovin)	embryonal	Gehirn	1 : 3	+	BSE, Scrapie, RML, murine BSE
969	MGOV-R	Maus (^{0/0} PrPovin)	embryonal	Gehirn	1 : 4	+	BSE, Scrapie, RML
969	MGOV-R	Maus (^{0/0} PrPovin)	embryonal	Gehirn	1 : 3	+	Scrapie, RML
134	CHO-K1	Hamster	adult	Ovar	1 : 6	+	BSE, RML

4.2.1.1 Nicht infizierbare Zelllinien

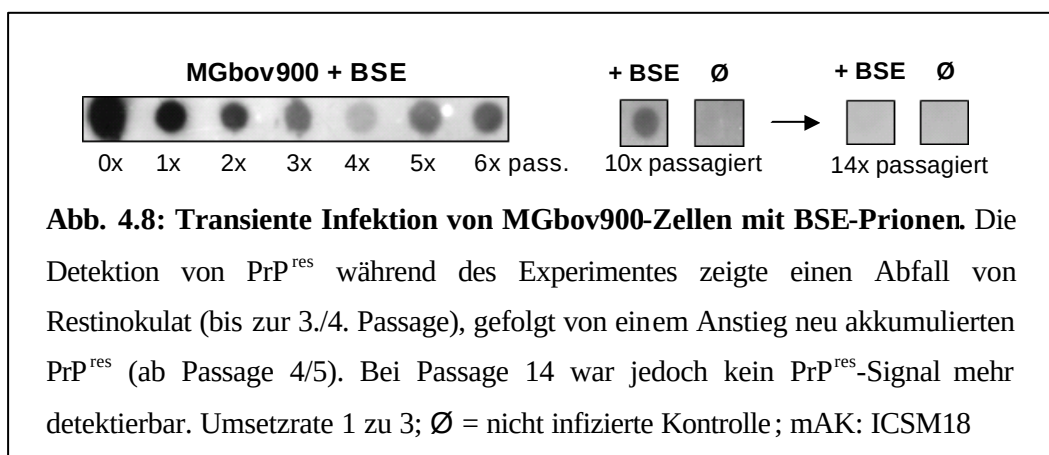
Die Mehrzahl der inokulierten Zelllinien (30 von 34) zeigte keine Empfänglichkeit für die applizierten Inokulate (s. Tab. 4.2 - 4.4). Nach Rückgang des Restinokulates war kein PrP^{res}-Signal mehr in den Proben zu detektieren und auch einer längeren Zeit der Kultivierung (ca. 20 Pass.) folgte kein Neuanstieg (s. Abb. 4.7).



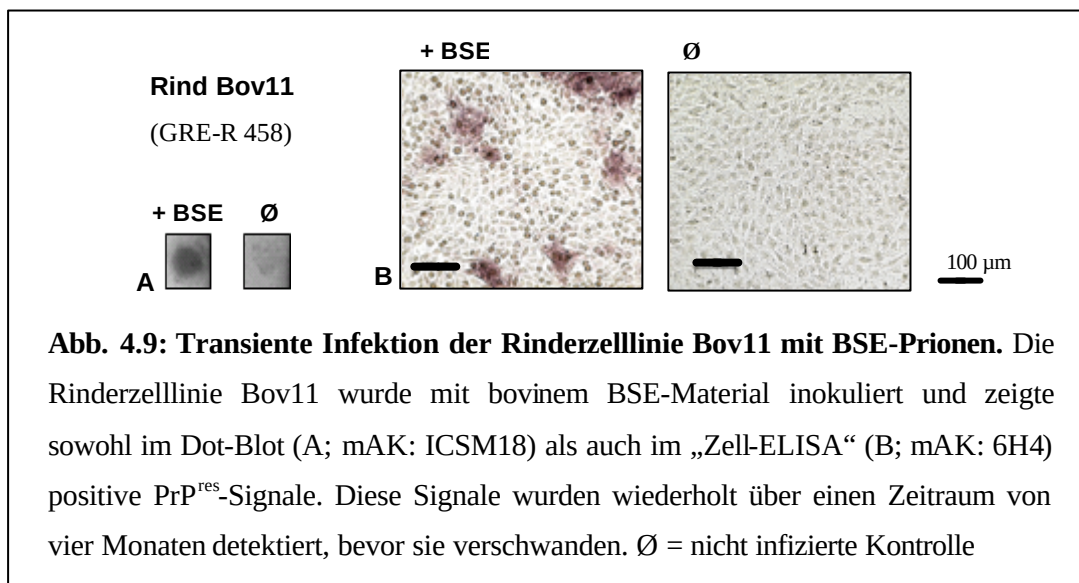
4.2.1.2 Transiente Infektionen

Zwei Zelllinien ließen sich transient mit bovinem BSE-Material infizieren. Hier war nach Abfall bzw. Entfernung des Restinokulates wieder ein Anstieg des PrP^{res}-Signals zu detektieren und das positive PrP^{res}-Signal bestätigte sich auch im direkten Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen. Der Infektionsstatus ging jedoch wieder verloren. Eine Wiederholung dieses Infektionserfolges war in beiden Fällen nicht möglich.

➤ **MGbov900** - Die MGbov900-Zelllinie entstammt dem Gehirn einer bovines PrP exprimierenden PrP^{0/0}-Maus. Es handelt sich um eine zum Zeitpunkt der Inokulation noch nicht ausgereifte Linie in frühen (< 60) Passagestadien mit unregelmäßigem Zellbild. Nach der Inokulation mit BSE-Material vom Rind konnten bei einer Umsetzrate von 1 : 3 bis zur zehnten Passage wiederholt positive PrP^{res}-Signale in der Dot-Blot-Analyse (s. Kap. 3.3.4.2) nachgewiesen werden, die nach der erneuten Testung in der vierzehnten Passage jedoch nicht mehr detektierbar waren (s. Abb. 4.8).

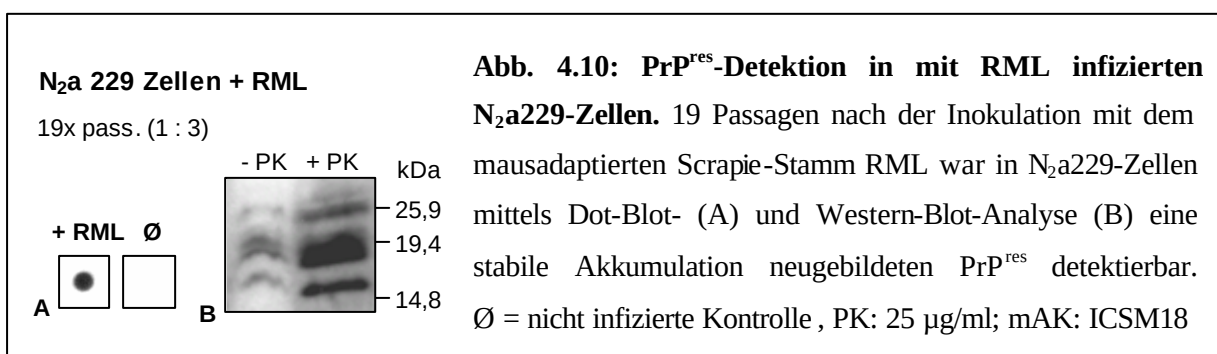


➤ **Bov11** - Die bovine Zelllinie Bov11 (GRE-R 458) entstammt dem Gehirn eines embryonalen Rindes. Die Zellmorphologie zeigt sich fibroblastoid-polymorph mit einem relativ zarten Gesamtbild und beginnender Seneszenz nach der 50. Subpassage. Nach der Inokulation mit bovinem BSE-Material wurden die Zellen bis zur 10. Passage (1 : 2) weiter kultiviert, bevor mit der Testung auf eine erfolgreiche Infektion begonnen wurde. Das im Dot-Blot (s. Kap. 3.3.4.2) anfänglich noch schwache PrP^{res}-Signal bestätigte sich nach weiteren Passagen durch den „Zell-ELISA“ (s. Kap. 3.3.4.3) und wurde wiederholt über einen Zeitraum von vier Monaten (32 Passagen) mit zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern (L42, 6H4) bestätigt, verschwand aber nach der 32. Passage (s. Abb. 4.9).

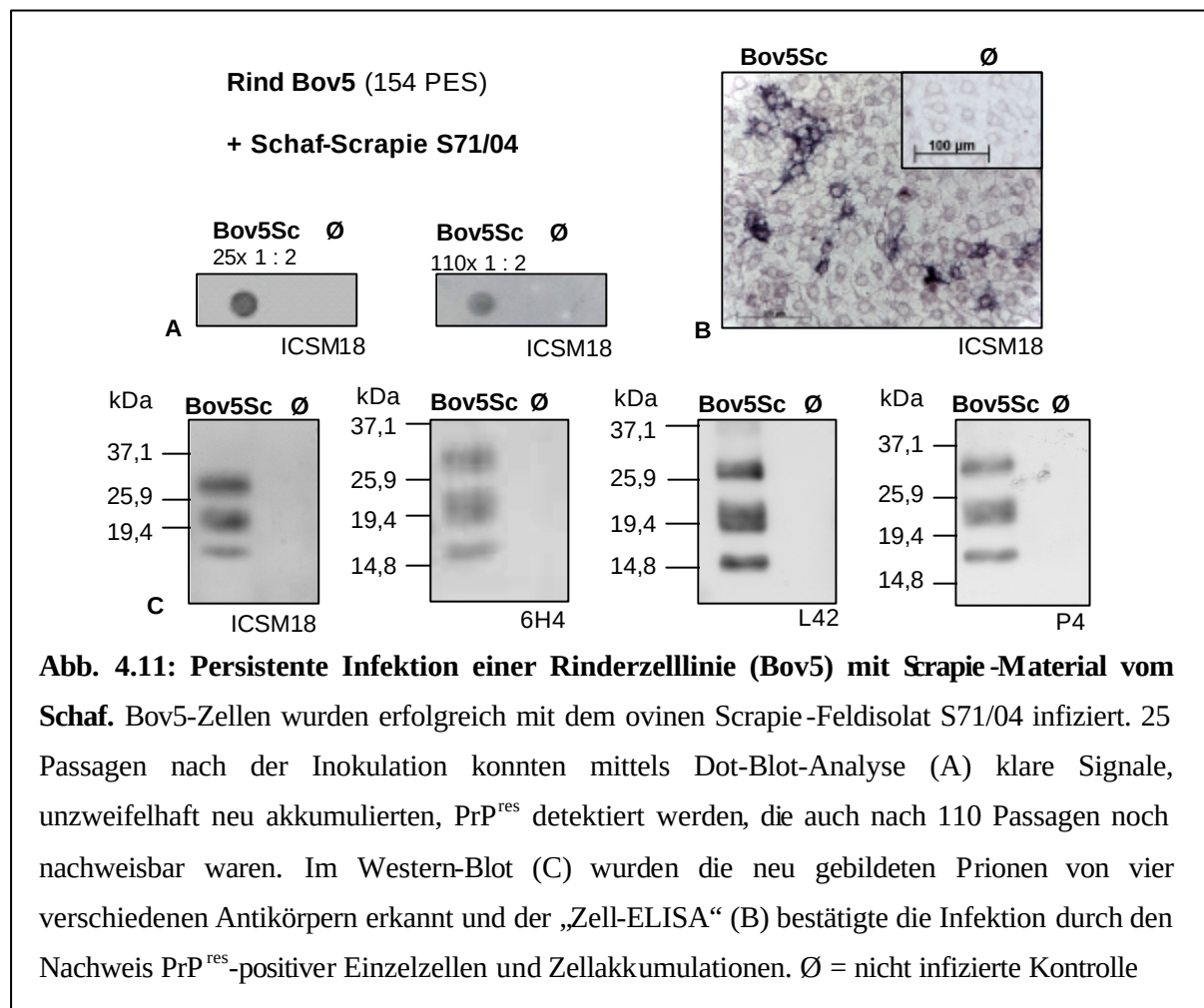


4.2.1.3 Persistente Infektionen

➤ **N₂a229** - In einer ersten Versuchsreihe wurden verschiedene N₂a-Linien auf ihre Empfänglichkeit für mausadaptiertes Scrapie-Material (RML) getestet. Dabei konnten auch unter den aus der Zellbank ausgewählten Zelllinien eine für RML empfängliche (N₂a229; Abb. 4.10) und eine für RML scheinbar resistente (N₂a132) Sublinie der bekannten N₂a-Neuroblastomzelllinie identifiziert werden. Die Infektion in den N₂a229-Zellen war persistent und PrP^{res} wurde sowohl im Dot-Blot (s. Kap. 3.3.4.2) als auch im Western-Blot (s. Kap. 3.3.4.1) als starkes Signal detektiert.



➤ **Bov5** - Eine bovine Zelllinie erwies sich empfänglich für ovine Prion-Erreger. Die Inokulation der Rinderzelllinie Bov5 (154 PES) mit einem ovinen Feldisolat klassischer Scrapie (S71/04 ARQ/ARQ) aus einem Ausbruch des Jahres 2004 führte zu einer persistenten Scrapie-Infektion. Nach sicherem Ausschluss aller Reste von Inokulat (Passage 10) wurden zunächst durch die Dot-Blot-Analyse (s. Kap. 3.3.4.2), später auch durch den Western-Blot (s. Kap. 3.3.4.1) und den „Zell-ELISA“ (s. Kap. 3.3.4.3) positive PrP^{res}-Signale detektiert (s. Abb. 4.11). Die Infektion blieb persistent. Selbst nach über 110 Passagen war nach wie vor ein stabiles PrP^{res}-Signal zu detektieren, ohne dass infizierte Zellen durch Klonierung selektiert werden mussten.



4.2.2 Charakterisierung und Etablierung der mit Schafscrapie infizierten Rinderzelllinie Bov5Sc

4.2.2.1 Ursprung und Wachstumseigenschaften nicht infizierter Bov5-Zellen

Der Ursprung dieser Zelllinie ist unbekannt und nicht mehr nachvollziehbar. In der Datenbank des FLI war die, hier als Bov5-Zellen benannte Zelllinie, als Schafzelllinie (154 PES) verzeichnet. Aus diesem Grund wurde sie zunächst mit Scrapie-Material infiziert. Die bovine Identität der Zellen wurde durch die Sequenzanalyse (s. Kap. 3.3.1.10) festgestellt, die zur Bestimmung des ovinen Genotyps vorgenommen wurde. Zur Bestimmung des Ursprungsgewebes, aus dem die Zelllinie gewonnen

worden war, wurden von Prof. Dr. J. Teifke (Institut für Infektionsmedizin, FLI, Riems) freundlicherweise immunhistologische Untersuchungen vorgenommen, die allerdings zu kontroversen Ergebnissen führten. In den durchgeführten Zell-Färbungen zeigte der neuronale Marker NSE ein negatives Signal, der neuronale Marker S100 dagegen ein positives Signal. Der muskuläre Marker Desmin ergab ein negatives, der muskuläre Marker Actin aber ein positives Signal. Das Signal für Vimentin, ein Marker des Zytoskeletts bzw. mesenchymaler Zellen, war nicht eindeutig. Das Signal für Zytokeratin, ein Marker für Epithelien, war negativ. In der Kultur wuchsen die Zellen als reguläre, polygonale Zellen in einem flächigen, einschichtigen Zellrasen, der bei Konfluenz der Zellen in einen mehrschichtigen Zellrasen überging.

4.2.2.2 Akkumulation der Prion-Erreger und Stabilität der Infektion

Nach dem vollständigen Ausschluss von Inokulatresten in der infizierten Kultur konnte eine langsame, aber stetige Anreicherung von neu gebildetem PrP^{res} detektiert werden. Bei einem Teilungsverhältnis von 1 zu 2 war zehn Passagen nach der Inokulation jegliches Restinokulat sicher auszuschließen. Mit Hilfe des Antikörpers ICSM18 wurde ein zunächst sehr schwaches PrP^{res}-Signal detektiert, das sich aber eindeutig von der nicht infizierten Kontrolle unterschied. Nach der 15. Passage handelte es sich um ein deutlich detektierbares Signal und der Infektionserfolg war durch weitere Antikörper (6H4, P4, L42) verifizierbar (s. Abb. 4.11). Während der fortgesetzten Kultivierung der Zellen kam es zu einem weitgehend stabilen Akkumulationsplateau. Die Zellen konnten ohne Infektionsverlust in Stickstoff gelagert und wieder in Kultur genommen werden (s. Kap. 3.3.2.2). Die Infektion in den Zellen war noch nach weit über hundert Passagen persistent vorhanden.

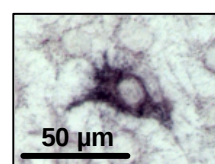
4.2.2.3 Selektion infizierter Zellklone

Um einen Einblick zu erhalten, wie viele der Zellen in der Kultur PrP^{res} bilden, wurde eine Färbung auf Einzelzellebene durchgeführt (s. Kap. 3.3.4.3). Der Nachweis PrP^{res}-positiver Einzelzellen offenbarte, dass nicht die gesamte Kultur, sondern nur ein gewisser Prozentsatz (ca. 10 %) der Zellen infiziert worden war. Durch die Selektion infizierter Zellklone (s. Kap. 3.3.2.5) war es möglich, hochpositive Sublinien zu erhalten (s. Abb. 4.12), mit denen die weitere Charakterisierung der Zellen erfolgte. In diesen Zellen war PrP^{res} auch nach über 200 Passagen unverändert stabil nachweisbar.

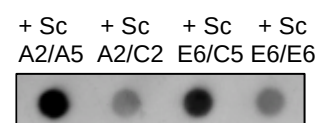
Abb. 4.12: Selektion infizierter Zellklone.

Die *in-situ*-Detektion von PrP^{res} im „Zell-ELISA“ zeigte das Vorhandensein positiver Einzelzellen unter einem weit größeren Teil nicht infizierter Zellen. Durch die wiederholte

Selektion PrP^{res}-positiver Zellklone (A2/A5, E6/C5) wurde der Anteil infizierter Zellen in der Kultur vermehrt, was zum Entstehen hochpositiver Sublinien führte. mA K: ICSM18

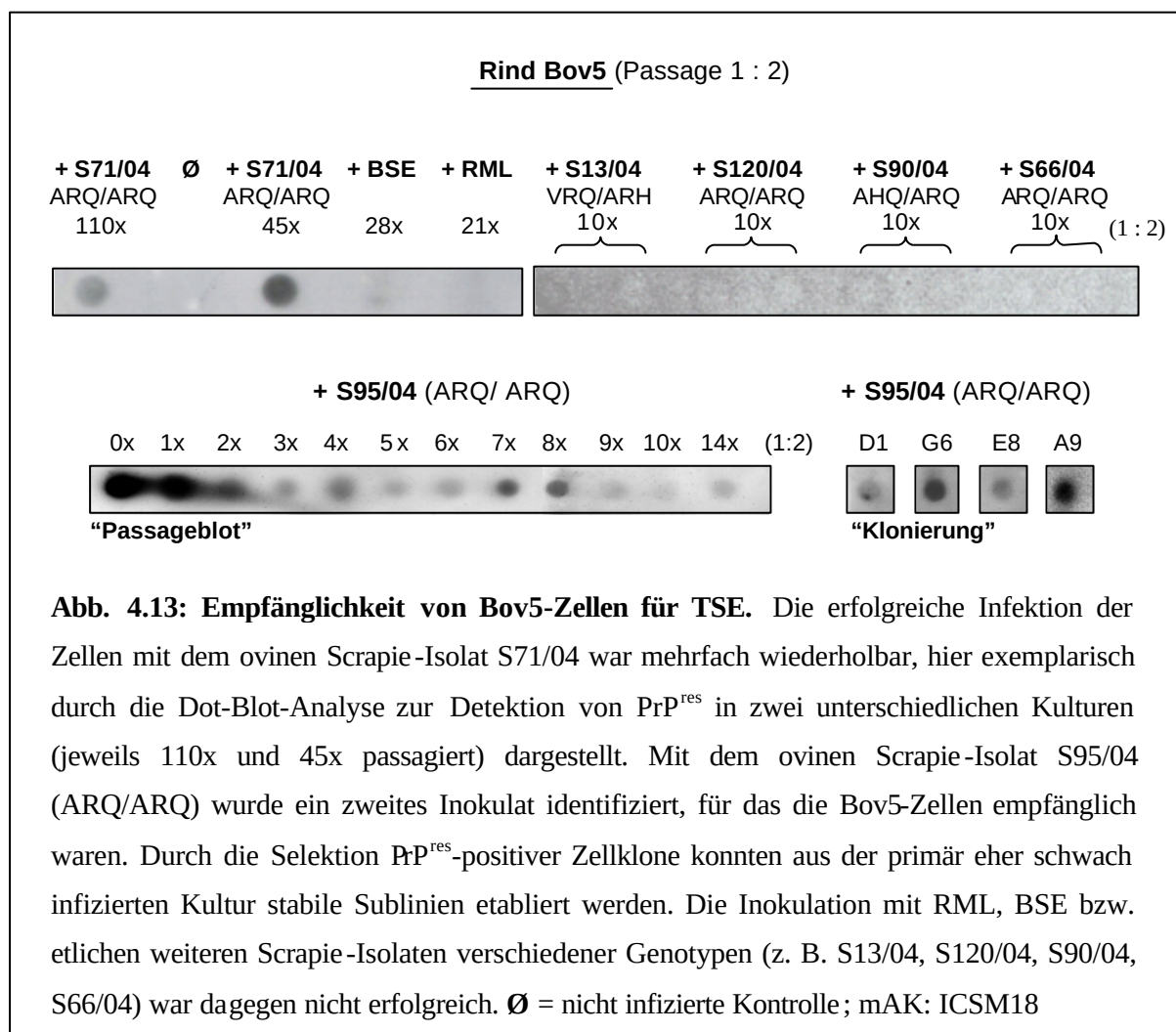


Rind Bov5 + S71/04



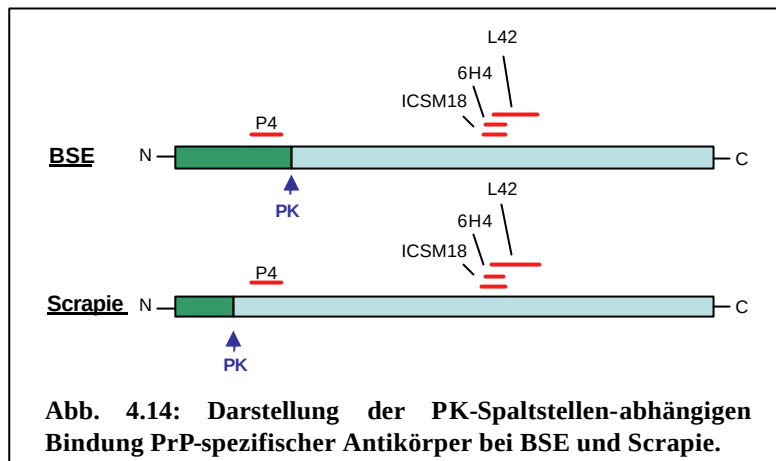
4.2.2.4 Empfänglichkeit für TSE

Die Infektion der Bov5-Zellen mit Material des Stammhirns (Bereich Obex) des Isolates S71/04 war mehrfach wiederholbar. Die Inokulation mit Material anderer Hirnregionen bspw. mit Material aus dem Stammhirn (das gesamte Gehirn des Tieres stand zur Verfügung) war dagegen nicht erfolgreich. Weiterhin schien es, als sei die TSE-Empfänglichkeit von Bov5-Zellen auf das Isolat S71/04 begrenzt. Obwohl die Zellen mit verschiedenen Isolaten klassischer und atypischer Schaf-Scrapie, mit Isolaten klassischer und atypischer BSE und mit dem mausadaptierten Scrapie-Stamm RML inokuliert wurden, führte zunächst keiner dieser Versuche zu einer Infektion. Um dennoch ein weiteres Inokulat für die erfolgreiche Infektion von Bov5-Zellen zu finden, wurden Gehirnproben von 15 Scrapie-infizierten Schafen des gleichen PrP-Genotyps (ARQ/ARQ) aus demselben Scrapie-Ausbruch getestet zu dem auch S71/04 gehörte. Es gelang schließlich, ein zweites Scrapie-Isolat (S95/04 ARQ/ARQ) zu identifizieren, für das Bov5-Zellen ebenfalls empfänglich waren. Allerdings resultierte die Infektion mit S95/04 in einer schwächeren Akkumulation von PrP^{res} und bedurfte der weiteren Selektion positiver Zellklone (s. Abb.4.13).

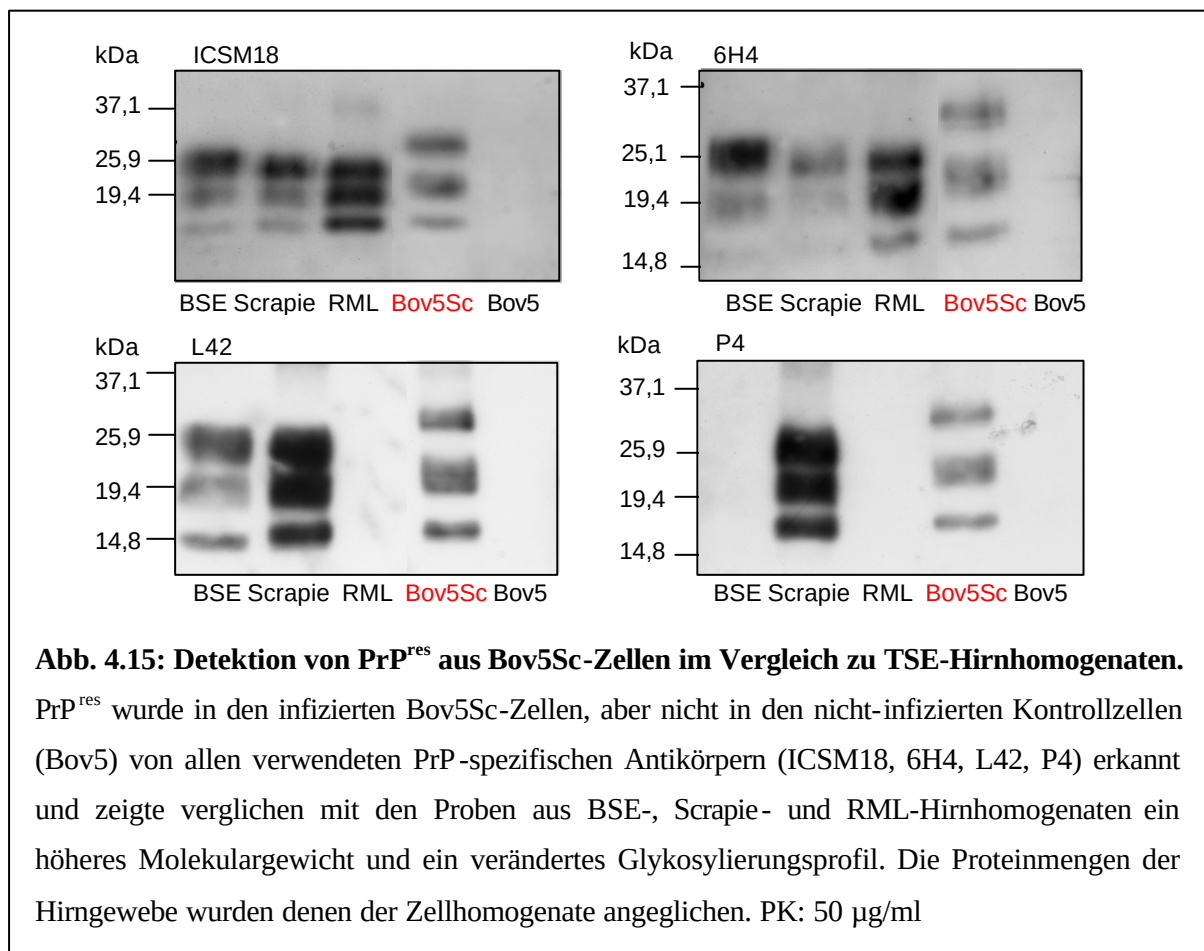


4.2.3 Laufverhalten im Western-Blot

TSE-Erreger werden durch ihre Stammeigenschaften charakterisiert und unterscheiden sich unter anderem in ihrem Glykosylierungsmuster und in ihrer Resistenz gegenüber Proteinase K und damit hinsichtlich ihres Laufverhaltens im Protein-Gel. Eine nähere Charakterisierung der Zellinfektion erfolgte daher zunächst im Vergleich mit unterschiedlichen TSE-Hirnhomogenaten (BSE, Scrapie und RML) durch die Detektion von PrP^{res} im Western-Blot mit verschiedenen Prion-Protein-spezifischen Antikörpern: P4, ICSM18, 6H4 und L42. Während BSE-PrP^{res} aufgrund der 7 bis 15 Aminosäuren weiter C-terminal gelegenen PK-Schnittstelle von dem Antikörper P4 (Epitop Schaf 89-104) nicht erkannt wird und RML aufgrund seines murinen Ursprungs weder vom P4-Antikörper noch vom L42-



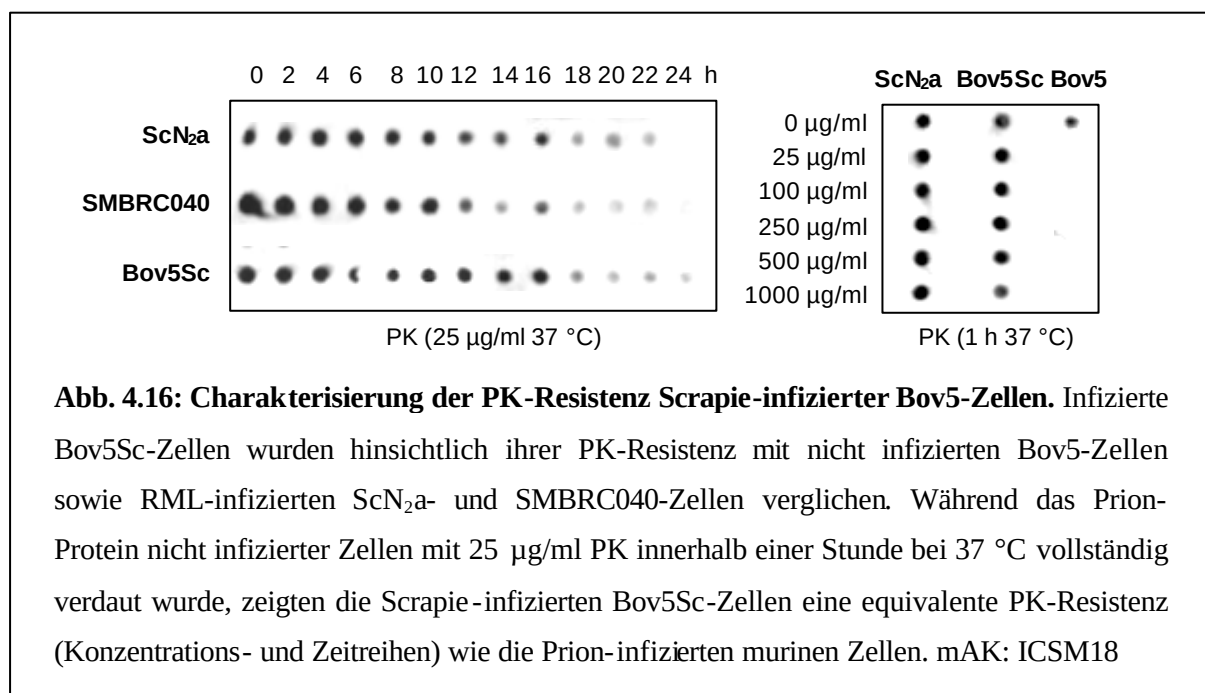
Antikörper (Epitop Schaf 145-163) detektiert wird, war das in den Scrapie-infizierten Bov5Sc-Zellen gebildete PrP^{res} durch alle vier verwendeten Antikörper nachweisbar (s. Abb. 4.15).



Hinsichtlich des Glykosylierungsmusters zeigte das PrP^{res}-Signal der Zellen in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper ein zwischen der einfach- und der zweifach-glykosylierter Bande in etwa ausgeglichenes (ICSM18) bzw. ein leicht zugunsten der einfach-glykosylierten (L42) oder auch der zweifach-glykosylierten (P4) Bande verschobenes Verhältnis, während die unglykosylierte Bande schwächer ausgeprägt war. Für die Charakterisierung des Glykoprofils ist der L42-Antikörper etabliert. Hier zeigte sich das Glykosylierungsprofil wie folgt: 23,1 % unglykosyliert, 45,1 % einfach-glykosyliert, 31,8 % zweifach-glykosyliert. Bezüglich seines Laufverhaltens im Gel war für das von den Zellen gebildete PrP^{res} verglichen mit dem der Hirnproben ein höheres Molekulargewicht festzustellen, das vor allem die zwei glykosylierten, minimal aber auch die unglykosylierte Bande betraf. Diese Unterschiede wurden durch die Deglykosylierung des Prion-Proteins weitgehend aufgehoben. Nach dem Verdau mit N-Glykosidase F war das Laufverhalten der Proben nahezu identisch.

4.2.4 Proteinase K-Resistenz

Um die Proteinase K (PK)-Resistenz des neu gebildeten PrP^{res} weiter zu charakterisieren, wurden die Bov5Sc-Zellen mit anderen TSE-infizierten Zelllinien (ScN₂a, SMBRC040) in PK-Konzentrationsstudien und PK-Zeitreihen-Experimenten verglichen (s. Kap. 3.3.5.1, 3.3.5.2). Dabei zeigte das aus den infizierten bovinen Zellen (Bov5Sc) gewonnene PrP^{res} eine minimal höhere Stabilität gegenüber dem proteolytischen Abbau als PrP^{res} aus den murinen Zellen.



4.2.5 Wirkung PrP^{res} inhibierender Substanzen

Das Verhalten TSE-infizierter Zelllinien gegenüber PrP^{res} inhibierenden Substanzen ist vor allem für die therapeutische TSE-Forschung von besonderem Interesse. Um zu überprüfen, ob die Infektion

reversibel ist, wurde die Wirkung von drei bekannten PrP^{res}-Inhibitoren: Pentosansulfat (100 µg/ml), Suramin (0,2 µg/ml) und Imatinib (10 µM) (CAUGHEY u. RAYMOND 1993, GILCH et al. 2001, ERTMER et al. 2004) auf die infizierten Bov5-Zellen im Vergleich zu den zwei murinen TSE-Kontrollzelllinien ScN₂a und SMBRC040 untersucht. In den ScN₂a-Zellen und in den SMB-Zellen war die Menge an PrP^{res} nach vier Tage deutlich reduziert und elf Tage nach der Substanzapplikation nicht mehr nachweisbar. Bei den bovinen Zellen erfolgte ebenfalls eine „Heilung“, die Reaktionszeit war jedoch wesentlich länger. Sie betrug vier Wochen für Pentosansulfat bzw. Suramin und vier Monate für Imatinib. Infolge der Substanzapplikation zeigte sich weiterhin eine deutliche, aber reversible Reduktion des endogenen PrP^C.

4.2.6 Reinfektion nach Heilung

Nachdem durch die Wirkung der Inhibitoren in den Bov5-Zellen kein PrP^{res} mehr detektierbar war, sollte untersucht werden, ob eine erneute TSE-Infektion mit dem gleichen oder mit anderen Isolaten möglich sei. Die Reinfektion mit dem Scrapie-Isolat S71/04 konnte nicht durchgeführt werden, da kein Obexmaterial mehr für die Inokulation zur Verfügung stand (siehe Kap. 4.2.2.4). Die Infektion mit dem Scrapie-Isolat S95/04 führte aber zu einer erneuten Infektion der Zellen (s. Abb. 4.17).

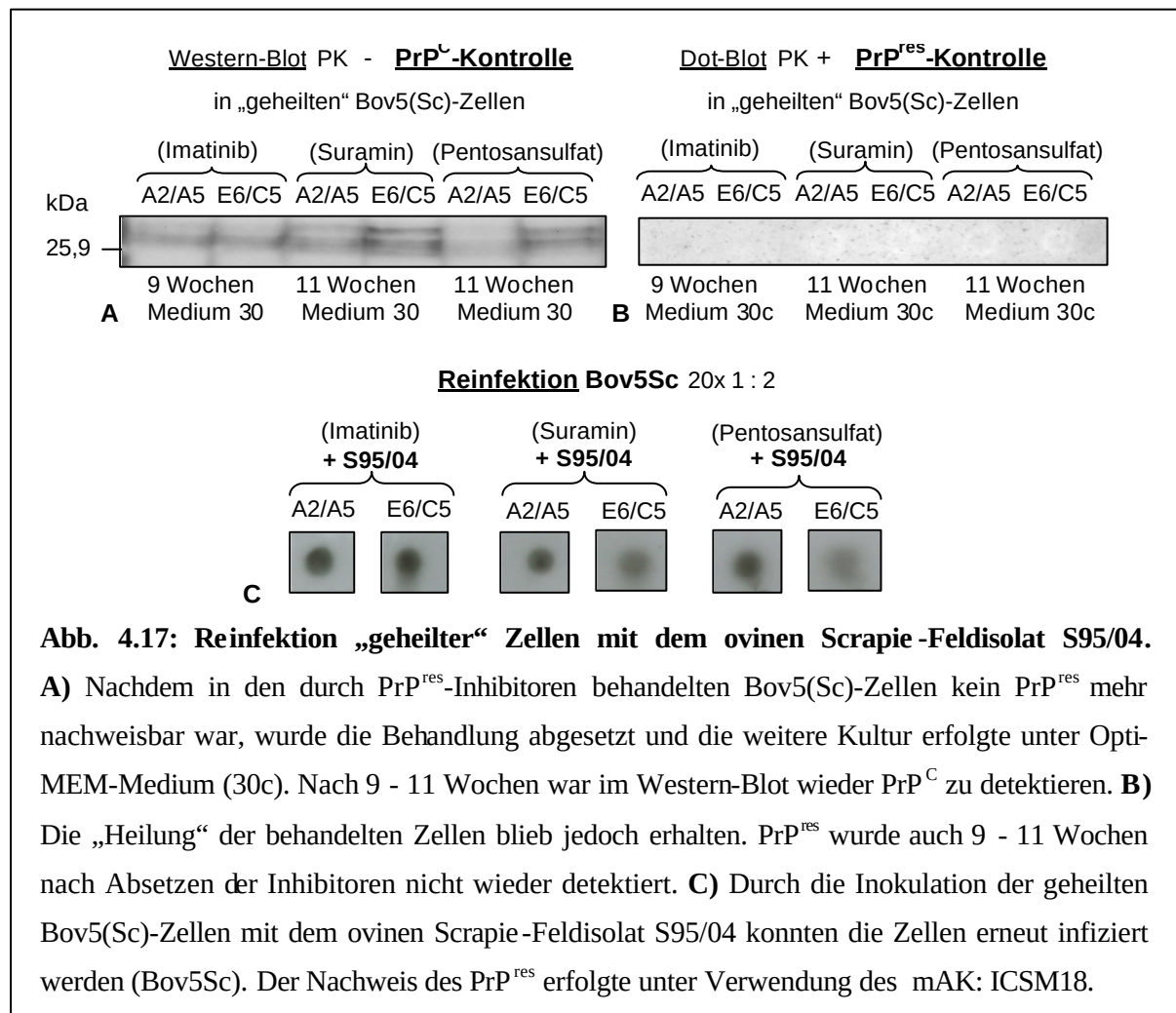


Abb. 4.17: Reinfektion „geheilte“ Zellen mit dem ovinen Scrapie-Feldisolat S95/04.

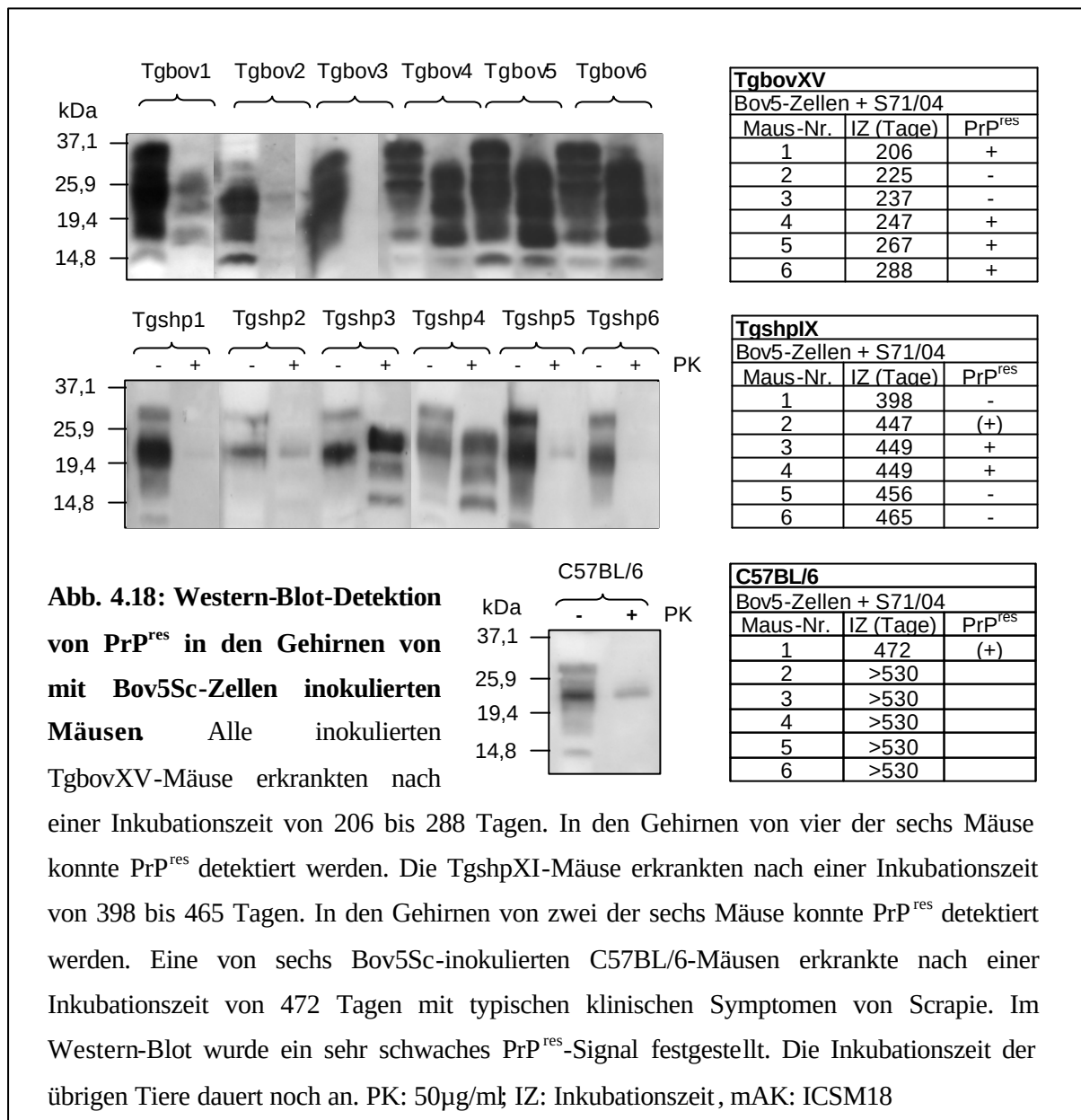
A) Nachdem in den durch PrP^{res}-Inhibitoren behandelten Bov5(Sc)-Zellen kein PrP^{res} mehr nachweisbar war, wurde die Behandlung abgesetzt und die weitere Kultur erfolgte unter Opti-MEM-Medium (30c). Nach 9 - 11 Wochen war im Western-Blot wieder PrP^C zu detektieren. **B)** Die „Heilung“ der behandelten Zellen blieb jedoch erhalten. PrP^{res} wurde auch 9 - 11 Wochen nach Absetzen der Inhibitoren nicht wieder detektiert. **C)** Durch die Inokulation der geheilten Bov5(Sc)-Zellen mit dem ovinen Scrapie-Feldisolat S95/04 konnten die Zellen erneut infiziert werden (Bov5Sc). Der Nachweis des PrP^{res} erfolgte unter Verwendung des mAK: ICSM18.

4.2.7 Verifikation der in den Zellen vorhandenen Infektiosität im Mausmodell

Der Beweis, dass die PrP^{res}-bildenden Bov5Sc-Zellen Infektiosität enthalten, sollte durch die Infektion von Mäusen erbracht werden. Zu diesem Zweck wurden drei Gruppen von Tieren ausgewählt: a) transgene, das bovine PrP überexprimierende Mäuse (TgbovXV), b) transgene, das ovine PrP überexprimierende Mäuse (TgshpIX) und c) C57BL/6-Wildtypmäuse.

4.2.7.1 Infektion der Mäuse

Die Inokulation sowie die spätere klinische Überwachung und Euthanasie der Mäuse wurde durch Dr. A. Weber und B. Hammerschmidt (FLI-INNT, Riems) vorgenommen. Die Applikation der infizierten Zellen erfolgte unter Narkose durch die intrazerebrale Injektion (30 µl/Tier) von 10 %-igen Zellsuspensionen (in PBS). Beim Auftreten terminaler Symptome einer Prionerkrankung wurden die Tiere getötet und das Gehirn zur Detektion von PrP^{res} entnommen. Innerhalb einer Inkubationszeit von 206 - 288 Tagen erkrankten alle inokulierten TgbovXV-Mäuse mit typischen klinischen Symptomen von Scrapie. In den Gehirnen von vier der sechs Mäuse wurde PrP^{res} mittels Western-Blot-Analyse (s. Kap. 3.2.4.1) nachgewiesen. Die TgshpIX-Mäuse erkrankten innerhalb von 398 - 465 Tagen. Hier konnten zwei der sechs Mäuse im Western-Blot PrP^{res}-positiv getestet werden. Aus der Gruppe der C57BL/6-Wildtyp-Mäuse erkrankte bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur eine der sechs Mäuse nach einer Inkubationszeit von 472 Tagen. Bei den anderen Tieren sind bisher (530 Tage nach Inokulation) noch keine klinischen Symptome festzustellen (s. Abb. 4.18).



4.2.7.2 Laufverhalten von PrP^{Sc} im Western-Blot im Vergleich zu den infizierten Bov5-Zellen

Wie schon bei den TSE-Feldisolaten bzw. dem mausadaptierten Scrapie-Stamm RML (siehe Abb. 4.15) zeigte sich auch im Vergleich von in den TgbovXV- und TgshpIX-Mäusen nachweisbarem PrP^{res} und dem von den Bov5-Zellen gebildeten PrP^{res} ein abweichendes Laufverhalten im Western-Blot (s. Abb. 19). Besonders die Bande des zweifach-glykosylierten PrP^{res} der beiden Gehirnproben wies ein geringeres Molekulargewicht auf als die des aus der Zellkultur stammenden PrP^{res}. Die Gewebekomponenten unterschieden sich auch untereinander im Laufverhalten und dem Verhältnis der glykosylierten Banden zueinander.

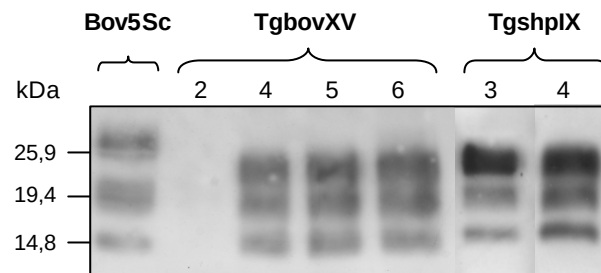


Abb. 4.19: Vergleichende Untersuchung im Western-Blot zum Laufverhalten von PrP^{res} aus Bov5Sc-Zellen, Bov5Sc-infizierten TgbovXV-Mäusen und Bov5Sc-infizierten TgshpIX-Mäusen. Das Laufverhalten von PrP^{res} aus TgbovXV- und TgshpIX-Mäusen weist im Western-Blot ein deutlich niedrigeres Molekulargewicht auf als das der infizierten Zellen. Die Proteinmengen der Hirngewebe wurden dem der Zellprobe angeglichen. PK: 50µg/ml; mAK: ICSM18

4.2.7.3 Infektion der Bov5-Zellen mit mausadaptierter Bov5-Scrapie

Es stellte sich die Frage, ob die Übertragung der in den Bov5Sc-Zellen gebildeten Prion-Erreger auf TgbovXV-Mäuse zu einer Veränderung der Stammeigenschaften führt, die bedingt, dass die neu gebildeten Prion-Erreger nicht wieder zurück auf die Bov5-Zellen übertragbar sind (s. Kap. 4.2.7.1). Die Applikation von Hirngewebe einer PrP^{res} -positiven TgbovXV-Maus (Tgbov1, s. Abb.4.20) wie auch einer PrP^{res} -negativen TgbovXV-Maus (Tgbov3; deutliche Klinik) auf die Bov5-Zellen führte allerdings zu einer eindeutigen transienten Infektion der Zellen.

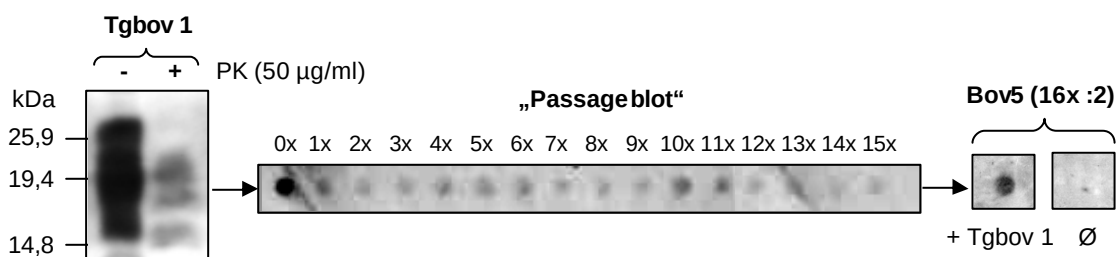


Abb. 4.20: Inokulation von Bov5-Zellen mit mausadaptiertem Bov5-Scrapie Zehn Passagen nach der Inokulation von Bov5-Zellen mit Hirnmaterial aus Bov5Sc-infizierten TgbovXV-Mäusen war das Vorhandensein von Restinokulat auszuschließen, aber bis zur 25. Passage nach der Inokulation der Zellen wurden PrP^{res} -positive Signale im Dot-Blot detektiert. Ø = nicht infizierte Kontrolle; PK (Gehirn): 50µg/ml; PK (Zellen): 25µg/ml; mAK: ICSM18

4.3 TSE-Infektionsstudien an transgenen Zelllinien

Parallel zu den Infektionsversuchen mit natürlichen Zelllinien wurden in einem zweiten Ansatz transgene Zelllinien hergestellt, die auf der Basis von TSE-empfindlichen Zelllinien das PrP^C verschiedener Spezies (s. Kap. 4.3.1) exprimieren. Diese transgenen Zelllinien wurden anschließend durch die Inokulation mit unterschiedlichen TSE-Erregern auf ihre Empfänglichkeit für Prion-Erreger untersucht.

4.3.1 Entwicklung transgener Zelllinien

In Anlehnung an erfolgreiche Infektionsversuche mit Rov-Zellen (VILETTE et al. 2001) und HpL3-4Mo3F4PrP-Zellen (MAAS et al. 2007) wurden auf der Grundlage der Zelllinie RK13 (Kaninchen; Nierenepithel) und der murinen, PrP-defizienten, neuronalen Zelllinie Hpl3-4 (KUWAHARA et al. 1999) transgene Zelllinien hergestellt, die das zelluläre Prion-Protein von Maus (Mu), Nerz (Mink), Hund (Can), Schaf (Shp), einer Chimäre zwischen Maus und Schaf (Mushp) sowie auch einer Chimäre zwischen Maus und Rind (Mubo) überexprimierten (s. Abb. 4.21).

Die Herstellung der PrP^C überexprimierenden Hpl3-4-Zellen (s. Tab. 4.5) erfolgte innerhalb der Arbeitsgruppe unter Verwendung eines murinen retroviralen Expressionssystems (pSFF-Expressionsvektor, BESTWICK et al. 1988). Für die Generierung der transgenen RK13-Zellen (s. Tab. 4.6) standen PrP-Konstrukte aus Nerz, Hund, Schaf und einer Maus/Schaf-Chimäre (im pcDNA3.1/Zeo+-Vektor-System) zur Verfügung. Darüber hinaus wurde ausgehend von genomischer DNA aus dem Gewebe einer TgMuboXIII-Maus (BUSCHMANN et al. 2000) ein in den pcDNA3-Vektor kloniertes Maus/Rind-Chimärenkonstrukt (Mubo) hergestellt (s. Kap. 3.3.1). Die Transfektion der RK13-Zellen mit den verschiedenen Plasmidkonstrukten erfolgte durch das Verfahren der Lipotransfektion (s. Kap. 3.3.2.4). Im Anschluss daran wurden die transgenen RK13-Zellen in Opti-MEM-Nährmedium unter Zeocin-Selektionsdruck kultiviert und im Hinblick auf eine stabile und hohe Expression von PrP^C subkloniert (s. Kap. 3.3.2.5).

Tab. 4.5: Transgene Zelllinien auf der Basis von Hpl3-4-Zellen

Name	Spezies*	PrP ^C	Inokulate**
Hpl3-4	Maus (0/0)	-	
Hpl3-4Mu	Maus (0/0PrPmurin)	+	ME7, RML, 22L
Hpl3-4Mink	Maus (0/0PrPmink)	+	
Hpl3-4Can	Maus (0/0PrPcanin)	+	BSE
Hpl3-4Shp	Maus (0/0PrPovin)	+	BSE, Scrapie (S71/04), RML
Hpl3-4MuShp	Maus (0/0PrPmushp)	+	BSE, Scrapie (S71/04), RML

* Die originären Hpl3-4-Zellen entstammten dem Hippokampus einer PrP^{0/0}-Maus und bildeten deshalb kein eigenes murines PrP^C. Nach Transduktion durch das entsprechende rekombinierte murine Retrovirus wurde heterologes PrP^C von Maus, Nerz, Hund, Schaf oder einer Mushp-Chimäre exprimiert. Diese Zellen wurden durch Dr. Geissen (FLI-INNT, Riems) hergestellt.

** In den sich anschließenden Infektionsstudien wurde BSE-Material bzw. ovines oder mausadaptiertes Scrapie-Material verwendet. Die erfolgreichen Infektionsversuche sind rot dargestellt.

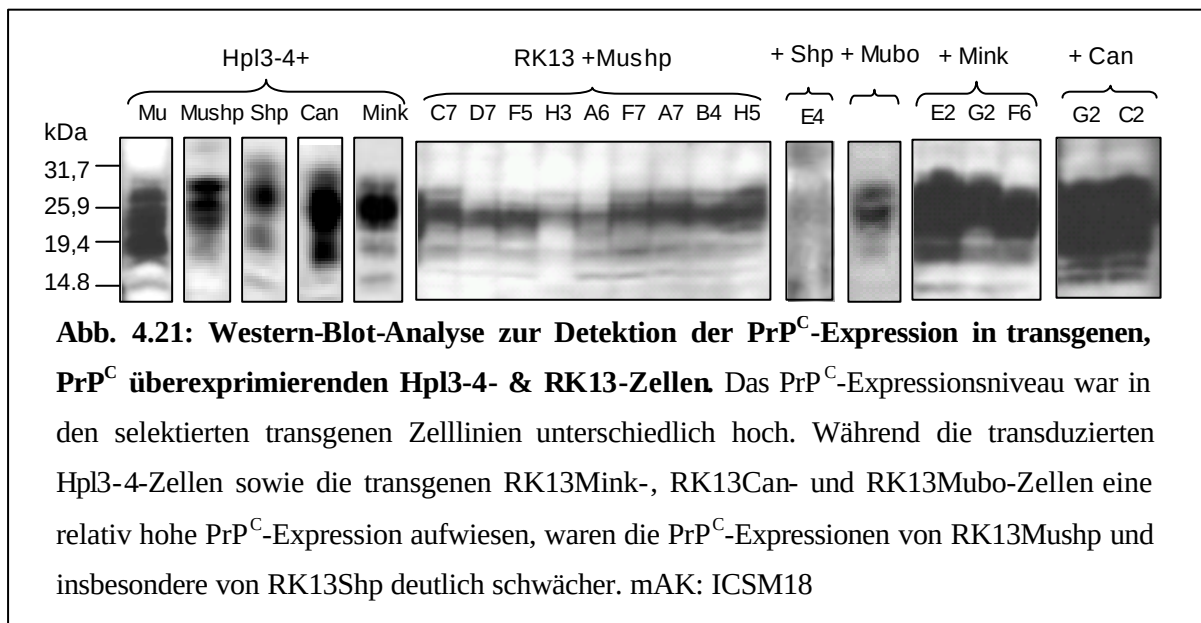
Tab. 4.6: Transgene Zelllinien auf der Basis von RK13-Zellen

	Spezies*		Inokulate**
Rov	Kaninchen (raPrPovin) + Doxy	+	BSE, Scrapie (S71/04, S12/04), S127 , ME7, RML
Rov (-)	Kaninchen (raPrPovin) - Doxy	-	
RK13Mink	Kaninchen (raPrPmink)	+	BSE
RK13Can	Kaninchen (raPrPcanin)		BSE
RK13Shp	Kaninchen (raPrPovin)	(+)	
RK13Mushp	Kaninchen (raPrPmushp)	+	BSE, Scrapie (S71/04), RML
RK13Mubo	Kaninchen (raPrPmubo)	+	BSE, RML

* Die originären RK13-Zellen entstammen dem Nierenepithel eines Kaninchens. Im untransfizierten Zustand wird kein bzw. kein detektierbares PrP^C exprimiert. Nach Transfektion mit dem entsprechenden Plasmidkonstrukt exprimierten die Zellen heterologes PrP^C von von Maus, Nerz, Hund, Schaf, einer Maus/Schaf-Chimäre oder einer Maus/Rind-Chimäre. Diese Zelllinien wurden, abgesehen von den Rov-Zellen, im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt. Die Rov-Zellen basieren auf den RK13-Zellen und exprimieren, abhängig von einem *Tet-on*-System, ovines PrP^C. Sie wurden für diese Arbeit von D. Vielletto und H. Laude zur Verfügung gestellt.

** In den sich anschließenden Infektionsstudien wurde BSE-Material bzw. ovines oder mausadaptiertes Scrapie-Material verwendet. Die erfolgreichen Infektionsversuche sind **rot** dargestellt.

Der Erfolg der Transfektion (RK13) und die erfolgreiche Transduktion (Hpl3-4) wurden durch die Detektion von PrP^C im Western-Blot (s. Kap. 3.3.4.1) überprüft (s. Abb. 4.21).



4.3.2 Infektion von transgenen Zelllinien

Die Infektion der transgenen Zelllinien und die Entfernung von Inokulatresten erfolgten gemäß dem etablierten Infektionsprotokoll (s. Kap. 4.1.3.3). Ihren Umsatzraten entsprechend (RK13 1 : 4, Hpl3-4 1 : 10) wurden die Zellen bis zu einer Verdünnungsstufe von 1 : 1000 passagiert. Der Rückgang des Restinokulates wurde mittels Dot-Blot-Analyse (s. Kap. 3.3.4.2) überprüft. Anschließend erfolgte die

Testung der Zellen hinsichtlich neu akkumulierten PrP^{res} (s. Kap. 3.3.4.1 und 3.3.4.2). Tabelle 4.5 und 4.6 zeigen die Infektionsstudien an den transgenen Zelllinien im Überblick.

Die Inokulation der Hpl3-4Mu-Zellen mit dem mauspassagierten Scrapie-Stamm 22L und die Inokulation der Rov-Zellen mit dem mauspassagierten Scrapie-Stamm 127S dienten der prinzipiellen Erfolgskontrolle und führten bei beiden Zelllinien zur Infektion. Die Hpl3-4Mu-Zellen konnten darüber hinaus mit dem mauspassagierten Scrapie-Stamm RML infiziert werden, während die Rov-Zellen für andere Infektionsversuche (BSE, Scrapie, ME7 und RML) unempfindlich waren.

Weiterhin erwiesen sich die RK13Mushp-Zellen (RK13-Zellen mit Maus/Schaf-Chimäre transfiziert) empfänglich für RML. Bei dieser Linie war die initial schwache Akkumulation von PrP^{res} durch die Selektion von infizierten Zellklonen zu steigern, so dass schließlich hochpositive Sublinien erhalten wurden. Überraschenderweise waren die Infektionsversuche mit RML an den Hpl3-4Mushp-Zellen, die das gleiche Maus/Schaf-Chimärenkonstrukt exprimierten wie die RK13Mushp-Zellen, nicht erfolgreich. Genauso scheiterten auch alle Versuche, die transgenen Zelllinien mit BSE oder Scrapie-Feldisolaten zu infizieren.

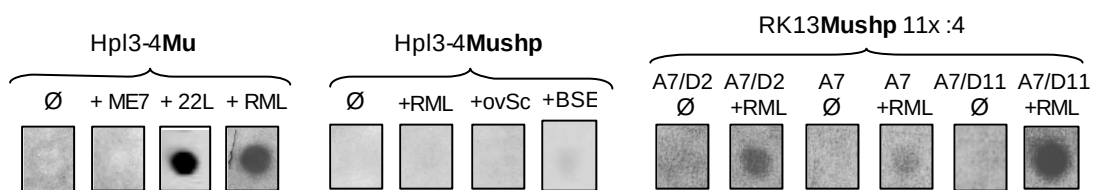


Abb. 4.22: Dot-Blot-Analyse zur Detektion von PrP^{res} in TSE-inokulierten transgenen Zelllinien. Exemplarisch dargestellt ist die Detektion von PrP^{res} in den TSE-inokulierten transgenen Zelllinien Hpl3-4Mu, Hpl3-4Mushp und verschiedenen Sublinien von RK13Mushp. Hpl3-4Mu-Zellen zeigten sich empfänglich für eine Infektion mit 22L und RML, nicht jedoch für den mausadaptierten Scrapie-Stamm ME7. RK13Mushp-Zellen ließen sich ebenfalls durch RML infizieren. Durch die Selektion PrP^{res}-positiver Zellklone konnte die initial schwache Akkumulation von PrP^{res} gesteigert werden. Die Kombination dieses Mushp-Chimärenkonstruktes mit den Hpl3-4-Zellen (Hpl3-4Mushp) resultierte jedoch nicht in einer Empfänglichkeit für RML. Ebenso war keine der transgenen Zelllinien empfänglich für die Infektionsversuche mit TSE-Feldisolaten. Ø = nicht infizierte Kontrolle

5 Diskussion

In den letzten 30 Jahren wurden wesentliche Fortschritte in allen Bereichen der Prion-Forschung erzielt. Zellkulturarbeiten hatten daran einen weit reichenden Anteil. Nichtsdestotrotz basiert die überwiegende Zahl der stabil infizierten Zelllinien noch immer auf Zellen aus Nagetieren. Ebenso eingeschränkt ist das Erregerspektrum, mit dem sich diese Zelllinien infizieren lassen. Weiterhin sind die für die prinzipielle TSE-Empfänglichkeit einer Zelllinie verantwortlichen Faktoren nach wie vor ebenso ungeklärt wie die Phänomene der Stamm- und Speziesbarrieren. In der vorliegenden Arbeit sollten neue TSE-empfindliche Zelllinien identifiziert werden, die sich insbesondere mit Scrapie- oder BSE-Feldisolaten aus Wiederkäuern infizieren lassen. Der „Protein-only“-Hypothese (PRUSINER 1982) zufolge müssen dafür prinzipiell mindestens zwei Voraussetzungen erfüllt sein: eine ausreichende PrP^C-Expression der zu infizierenden Zellen und ein hoher Erregergehalt im Inokulat. Die Tatsache, dass bisher nur sehr wenige TSE-infizierte Zelllinien etabliert werden konnten, während viele andere nicht infizierbar waren, deutet außerdem darauf hin, dass noch weitere, bisher unbekannte zelluläre und/oder methodische Faktoren für den Infektionserfolg essentiell sein müssen. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit einerseits Infektionsversuche an einer Vielzahl natürlicher eukaryotischer Zelllinien (34 Zelllinien) unterschiedlicher Spezies und Gewebetypen durchgeführt, um neue TSE-empfindliche Zelllinien zu identifizieren. In einem zweiten Arbeitsansatz wurden darüber hinaus transgene Zelllinien hergestellt, die auf der Basis bekanntermaßen TSE-empfindlicher Zellen die zellulären Prion-Proteine heterologer Spezies exprimierten. Auch diese Zellen wurden durch Infektionsversuche mit unterschiedlichen TSE-Stämmen und -Isolaten auf ihre TSE-Empfänglichkeit untersucht. Zu Beginn dieser Infektionsversuche wurden möglicherweise essentielle methodische Faktoren soweit wie möglich im Rahmen der Entwicklung eines allgemeinen Infektionsprotokolls für Zellen analysiert.

5.1 Evaluierung und Optimierung der Infektionsbedingungen

Als Substrat der Konversionsreaktion ist PrP^C für die Infektion essentiell (BUELER et al. 1993). Aus diesem Grund kam der PrP^C-Expression bei der Auswahl der Testzelllinien und bei der Evaluierung der Zellkulturbedingungen eine besondere Bedeutung zu. Da sich sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (SCOTT et al. 1992, KOCISKO et al. 1995, PRIOLA u. CHESEBRO 1995, HORIUCHI et al. 2000, VANIK et al. 2004, KUPFER et al. 2007) gezeigt hatte, dass die speziesspezifische Aminosäuresequenz einen entscheidenden Einfluss auf die Konvertierbarkeit des Proteins durch bestimmte TSE-Erreger hat, wurden für die Infektionsstudien vor allem solche Zelllinien ausgewählt, die einer Spezies entstammten, die natürlich oder zumindest experimentell mit TSE infizierbar war und in deren Ursprungsgewebe bereits PrP^C, bestenfalls sogar PrP^{res}, nachweisbar gewesen war. In der Annahme, dass ein hohes PrP^C-Expressionsniveau in den Zellen den Infektionserfolg steigern würde (BUSCHMANN et al. 2000, VILETTE et al. 2001, VILOTTE et al. 2001), wurde die tatsächliche PrP^C-Expression der ausgewählten Zellen im Verlauf der Kultivierung wiederholt überprüft. Dabei

zeigte sich, dass diese erheblichen Schwankungen unterliegt, die durch bestimmte Kulturbedingungen (Nährmedium, Kontinuität der Teilungs- bzw. Umsetzrate) maßgeblich beeinflusst werden. Ein entscheidender erster Ansatz bei der Optimierung des Infektionsprotokolls war die Verwendung von Opti-MEM als Kulturmedium: Verglichen mit anderen Medien steigerte Opti-MEM die PrP^C-Expression der Zellen. Es ist wahrscheinlich, dass sich dabei der hohe Glukosegehalt des Mediums positiv auf die Zellen und damit möglicherweise indirekt auch fördernd auf die Proteinexpression ausgewirkt hat. Bereits in früheren Studien (BOSQUE u. PRUSINER 2000) war bei der Kultur von N₂a- und ScN₂a-Zellen unter „high-glucose“ DMEM ein stärkeres Zellwachstum festgestellt und darüber hinaus der hohe Glucosespiegel im Medium mit einer gesteigerten Empfänglichkeit der Zellen für den mauspassagierten Scrapie-Stamm RML in Verbindung gebracht worden (BOSQUE u. PRUSINER 2000). Es ist denkbar, dass diese Beobachtung zumindest teilweise durch eine höhere PrP^C-Expression der Zellen begründet gewesen sein könnte. In jedem Fall wurde Opti-MEM im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgrund der hohen PrP^C-Expression als Einheitsmedium ausgewählt. Nur sehr wenige Zelllinien zeigten dadurch eingeschränkte Wachstumscharakteristika. Bei diesen wurde das ursprüngliche Kulturmedium beibehalten. Wesentlich anders verhielt es sich mit der Umsetzrate der Zellen. Obwohl hohe Umsetzraten im Hinblick auf eine schnelle Entfernung von Restinokulat wünschenswert gewesen wären, führte die starke Vereinzelung bei der Mehrzahl der Zellen zu einem Absinken der PrP^C-Expression. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der Einfluß bisher unbekannter zellulärer Stressfaktoren durch die es zu einer generell niedrigeren Expression zellulärer Proteine gekommen sein könnte. Um stets eine möglichst hohe PrP^C-Expressionsrate zu gewährleisten, wurden die Zellen im weiteren Verlauf der Untersuchungen gemäß ihren individuellen meist niedrigen Umsetzraten passagiert, auch wenn damit für die Entfernung des restlichen Inokulates ein vergleichsweise längerer Zeitraum notwendig war.

Hinsichtlich der Infektiosität des Inokulates war eine Optimierung schwieriger: Die Faktoren, die zum Infektiositätsgehalt eines Gewebes beitragen, sind noch nicht vollständig geklärt. Angesichts des Fehlens geeigneter Zellkultursysteme für Prion-Erreger aus Wiederkäuern kann die Bestimmung des genauen Infektiositätstiters eines Gewebes bisher ausschließlich im Tierversuch erfolgen. Darauf musste in dieser Arbeit jedoch verzichtet werden, da die hohe Anzahl der für eine Titration benötigten Mäuse nicht im Verhältnis zur erhaltenen Information gestanden hätte und selbst in hochempfindlichen transgenen Tieren, abhängig vom jeweiligen Erreger, einen Zeitraum von bis zu 700 Tagen in Anspruch genommen hätte (BUSCHMANN u. GROSCHUP 2005). Deshalb wurde der PrP^{res}-Gehalt in den Proben alternativ zum Tierversuch als eine Annäherung an den TSE-Erregertiter bestimmt, um möglichst optimale Infektionserfolge zu erhalten. PrP^{res} ist bisher das einzige spezifische Markerprotein der Prionkrankheiten und wird in allen etablierten Tests als diagnostischer Indikator verwendet, darf aber dennoch nicht mit PrP^{Sc} (Infektiosität) gleichgesetzt werden. Es wurde gezeigt, dass große PrP-Aggregate zwar über die höchste PK-Resistenz verfügen, aber kleinere

weniger PK-resistente PrP-Oligomere die höchste Konversionsaktivität besitzen (SILVEIRA et al. 2005). Nach diesen Untersuchungen kommt ein Kompromiss aus weniger PK-stabilen, aber konversionsaktiven Partikeln mit einer molekularen Masse, die äquivalent zu 14 bis 28 PrP-Molekülen ist, am ehesten als infektiöses Agens der TSE-Erkrankungen in Betracht. Des Weiteren wird nach wie vor die Beteiligung von Nukleinsäuren als Bestandteil des Erregers (LASMEZAS et al. 1997, MANUELIDIS 2006) bzw. die Notwendigkeit oder unterstützende Wirkung von einem oder mehreren Kofaktor(en) diskutiert (TELLING et al. 1995, ABID u. SOTO 2006). Die im Zusammenhang mit TSE-Erkrankungen auftretenden amyloiden Aggregate enthalten auch Nicht-Proteinstrukturen, wie beispielsweise Polysaccharide (APPEL et al. 1999), Glukosaminoglykane (WONG et al. 2001) oder Lipide (KLEIN et al. 1998), und auch kleine nicht näher zu identifizierende Moleküle (< 15 kDa) wurden nachgewiesen (SILVEIRA et al. 2005).

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vergleichsstudien wurde beobachtet, dass die Langzeitlagerungen von Homogenaten, wiederholte Tau-Frier-Zyklen und zunehmende Autolyse ebenso wie eine Verdünnung des Inokulums oder die Wahl eines nicht optimalen Lösungspuffers zu einem Absinken des PrP^{res}-Signals und zu einem Rückgang des Infektionserfolges bzw. zu einer verzögerten Akkumulation von neu gebildetem PrP^{res} führten. Beide Beobachtungen basieren jedoch sehr wahrscheinlich nur auf einer Korrelation, nicht aber auf einer Kausalität. Mit einer Verringerung der Endkonzentration des Inokulums werden alle Komponenten und damit auch PrP^{res} verdünnt. Wiederholte Tau-Frier-Zyklen und bereits autolytisches Gewebe begünstigen den Abbau durch Proteinasen. Wie bereits erwähnt, stellt PrP^{res} den unempfindlichsten Teil der Konversionsreaktion dar. Bei einem durch Proteinasen bedingtem Absinken des PrP^{res}-Gehalts wäre nahe liegend, dass auch der Anteil an infektiösem Agens reduziert wird. Die höhere Infektionsrate bei der Verwendung von zuckerhaltigen Puffern könnte darauf zurückzuführen sein, dass die größeren Zuckermoleküle im Vergleich zu den kleineren Salzmolekülen eher in der Lage sind, die Oberfläche von Proteinen zu maskieren und ihre Struktur zu stabilisieren. Darüber hinaus ist aber auch denkbar, dass Saccharose das Anhaften an Kunststoff verringert hat, und durch die höhere Dichte der Lösung könnten höhere Konzentrationen des infektiösen Erregers auf dem Zellrasen zustande gekommen sein. Außerdem ergab die optische Prüfung der Inokulate, dass der Saccharose-Puffer zu einer feineren Verteilung des Homogenates mit geringerer Neigung zur Aggregatbildung führte.

Als Fazit der Vergleichstudien erschien es hinsichtlich eines optimierten Infektionsprotokolls in jedem Fall angebracht, auf ein frisches Gewebehomogenat in sehr gutem Zustand mit – eine effiziente Replikation des Erregers schlussfolgernd – einem möglichst hohen Gehalt an PrP^{res} zu achten. Die Homogenisierung in Saccharose-Puffer war der Verwendung nicht zuckerhaltiger Lösungspuffer vorzuziehen und das Inokulat sollte so wenig wie möglich verdünnt werden.

Die maximale Applikationsdosis des Inokulates war durch die Gewebetoleranz der Zellen und durch die Neigung der Hirnhomogenate zur Aggregation und Verklumpung begrenzt. Auch das könnte bei den Schwierigkeiten, Zelllinien mit Feldisolaten zu infizieren, eine Rolle spielen. Durch das Problem

der Speziesbarriere (die Effizienz der Übertragung von Maus zu Maus ist höher als die Übertragung von Rind bzw. Schaf zu Maus) ist es schwer zu beurteilen, ob der Infektiositätsgehalt in Feldisolaten prinzipiell geringer als in murinen Geweben ist. Denkbar wäre aber, dass ein weniger infektiöses Inokulat zwar in der Lage ist, die Konversionsreaktion und die „Seeding“-Kaskade zu initiieren, dass die Akkumulation dabei aber zu langsam oder zu schwach ist, als dass sich die Infektion in den Zellen manifestieren kann. Um diese Möglichkeit soweit wie möglich zu kompensieren, wurde die Inkubationszeit verlängert und die Zellen ein zweites Mal inokuliert. Somit konnte eine möglicherweise initial schwache Akkumulation noch einmal unterstützt werden. Die Gewebemenge wurde hierbei pro Inokulation zwar nicht erhöht, aber zu einem zweiten Zeitpunkt standen noch einmal neue Infektionserreger zur Verfügung. Damit wurden die Zellen nicht geschädigt, aber dennoch insgesamt mehr infektiöses Material appliziert. Da außerdem nichts darüber bekannt war, inwiefern der initiale Anstoß der Reaktion nicht ein zeitabhängiger, in den verschiedenen Spezies und abhängig vom jeweiligen Erreger variierender Prozess ist, erschien es sinnvoll, die Zellen über einen deutlich längeren Zeitraum mit infektiösem Material zu konfrontieren.

5.2 TSE-Infektionsstudien an eukaryotischen Zelllinien unterschiedlicher Spezies und Gewebe

Die vergleichenden Infektionsstudien mit infizierbaren und resistenten Zelllinien (N2a-Zellen, Hpl3-4-Zellen, Rov-Zellen) zeigten, dass suboptimale Infektionsbedingungen die Akkumulation von PrP^{res} zwar verzögerten, prinzipiell TSE-empfindliche Zelllinien oder Sublinien aber dennoch infizierbar blieben. Als resistent beschriebene Zelllinien konnten dagegen auch unter modifizierten Bedingungen nicht infiziert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass ein optimiertes Infektionsprotokoll die Infektion von Zellen unterstützen und möglicherweise auch eine zu schwache Akkumulation in den detektierbaren Bereich heben kann. Die eigentliche Empfänglichkeit der Zelllinien für Prion-Erreger scheint aber offensichtlich von anderen Faktoren abzuhängen. Ähnlich den Beobachtungen von *in-vivo*-Experimenten wurde auch für die Infektion von Zelllinien eine Abhängigkeit von Erregerstammeigenschaften und Speziesbarrieren beschrieben (SCOTT et al. 1992, PRIOLA u. CHESEBRO 1995, BOSQUE u. PRUSINER 2000). Demzufolge spielen die Aminosäuresequenz, möglicherweise auch das Zelltyp-abhängige Glykosylierungsprofil und die Konformation des endogen exprimierten PrP^C und seine Korrespondenz zum jeweiligen Erreger für die TSE-Empfänglichkeit der Zelllinien, eine entscheidende Rolle. Jedoch lassen sich Tiere wesentlich besser infizieren als Zellkulturen und verschiedene Zellklone bzw. Sublinien einer Zelllinie können empfänglich oder aber auch resistent für eine Infektion sein. Daher müssen darüber hinaus noch weitere zelluläre Faktoren für den Infektionserfolg erforderlich sein, die nur in bestimmten Zellen vorhanden sind. Dabei sind die Konvertierbarkeit des jeweiligen von der Zelllinie exprimierten PrP^C und die Fähigkeit zur Ausbildung einer Persistenz der Zellinfektion offenbar voneinander unabhängig (BIRKETT et al. 2001, VORBERG et al. 2004). So konnte gezeigt werden, dass eine akute PrP^{res}-Bildung bei einer Vielzahl von Zelllinien innerhalb von 24 Stunden zu beobachten ist, die Infektion aber nicht unbedingt in die

Persistenz übergeht (Vorberg et al. 2004). Selbst bei Zelllinien, die über das akute Stadium hinaus PrP^{res} bilden, ist die Infektion oft instabil (BIRKETT et al. 2001).

Ein erster Ansatz dieser Arbeit zur Identifikation neuer, vor allem für Scrapie- und BSE-Feldisolate empfänglicher, Zelllinien basierte deshalb auf den Annahmen, dass erstens die Replikation dieser Erreger in Zellkultur prinzipiell möglich ist und zweitens unter einer Vielzahl von eukaryotischen Zelllinien eine entsprechende Kombination aus den für eine persistente Infektion notwendigen Faktoren gegeben ist.

Von 53 Zelllinien, die wie bereits beschrieben nach ihrer Spezies und ihrem Gewebetyp ausgewählt worden waren, exprimierten 34 Zelllinien PrP^{C} auf einem detektierbaren und weitestgehend stabilen Niveau und wurden deshalb auf ihre Empfänglichkeit für unterschiedliche TSE-Stämme und -Isolate untersucht. Bei der Mehrzahl dieser Zelllinien (30 von 34) wurde unter den gegebenen experimentellen Bedingungen kein neu gebildetes PrP^{res} und damit auch kein Infektionserfolg nachgewiesen. Damit ist allerdings nicht auszuschließen, dass zumindest einige dieser Zelllinien nicht doch für andere als die hier verwendeten Prion-Stämme empfänglich sind oder dass höhere Erreger-Expositionen (Erregerdichte, Inokulationszeit) als die hier verwendeten für eine erfolgreiche Infektion benötigt werden. Ferner ist eine transiente Infektion für eine Reihe von Zelllinien denkbar, bei denen der Abbau von PrP^{res} die Akkumulation bereits kurz nach der Infektion überwogen hat oder bei denen zwar eine Umfaltung stattgefunden hat, aber keine Ausbreitung des Erregers innerhalb der Kultur (VORBERG et al. 2004).

In zwei mit BSE-Material inokulierten Zelllinien war bis zur 10. Passage nach der Inokulation (MGbov900) bzw. bis zur 32. Passage nach der Inokulation (Bov11) PrP^{res} nachweisbar. Da zu diesen Passagezeitpunkten das Vorhandensein von Restinokulat bereits vollständig ausgeschlossen werden kann (s. Kap. 3.2.3.3), ist davon auszugehen, dass es sich bei den positiven Signalen um neu akkumuliertes PrP^{res} gehandelt haben muss und die Zelllinien zumindest vorübergehend mit BSE infiziert waren. Dem Verlust des Infektionsstatus mag ein Wachstumsnachteil der BSE-infizierten Zellen gegenüber den nicht-infizierten Zellen oder eine Veränderung zellulärer Faktoren zu Grunde gelegen haben. Beide Zelllinien waren zu diesem Zeitpunkt noch im Stadium der Etablierung. Der Infektionsverlust erfolgte bei den MGbov900-Zellen bereits wenige Passagen nach der Infektion, bei den Bov11-Zellen dagegen erst spät. Da es sich bei letzteren um in die Seneszenz kommende Zellen handelt, kann der Infektionsverlust auch mit dem natürlichen Ende der Zellen in Zusammenhang gestanden haben. Beide Infektionserfolge sind der Nachweis, dass es prinzipiell möglich ist, Zellkulturen mit BSE zu infizieren. Die Wiederholung dieser Infektionen war aber aus bisher unbekannten Gründen nicht erfolgreich, daher kann über eine unterschiedliche Verteilung von

Infektiosität in Inokulaten, eine doch ineffiziente Erreger-Wirt-Interaktion oder mögliche Variationen im zellulären Hintergrund nur spekuliert werden.

Eine bovine Zelllinie (Bov5) konnte schließlich mit einem ovinen Scrapie-Feldisolat infiziert werden. Diese Infektion war mehrfach wiederholbar und stabil. Die anfänglich sehr geringe PrP^{res}-Akkumulation stieg mit der Zeit zu einem weitgehend gleichbleibenden starken Signal an, das auch nach über 100 Passagen (in Sublinien nach über 200 Passagen) noch immer detektiert werden konnte. Die geringen Schwankungsbreiten dieses Signals zeigten, dass zwar prinzipielle Variationen im zellulären Milieu, aber keine Veränderungen bei kritischen zellulären Faktoren stattfanden. Möglicherweise war es nach der Inokulation zunächst nur zu einem langsamen Anstieg der Prion-Erreger innerhalb weniger infizierter Zellen gekommen. Dieser initiale Prozess könnte dann mit mehr Effizienz durch das der Seeding-Kaskade eigene Schneeballprinzip (s. Kap. 2.1.5) auf ein detektierbares PrP^{res}-Niveau gesteigert worden sein und schließlich könnten sich die Prion-Erreger von Zelle zu Zelle ausgebreitet haben und/oder durch Zellteilung weitergegeben worden sein. Die im Verlauf des Infektionsprozesses auftretende Stabilität des PrP^{res}-Signals deutet darauf hin, dass die Akkumulation eine Plateauphase (JARRETT u. LANSBURY 1993, EIDEN et al. 2006) erreicht hatte, in der alle empfänglichen Zellen der Kultur infiziert worden waren und sich die Wachstums- bzw. Teilungsrate mit der Umsetzrate im Gleichgewicht befand.

Ähnlich wie bei anderen TSE-infizierten Zelllinien (BOSQUE u. PRUSINER 2000, KLOEHN et al. 2003) war allerdings auch in den Bov5Sc-Zellen („Sc“ für Scrapie-infiziert) nicht die ganze Zellpopulation, sondern nur ein Teil der Zellen infiziert. Das ließ auf die Existenz von empfänglichen und nicht empfänglichen Zellen in dieser Zelllinie schließen. Durch die wiederholte Selektion PrP^{res}-positiver Zellklone wurden hoch-infizierte Sublinien erhalten. Auch diese waren aber trotz der Klonierung von Einzelzellen nie eine in ihrer Gesamtheit infizierte Kultur. Dies ist ein bisher ungeklärtes, aber bei allen TSE-infizierten Zelllinien zu beobachtendes Phänomen (SOLASSOL et al. 2003).

Unerwartet war das Erregerspektrum oder vielmehr die Erregerspezifität der Bov5-Zelllinie. Obwohl das Rind den Hauptwirt für BSE darstellt und bei der Scrapie-Infektion von Rindern zumindest eine Speziesbarriere überwunden werden muss, waren diese Rinderzellen mit Scrapie, nicht aber mit BSE infizierbar und selbst diese Scrapie-Empfänglichkeit bestand nur für zwei (S71/04 und S95/04) von insgesamt 27 getesteten Isolaten. Wieder stellt sich die Frage, welche Faktoren die Empfänglichkeit der Zelllinie für TSE bzw. für einen bestimmten TSE-Erreger bestimmten. Rind und Schaf variieren nur in wenigen Aminosäuren (2,7 %, WOPFNER et al. 1999). Beim Schaf können aber verschiedene Genotypenvarianten unterschieden werden. Die beiden erfolgreich inokulierten Scrapie-Isolate entsprachen dem Genotyp ARQ/ARQ und damit der Aminosäuresequenz der Rinderzellen an den korrespondierenden Bereichen. Allerdings entsprachen auch 17 weitere nicht erfolgreich applizierte Scrapie-Isolate diesem Genotyp. Des Weiteren war das nicht erfolgreich applizierte BSE-Isolat auf der

Ebene der Aminosäuren mit der Bov5-Zelllinie sogar identisch. Da die PrP^C-PrP^{Sc}-Interaktion wohl auch erheblich durch die wahrscheinlich erregerstammbedingt unterschiedlichen PrP^{Sc}-Konformationen moduliert wird, lassen die hier erhaltenen Ergebnisse vermuten, dass die meisten der Scrapie-Isolate nicht zu dem von den Zellen exprimierten PrP^C gepasst haben, also eine andere Konformation/Stammeigenschaft besaßen. Auch die Tatsache, dass 14 Isolate aus dem gleichen Scrapie-Ausbruch stammten, spricht nicht gegen die Annahme unterschiedlicher Scrapie-Erreger, da gezeigt wurde, dass selbst in einem erkrankten Tier mehrere Erregersämme vorliegen können (BRUCE u. DICKINSON 1979, FRASER 1983). Dementsprechend ist nicht auszuschließen, dass auch an diesem Scrapie-Ausbruch mindestens zwei verschiedene Erreger beteiligt waren: einem auf Bov5-Zellen anzüchtbaren und einem auf diesen Zellen nicht kultivierbaren Scrapie-Erregersamm. Eine Abhängigkeit der Scrapie-Empfänglichkeit vom Erregersamm erklärt aber nicht, warum das BSE-Inokulat nicht zu einer Infektion führte. Folgt man der Hypothese, dass die eigentliche Konversion und der Erhalt der Infektion bzw. die Ausbreitung in der Kultur von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst werden, dann ist es aber durchaus denkbar, dass das PrP^C in den Bov5-Zellen zwar vom BSE-Erreger konvertiert wurde, es aus bisher unbekannten Gründen aber nicht zur Manifestation der Infektion in den Zellen kam. Solange nicht weitere, die Empfänglichkeit einer Zelllinie bestimmende Faktoren bekannt sind, muss die Behandlung der Erregerspezifität von Zelllinien wohl deskriptiv bleiben.

Zur Charakterisierung des Scrapie-Erregers in den infizierten Bov5Sc-Zellen, wurde das elektrophoretische Laufverhalten und die Antikörperbindung von PrP^{res} aus den Bov5Sc-Zellen mit dem PrP^{res} aus bovinen BSE-, ovinen Scrapie- und murinen RML-Hirnhomogenaten verglichen. Das PrP^{res} aus den bovinen Zellen wurde von allen vier Antikörpern, einschließlich des P4-Antikörpers erkannt. Das bedeutet, dass die PK-Schnittstelle wie bei Scrapie weiter N-terminal als bei BSE liegt. Das von den Zellen exprimierte PrP^{res} entspricht in diesem Punkt also dem Charakteristikum des ursprünglichen Scrapie-Erregers. Das höhere Molekulargewicht des PrP^{res} der Zellproben konnte durch Deglykosylierungsversuche weitestgehend auf eine zellspezifische Glykosylierung zurückgeführt werden. Hinsichtlich des Glykosylierungsmusters ist bei PrP^{res} immer eine antikörperabhängige Variabilität zu beachten. Für die Charakterisierung von BSE und Scrapie ist dahingehend der L42-Antikörper etabliert (GRETZSCHEL et al. 2005). Die Detektion mit L42 zeigte bei den Bov5Sc-Zellen ein leicht zu Gunsten der einfach-glykosylierten Bande verschobenes Verhältnis (unglykosyliert: 23,1 %; einfach-glykosyliert: 45,1 %; zweifach-glykosyliert: 31,8 %), während bei den Scrapie- und BSE-Feldisolaten ein typisches – bei Scrapie leicht, bei BSE deutlich – zu Gunsten der zweifach-glykosylierten Bande verschobenes Verhältnis vorlag. Dies lässt darauf schließen, dass bei der Infektion der Zellen eine Adaptation des Scrapie-Erregers an die bovinen Zellen stattgefunden hat, die eine Veränderung des erregerspezifischen Glykoprofils einschließt.

Ebenso wie die PK-Spaltstelle ist die generelle Stabilität gegenüber Proteinasen ein charakteristisches Merkmal für verschiedene Scrapie-Stämme und gibt einen Hinweis auf die strukturelle Stabilität von

PrP^{res} (KUCZIUS u. GROSCHUP 1999). Um die PK-Resistenz des in den Bov5Sc-Zellen gebildeten PrP^{res} zu untersuchen, wurden die Zellen mit zwei murinen, RML-infizierten Zelllinien (ScN₂a und SMBRC040) in PK-Konzentrations- und PK-Zeitreihen verglichen. Dabei wiesen alle drei Linien ähnliche Eigenschaften hinsichtlich der Stabilität des PrP^{res} auf, die bovinen Zellen zeigten sogar eine minimal höhere Stabilität.

Deutliche Unterschiede zeigten sich dagegen im Bezug auf die Reaktionszeit dieser drei Zelllinien gegenüber verschiedenen PrP^{res}-inhibierenden Substanzen (Suramin, Pentosansulphat und Imatinib). Die Wirkung dieser PrP^{res}-Inhibitoren beruht in murinen Zellen darauf, dass PrP^C nicht mehr auf der Zelloberfläche präsentiert wird (Suramin (GILCH et al. 2001)), die Akkumulation von PrP^{res} durch eine kompetitive Hemmung endogener Aminoglykane verhindert wird (Pentosansulphat (CAUGHEY u. RAYMOND 1993)) oder die lysosomale Degradation von PrP^{res} gefördert wird (Imatinib (ERTMER et al. 2004)). Dabei wurden zwischen verschiedenen murinen Zelllinien geringgradige Unterschiede in ihrer Sensitivität für die jeweiligen Inhibitoren festgestellt (BIRKETT et al. 2001, ERTMER et al. 2004). Auch bei der bovinen Bov5-Zelllinie zeigte sich der Inhibitionseffekt dieser Substanzen. Im Vergleich zu den murinen Zellen war deren Reaktionszeit jedoch deutlich verlängert. Da dieses Phänomen wahrscheinlich darauf zurückzuführen war, dass sich in verschiedenen eukaryotischen Zellen die Kinetik von Substanzen, die zellulären Pfade bzw. die Proteinausstattung voneinander unterscheiden (BIRKETT et al. 2001, ERTMER et al. 2004), betont es die Bedeutung unterschiedlicher, nicht muriner und für TSE-Feldisolate empfänglicher Zelllinien. Dabei mag spekuliert werden, ob diese Beobachtung vergleichbare Umstände im Tier repräsentiert.

Neben dem gewünschten Rückgang von PrP^{res} kam es nach der Applikation dieser inhibitorischen Substanzen auch zu einer Inhibition der PrP^C-Bildung, die sich allerdings nicht durch den bisher bekannten Wirkmechanismus der Substanzen erklären lässt. Dieser Inhibitionseffekt auf die PrP^C-Expression war nicht spezifisch für die Bov5-Zelllinie, sondern wurde bei einer Langzeit-Anwendung der Substanzen auch bei den murinen Zelllinien ScN₂a und SMBRC040 beobachtet. Die Inhibition der PrP^C-Bildung war reversibel. Nach einer individuell für die jeweilige Zelllinie und die jeweilige Substanz unterschiedlichen Zeit der substanzfreien Kultivierung erreichte die PrP^C-Expression der Zellen wieder das initiale Niveau. PrP^{res} wurde dagegen selbst nach längerer Passagierung der Zellen nicht wieder detektiert. Die Bov5-Zellen konnten anschließend erneut mit ovinem Scrapie-Material infiziert werden, dass heißt sie hatten, wie bereits für murine Zellen (BIRKETT et al. 2001) beschrieben, nichts von ihrer TSE-Empfänglichkeit verloren.

Die Infektiosität der PrP^{res}-positiven Bov5Sc-Zellen wurde im Tierversuch bestätigt. Hierzu wurden drei verschiedene Mauslinien verwendet: a) transgen bovines PrP-überexprimierende Mäuse (TgbovXV), b) transgen ovines PrP-überexprimierende Mäuse (TgshpIX) und c) C57BL/6-Wildtypmäuse. Für alle drei Gruppen war bekannt, dass sie mit BSE und Scrapie infizierbar waren. Bedingt durch die exprimierten Transgene bzw. abhängig von den speziellen TSE-Isolaten wurden allerdings erhebliche Unterschiede in den jeweiligen Inkubationszeiten beschrieben (EKLUND et al.

1967, FRASER u. DICKINSON 1973, MIDDLETON u. BARLOW 1993, BUSCHMANN et al. 2000, KUPFER et al. 2007).

Vergleichbare Unterschiede traten auch nach der Inokulation der Mäuse mit den infizierten Bov5Sc-Zellen auf. Die Homologie der PrP-Aminosäuresequenzen in den Bov5Sc-Zellen und in den TgbovXV-Mäusen führte dazu, dass die TgbovXV-Mäuse zuerst erkrankten (206 bis 288 Tage nach der Inokulation). Aufgrund der, wenn auch vergleichsweise niedrigen, Speziesbarriere zwischen Rind und Schaf zeigten die TgshpIX-Mäuse erst 398 bis 465 Tage nach der Inokulation klinische Symptome, gefolgt von den nicht-transgenen C57BL/6-Mäusen (erste erkrankte Maus 472 Tage nach der Inokulation). Mit dem PrP^{res}-Nachweis in den Gehirnen von vier TgbovXV- und zwei TgshpIX-Mäusen im Western-Blot wurde gezeigt, dass die infizierten Bov5Sc-Zellen nicht nur PrP^{res} bilden, sondern auch Infektiosität enthalten. Ein Nachweis PrP^{res}-positiver Signale in den C57BL/6-Mäusen stand aufgrund der langen Inkubationszeiten in den murines PrP^C-exprimierenden Wildtyp-Mäusen zum Zeitpunkt der Abfassung dieser Dissertation noch aus. Die Detektion PrP^{res}-positiver und PrP^{res}-negativer Tiere war dabei nicht überraschend. Da Zellsuspensionen in der Regel deutlich weniger PrP^{res} enthalten als Hirnhomogenate, dürfte der Infektiositätstiter der in die Mäuse applizierten Zellsuspension vergleichsweise niedrig gewesen sein. Möglicherweise war das in den negativ befundenen Mäusen akkumulierte PrP^{res} noch unter dem detektierbaren Niveau.

Warum Mäuse ohne eine deutlich detektierbare Akkumulation von PrP^{res} im Gehirn dennoch Klinik zeigen und versterben, ist ein bis heute ungeklärtes Phänomen, wurde aber schon wiederholt beschrieben (COLLINGE et al. 1995, LASMEZAS et al. 1997, MANUELIDIS et al. 1997). Denkbar wäre, dass es zwar noch nicht zur Ausbildung der besonders PK-stabilen Aggregate, dafür aber schon zur Umfaltung von PrP^C gekommen war. Da die Symptomatik der Prionkrankheiten weniger den großen Aggregaten und Plaques, als vielmehr einem Funktionsverlust von PrP^C bzw. auch dessen Funktionsumkehr in eine toxische Aktivität zugeschrieben wird (WESTERGARD et al. 2007), wäre die klinische Symptomatik der Mäuse auch ohne die Detektion von PrP^{res} denkbar. Dass diese Tiere infiziert waren, zeigte die erneute, wenn auch nur transiente, Infektion von Bov5-Zellen mit sowohl PrP^{res}-positivem als auch PrP^{res}-negativem Hirngewebe aus den Bov5Sc-inokulierten TgbovXV-Mäusen. Vergleichbare Phänomene sind bei Übertragungsversuchen mit BSE an Mäusen beschrieben worden (LASMEZAS et al. 1997).

5.3 TSE-Infektionsstudien an transgenen, das Prion-Protein verschiedener Spezies überexprimierenden Zelllinien

Offenbar spielen für eine erfolgreiche Infektion auch bisher noch unbekannte zelluläre Faktoren eine wesentliche Rolle. Allerdings scheinen diese nur in bestimmten Zellen, jedoch nicht in der Mehrzahl der etablierten Zelllinien, vorhanden zu sein. Infektionsstudien an Rov-Zellen (VILETTE et al. 2001) und Hpl3-4Mo3F4PrP-Zellen (MAAS et al. 2007) haben jedoch gezeigt, dass es durch die Herstellung transgener Zelllinien möglich ist, die verschiedenen an der Infektion beteiligten Komponenten (PrP^C,

PrP^{Sc} und zellulärer Hintergrund) erfolgreich miteinander zu kombinieren. Die Kaninchen-Nieren-Epithelzelllinie RK13 und die PrP-defiziente Zelllinie Hpl3-4 (aus dem Hypocampus einer PrP-Knock out-Maus) bildeten den zellulären Hintergrund für die Rov-Zellen bzw. die Hpl3-4Mo3F4PrP-Zellen. Diese Zellen sind gemäß den publizierten Arbeiten in der Lage, eine TSE-Infektion mit einem ovinen Scrapie-Isolat bzw. dem mausadaptierten Scrapie-Stamm 22L zu unterstützen, sofern sie das transgene Prion-Protein vom Schaf (Rov-Zellen) bzw. von der Maus (Hpl3-4-Zellen) exprimierten.

Dem Beispiel der transgenen Rov-Zellen und Hpl3-4Mo3F4PrP-Zellen folgend wurden deshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit parallel zu den Infektionsstudien mit den nicht-transgenen Zelllinien weitere transgene Zelllinien hergestellt und mit verschiedenen TSE-Stämmen bzw. -Isolaten inokuliert. Diese transgenen RK13- und Hpl3-4-Zelllinien exprimierten Prion-Proteine von Nerz, Hund, Schaf oder Maus sowie zwei chimäre Prion-Proteine aus Maus/Schaf/Maus- und Maus/Rind/Maus-Anteilen. In diesen Infektionsversuchen wurde jedoch festgestellt, dass auch auf der Grundlage eines prinzipiell zur PrP^{Sc}-Replikation befähigten zellulären Hintergrundes die Expression bzw. Überexpression eines heterologen PrP^C-Konstruktes nicht zwangsläufig zum Infektionserfolg führt. Das in den Zellen exprimierte PrP^C der verschiedenen Spezies ist *in vivo* zwar durch bestimmte TSE-Erreger konvertierbar (z. B. bovines PrP^C durch BSE, ovines PrP^C durch Scrapie, murines PrP^C durch RML), in den Zellinfektionsexperimenten war allerdings die Mehrzahl der transgenen Zelllinien nicht empfänglich für eine TSE-Infektion und insbesondere nicht für eine Infektion mit TSE-Feldisolaten. Die Ergebnisse der Infektionsversuche mit dem mauspassagierten Scrapie-Stamm RML illustrieren diese Effekte. Während die Inokulation von RK13Mushp-Zellen mit RML zu einer Infektion dieser Zellen führte, waren Hpl3-4Mushp-Zellen, die das gleiche chimäre Protein exprimierten, gegen eine Infektion mit RML resistent. Für sich betrachtet kann hier davon ausgegangen werden, dass das Mushp-PrP^C-Konstrukt vom RML-Stamm umgefaltet werden konnte. Des Weiteren unterstützten die zellulären Faktoren der RK13-Zelllinie offensichtlich auch eine persistente Infektion, während die zellulären Faktoren der Hpl3-4-Zelllinie dagegen für eine Infektion mit RML ungeeignet zu sein schienen. Allerdings konnten murines Prion-Protein exprimierende Hpl3-4Mu-Zellen wiederum erfolgreich mit RML infiziert werden. Demzufolge war also auch das zelluläre Repertoire der Hpl3-4-Zelllinie prinzipiell geeignet, eine Infektion mit RML zu unterstützen. Auch in den Hpl3-4Mu-Zellen war diese TSE-Empfänglichkeit jedoch nicht universell, sondern stammspezifisch. Gegen eine Infektion mit dem mausadaptierten Scrapie-Stamm ME7 erwiesen sich die Zellen resistent.

Diese Daten zeigten, dass das murine PrP-Konstrukt und das chimäre Konstrukt (Mushp) ebenso wie die RK13-Zelllinie und die Hpl3-4-Zelllinie im Hinblick auf eine Infektion prinzipiell zu RML passen. Außerdem verfügte das verwendete Inokulat über einen genügend hohen Erregergehalt, um eine Zelllinie infizieren zu können. Offensichtlich waren aber weder die Beschaffenheit des PrP^C noch der zelluläre Hintergrund allein, sondern die Kombination dieser beiden Parameter für die Empfänglichkeit der Zelllinie für einen spezifischen Erregerstamm verantwortlich.

Möglicherweise ist diese Kombination entscheidend für den Konversionsprozess selbst, bspw. durch die gemeinsame Ausbildung einer räumlichen Struktur, die dem Schlüssel-Schloss-Prinzip folgend nur mit bestimmten TSE-Erregern korrespondiert. Denkbar ist auch ein indirekter, die Struktur von PrP^C bestimmender Einfluss zellulärer Faktoren, bspw. durch die Determinierung des Glykoprofils. Ebenfalls möglich ist, dass die eigentliche Konversionsreaktion vom zellulären Hintergrund unabhängig stattfindet, zelluläre Faktoren jedoch die Akkumulation des Konversionsproduktes bestimmen. Diese Einflussnahme kann sowohl in der Anwesenheit als auch in der Abwesenheit zellulärer Faktoren bestehen, bspw. durch eine stabilisierende oder destabilisierende Wirkung auf unterschiedlich stabile Konversionsprodukte.

5.4 Was kann aus dieser Arbeit geschlossen werden?

Durch die Optimierung von Kulturbedingungen und Infektionsprotokollen kann eine gegenüber Prion-Erregern resistente Zelllinie nicht in eine empfängliche Zelllinie verwandelt werden. Nichtsdestotrotz können optimierte Bedingungen dazu führen, eine schwache Empfänglichkeit über einen kritischen Grenzwert zu heben und so einen Infektionserfolg zu erreichen. Die vielfachen nicht erfolgreichen Infektionsversuche mit den verschiedensten eukaryotischen und auch transgenen Zelllinien und den unterschiedlichen TSE-Stämmen und -Isolaten deuten darauf hin, dass für eine Zellinfektion weitere zelluläre Komponenten eine Rolle spielen und dass nur die richtige Kombination aus dem von der Zelle exprimierten PrP^C, dem zellulären Hintergrund und dem jeweiligen TSE-Erregerstamm zu einer persistenten Infektion der Zellen führt. Ob die zellulären Komponenten den Konversionsprozess selbst oder nur die effiziente Akkumulation des PrP^{Sc} beeinflussen, ist aber noch nicht endgültig geklärt. Es ist nicht ausgeschlossen, dass ein Teil der in den Infektionsstudien scheinbar resistenten Zelllinien nicht doch infiziert war, diese Infektion aber aufgrund eines überwiegenden Abbaus, einer nicht erfolgreichen Erregerausbreitung oder infolge einer gesteigerten bzw. verminderten Expression bestimmter essentieller zellulärer Faktoren wieder verloren hat.

Durch die Infektion der Rinderzelllinie Bov5 ist es erstmalig gelungen, eine nicht transgene Zelllinie mit einem natürlichen TSE-Feldisolat zu infizieren. Die Vorteile der bisher existierenden murinen TSE-Zellkultursysteme (kurze Generationszyklen innerhalb eines „*in-vivo*“-Systems, ethische und finanzielle Gesichtspunkte) sind hinreichend bekannt. Weitere Studien mit empfänglichen bzw. infizierten bovinen Zelllinien versprechen darüber hinaus einen genaueren Einblick in die tatsächlichen Abläufe der TSE-Infektion beim Wiederkäuer. Die Bov5Sc-Zellen werden folglich nicht nur einem besseren Verständnis der Zellempfänglichkeit für TSE und der, einer Infektion zugrunde liegenden, molekularen Mechanismen dienen, sondern könnten auch in der therapeutischen und, allerdings nur in Kombination mit weiteren TSE-empfindlichen Zelllinien, der diagnostischen Forschung von Nutzen sein.

6 Zusammenfassung

Anja Maria Oelschlegel

Untersuchung von Zelllinien unterschiedlicher eukaryotischer Spezies auf ihre Infizierbarkeit mit verschiedenen TSE-Stämmen und -Isolaten

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig und Institut für Neue und Neuartige Tierseuchenerreger, Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesinstitut für Tiergesundheit, Standort Insel Riems

Eingereicht im Juni 2007

92 Seiten, 22 Abbildungen, 16 Tabellen, 303 Literaturangaben

Schlüsselworte: Prion-Protein, Zelllinien, TSE-Empfänglichkeit

Scrapie und die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) sind stets tödlich verlaufende transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) bei kleinen Wiederkäuern und Rindern. Nach der „Prion-Theorie“ ist die pathologische Isoform eines zellulären Proteins, des Prion-Proteins, der Hauptbestandteil, wenn nicht sogar die einzige Komponente der TSE-Erreger. Gemäß dieser Theorie lagert sich die pathologische Isoform, PrP^{Sc}, an die zelluläre Form, PrP^C, an und führt so zu einer Konformationsänderung von PrP^C. Bisher lassen sich TSE-Erreger nur im Tierversuch sowie in wenigen überwiegend von Nagetieren stammenden Zelllinien vermehren. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Identifikation und Charakterisierung neuer TSE-empfindlicher Zelllinien, wobei vor allem die Infektion oviner und boviner Zelllinien mit Scrapie- bzw. BSE-Feldisolaten im Vordergrund stand. Hierzu wurde zunächst der Einfluss unterschiedlicher Kultur- und Infektionsbedingungen (Nährmedien, Umsetzraten, Temperatur, Herstellung der Inokulate, Inokulationsprotokoll) auf den Infektionserfolg studiert. Basierend auf den dabei gewonnenen Daten wurde ein Infektionsprotokoll erstellt, das im weiteren Verlauf für alle in dieser Studie untersuchten Zelllinien verwendet wurde.

Durch die Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts stand eine Vielzahl unterschiedlicher eukaryotischer Zelllinien zur Verfügung, von denen 53 aus geeigneten Organen und Geweben und größtenteils vom Wiederkäuer stammende Zelllinien ausgewählt wurden. Anschließend wurden diese Zelllinien kultiviert und wiederholt hinsichtlich ihrer PrP^C-Expression analysiert. Dabei zeigte sich, dass das PrP^C-Expressionsniveau für jede Zelllinie sehr individuell und weder spezies- noch gewebe-spezifisch ist. 34 der 53 Zelllinien exprimierten PrP^C in detektierbarer Menge und wurden in den weiteren Infektionsstudien verwendet. Dabei wurden sie mit verschiedenen TSE-Stämmen bzw. -Isolaten (bovines BSE-Material, ovines und caprines Scrapie-Material, mausadaptierte BSE- und Scrapie-Stämme) inokuliert. Der Großteil dieser Zelllinien (30 von 34) zeigte sich gegen alle eingesetzten Prion-Erreger resistent. Zwei Zelllinien konnten transient für 10 (MGbov900) bzw. 32 (Bov11) Passagen mit bovinem BSE-Material infiziert werden. Damit war die prinzipielle Möglichkeit einer BSE-Infektion dieser Zellen gezeigt. Aus bisher ungeklärten Gründen wurde die Prion-Infektion

jedoch von beiden Zelllinien wieder verloren und erneute Infektionsversuche blieben erfolglos. Zwei weitere Zelllinien konnten persistent infiziert werden. Die Zelllinie N₂a229, eine Sublinie der in der Prion-Forschung weit verbreiteten Neuroblastomzelllinie N₂a, war für den mauspassagierten Scrapie-Stamm RML empfänglich. Des Weiteren wurde eine bovine Zelllinie (Bov5; 154PES) identifiziert, die für zwei ovine Scrapie-Feldisolate empfänglich war. Es handelt sich dabei um die erste nicht transgene Zelllinie, die mit einem Scrapie-Feldisolat infiziert werden konnte. Die beiden verwendeten Isolate (S71/04 und S95/04) stammten von Schafen aus einem klassischen Scrapie-Ausbruch aus dem Jahr 2004. In den infizierten Bov5Sc-Zellen steigerte sich die initial schwache PrP^{Sc}-Akkumulation über mehrere Passagen zu einem starken Signal, das durch verschiedene Prion-spezifische Antikörper im Dot-Blot, im Western-Blot und mit dem „Zell-ELISA“ nachgewiesen werden konnte. Die Infektion ist bereits seit über 200 Passagen stabil. Sie war mit den besagten Scrapie-Isolaten mehrfach wiederholbar und durch die Selektion von infizierten Einzelzellen konnten hochpositive Sublinien erhalten werden. Infizierte Bov5Sc-Zellen führten nach Inokulation in transgene Rinder- oder Schaf-PrP^C überexprimierende Mäuse zu Scrapie-Erkrankungen und der Bildung von PrP^{Sc} im Gehirn der Mäuse. Die Infektion von Rinderzellen mit einem ovinen TSE-Isolat bedeutete die Überwindung einer Speziesbarriere. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Adaptation des Erregers an die Zellen stattgefunden hatte, welche sich z. B. in einem veränderten Glykosylierungsprofil darstellt. Verglichen mit zwei murinen TSE-infizierten Zelllinien zeigten die Bov5Sc-Zellen ähnliche Eigenschaften hinsichtlich ihrer Proteinase K-Resistenz, aber eine deutlich verlängerte Reaktionszeit gegenüber PrP^{Sc}-inhibierenden Substanzen.

Neben den Infektionsstudien an den „Zellbank-Zelllinien“ wurden transgene Zelllinien hergestellt, die auf der Basis von RK13-Zellen (Nierenzellen aus dem Kaninchen) und Hpl3-4-Zellen (neuronale Zelle aus PrP-defizienten-Mäusen) das PrP^C von Maus, Schaf, Nerz, Hund sowie zwei chimären Konstrukten aus Maus/Rind/Maus bzw. Maus/Schaf/Maus exprimierten. Ein Großteil dieser transgenen Zelllinien war gegenüber einer Infektion und insbesondere einer Infektion mit TSE-Feldisolaten resistent. Durch Infektionsstudien mit dem mausadaptierten murinen Scrapie-Stamm RML konnten jedoch interessante Einblicke in die Hintergründe der zellulären TSE-Empfänglichkeit gewonnen werden. So zeigte sich, dass die Expression eines chimären PrP-Konstruktes aus Maus und Schaf (Mushp) nur in RK13-Zellen, nicht aber in Hpl3-4-Zellen zu einer für den Scrapie-Stamm RML empfänglichen Zelllinie führte. Dagegen konnten murines PrP^C exprimierende Hpl3-4-Zellen erfolgreich mit RML, nicht aber mit dem Stamm Me7 infiziert werden. Diese Versuche unterstützen die Annahme, dass für eine Zellinfektion weitere zelluläre Komponenten eine Rolle spielen und zeigen, dass nur die richtige Kombination aus exprimiertem PrP^C und zellulärem Hintergrund die Empfänglichkeit einer Zelllinie für einen speziellen TSE-Erreger bestimmen kann.

Weitere Studien mit empfänglichen bzw. infizierten bovinen Zelllinien werden zu einem besseren Verständnis der zellulären Pathogenese bei BSE und Scrapie führen, woraus sich möglicherweise auch ein therapeutischer und diagnostischer Nutzen ziehen lässt.

7 Summary

Anja Maria Oelschlegel

Examination of cell lines from various eukaryotic species concerning their susceptibility to different TSE-strains and -isolates

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig and Institute for Novel and Emerging Infectious Diseases, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Island of Riems

Submitted in June 2007

92 pages, 22 figures, 16 tables, 303 references

Keywords: Prion Protein, cell lines, susceptibility

Scrapie and the Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) are always fatal transmissible spongiform encephalopathies that affect small ruminants and cattle. According to the “prion hypothesis” a pathological isoform (PrP^{Sc}) of the cellular prion-protein (PrP^{C}) is the major if not the only component of the infectious agent and the attachment of PrP^{Sc} to PrP^{C} initiates a conformational change of the latter into the pathological form. Until today TSE agents can only be replicated by animal experiments and in a few, predominantly rodent derived, cell lines. Therefore, the aim of this study was to identify and to characterize new cell lines that are susceptible to a TSE infection and primarily to an infection with BSE or Scrapie field isolates. For this purpose, it was initially analyzed to what extent a successful infection is determined by the application of certain experimental parameters (cell culture conditions, preparation of the inocula, inoculation protocol). Based on this data, a general infection protocol was established and was subsequently used for all cell lines during the infection studies.

A multitude of different eukaryotic cell lines were available at the cell depository of the Friedrich-Loeffler-Institut. Out of these, 53 cell lines mainly of ruminant origin were selected, that were derived from suitable PrP-expressing organs and tissues. These selected cell lines were cultured and repeatedly analyzed regarding their PrP^{C} -expression. It became obvious that the expression level of PrP^{C} is quite individual for each cell line and is neither species specific nor tissue dependent. Out of 53 cell lines, 34 expressed detectable levels of PrP^{C} and were selected for inoculation experiments. In the course of these experiments they were inoculated with different TSE-strains and -isolates (bovine BSE material, ovine und caprine scrapie material, mouse adapted BSE and mouse adapted scrapie strains). The majority of the inoculated cell lines (30 out of 34) did not show any susceptibility to the applied inocula. Two cell lines propagated BSE prions for up to 10 (MGbov900) and 32 (Bov11) passages. This infection success demonstrated the general possibility to infect these cell lines with BSE. However, for unknown reasons the prion infection was lost in both cell lines and a repetition of the infection was unsuccessful. Two further cell lines could be persistently infected. N₂a229 cells – a sub-line of the murine neuroblastoma cell line N₂a, which is widely used in TSE research – were found to be susceptible to the mouse adapted scrapie strain RML. Furthermore a bovine cell line (Bov5;

154PES) was successfully infected with two ovine scrapie field isolates. Notably, the bovine cell line is the first non transgenic cell line that could be infected with a scrapie field isolate. The two ovine inocula (S71/04, S95/04) that were used for the infection emanated from an outbreak of classical scrapie in 2004. In the infected Bov5Sc cells, an initial rather weak accumulation of PrP^{res} increased over several passages to a strong signal that could be detected by different prion specific antibodies in dot-blot, western-blot and with the “Cell-ELISA”. The infection is stable since more than 200 passages and could be repeated several times. A selection of infected single cells produced highly positive sub-clones. The inoculation of infected Bov5Sc cells into mice expressing bovine and ovine PrP^C induced clinical signs of scrapie and an accumulation of PrP^{Sc} in the brains of these mice. The infection of a bovine cell line with an ovine TSE-isolate represented the succumbing of a species barrier and further analysis revealed an adaptation of the agent to the cells, as demonstrated for example by an altered glycosylation profile. The comparison of Bov5Sc cells with two murine TSE-infected cell lines revealed similar features concerning their resistance to PK, but a heavily prolonged reaction time to PrP^{Sc} inhibiting substances. Besides the infection studies with the „cell depository cell lines“, transgenic cell lines were established which express the PrP^C of mice, sheep, mink, dog as well as two chimeric constructs of mice/cattle/mice and mice/sheep/mice on the basis of RK13 (rabbit kidney cells) and Hpl3-4 cells (neural PrP deficient cells). The majority of the cell lines proved to be resistant to an infection with TSE and especially to an infection with TSE field isolates. However, infection studies with the mouse adapted scrapie strain RML provided interesting insights into the backgrounds of the cellular TSE susceptibility. The expression of the chimeric PrP-construct of mouse and sheep (Mushp) resulted only in RK13 cells, but not in Hpl3-4 cells in a cell line which was susceptible to an infection with the mouse adapted scrapie strain RML. In contrast, Hpl3-4 cells that expressed murine PrP^C were successfully infected with the RML strain but were resistant to the mouse adapted scrapie strain ME7. These experiments supported the presumption that additional cellular components must be important for a successful cell infection and showed that only the correct combination of expressed PrP^C and cellular background can result in the susceptibility of a cell line to a specific TSE-agent.

Further studies with susceptible or infected bovine cell lines will provide a better insight into the cellular pathology of a BSE infection and will potentially serve the therapeutic and diagnostic research.

8 Literaturverzeichnis

Abid K, Soto C. The intriguing prion disorders. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63:2342-51.

Adler V, Zeiler B, Kryukov V, Kascsak R, Rubenstein R, Grossman A. Small, highly structured RNAs participate in the conversion of human recombinant PrP(Sen) to PrP(Res) in vitro. *J Mol Biol.* 2003; 332:47-57.

Akowitz A, Sklaviadis T, Manuelidis EE, Manuelidis L. Nuclease-resistant polyadenylated RNAs of significant size are detected by PCR in highly purified Creutzfeldt-Jakob disease preparations. *Microb Pathog.* 1990; 9:33-45.

Akowitz A, Sklaviadis T, Manuelidis L. Endogenous viral complexes with long RNA cosediment with the agent of Creutzfeldt-Jakob disease. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22:1101-7.

Alper T, Haig DA, Clarke MC. The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun.* 1966; 22:278-84.

Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature.* 1967; 214:764-6.

Anderson RM, Donnelly CA, Ferguson NM, Woolhouse ME, Watt CJ, Udy HJ, MaWhinney S, Dunstan SP, Southwood TR, Wilesmith JW, Ryan JB, Hoinville LJ, Hillerton JE, Austin AR, Wells GA. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature.* 1996; 382:779-88.

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

Appel TR, Dumpitak C, Matthiesen U, Riesner D. Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold. *Biol Chem.* 1999; 380:1295-306.

Archer F, Bachelin C, Andreoletti O, Besnard N, Perrot G, Langevin C, Le Dur A, Vilette D, Baron-Van Evercooren A, Vilotte JL, Laude H. Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection. *J Virol.* 2004; 78:482-90.

Baeten LA, Powers BE, Jewell JE, Spraker TR, Miller MW. A Natural Case of Chronic Wasting Disease in a Free-ranging Moose (*Alces alces shirasi*). *J Wildl Dis.* 2007; 43:309-14.

Baskakov IV, Aagaard C, Mehlhorn I, Wille H, Groth D, Baldwin MA, Prusiner SB, Cohen FE. Self-assembly of recombinant prion protein of 106 residues. *Biochemistry*. 2000; 39:2792-804.

Baskakov IV. The reconstitution of mammalian prion infectivity de novo. *FEBS J*. 2007; 274:576-87.

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

Beekes M, McBride PA, Baldauf E. Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol*. 1998; 79:601-7.

Ben-Zaken O, Tzaban S, Tal Y, Horonchik L, Esko JD, Vlodavsky I, Taraboulos A. Cellular heparan sulfate participates in the metabolism of prions. *J Biol Chem*. 2003; 278:40041-9.

Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY, Kascsak RJ, Cashman NR, Bolton DC. Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology*. 1992; 42:149-56.

Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schonheit J, Tranulis MA, Bratberg B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec*. 2003; 153:202-8.

Beranger F, Mange A, Solassol J, Lehmann S. Cell culture models of transmissible spongiform encephalopathies. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 289:311-6.

Beringue V, Mallinson G, Kaiser M, Tayebi M, Sattar Z, Jackson G, Anstee D, Collinge J, Hawke S. Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. *Brain*. 2003; 126:2065-73.

Bernoulli C, Siegfried J, Baumgartner G, Regli F, Rabinowicz T, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr. Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery. *Lancet*. 1977; 1:478-9.

Bessen RA, Marsh RF. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol*. 1994; 68:7859-68.

Bestwick RK, Kozak SL, Kabat D. Overcoming interference to retroviral superinfection results in amplified expression and transmission of cloned genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85:5404-8.

Biacabe AG, Laplanche JL, Ryder S, Baron T. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep*. 2004; 5:110-5.

Billinis C, Panagiotidis CH, Psychas V, Argyroudis S, Nicolaou A, Leontides S, Papadopoulos O, Sklaviadis T. Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie. *J Gen Virol*. 2002; 83:713-21.

Birkett CR, Hennion RM, Bembridge DA, Clarke MC, Chree A, Bruce ME, Bostock CJ. Scrapie strains maintain biological phenotypes on propagation in a cell line in culture. *EMBO J*. 2001; 20:3351-8.

Bocharova OV, Breydo L, Parfenov AS, Salnikov VV, Baskakov IV. In vitro conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP(Sc). *J Mol Biol*. 2005a; 346:645-59.

Bocharova OV, Breydo L, Salnikov VV, Baskakov IV. Copper(II) inhibits in vitro conversion of prion protein into amyloid fibrils. *Biochemistry*. 2005b; 44:6776-87.

Bosque PJ, Prusiner SB. Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection. *J Virol*. 2000; 74:4377-86.

Bossers A, Schreuder BE, Muileman IH, Belt PB, Smits MA. PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J Gen Virol*. 1996; 77:2669-73.

Braun U, Schicker E, Hornlimann B. Diagnostic reliability of clinical signs in cows with suspected bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec*. 1998; 143:101-5.

Brotherston JG, Renwick CC, Stamp JT, Zlotnik I, Pattison IH. Spread and scrapie by contact to goats and sheep. *J Comp Pathol*. 1968; 78:9-17.

Brown DR, Wong BS, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, Jones IM. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J*. 1999; 344:1-5.

Brown P, Preece M, Brandel JP, Sato T, McShane L, Zerr I, Fletcher A, Will RG, Pocchiari M, Cashman NR, d'Aignaux JH, Cervenakova L, Fradkin J, Schonberger LB, Collins SJ. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. *Neurology*. 2000; 55:1075-81.

Bruce ME, Dickinson AG. Biological stability of different classes of scrapie agent. In: Prusiner S.B., Hadlow WJ (Herausgeber). *Slow transmissible disease of the nervous system* (Vol. 2). Academic Press, New York, NY. 1979; 71:86.

Bruce ME, McBride PA, Farquhar CF. Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci Lett*. 1989; 102:1-6.

Bruce ME, Fraser H. Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1991; 172:125-38.

Bruce ME, McConnell I, Fraser H, Dickinson AG. 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. *J Gen Virol*. 1991; 72:595-603.

Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*. 1997; 389:498-501.

Budka H, Aguzzi A, Brown P, Brucher JM, Bugiani O, Gullotta F, Haltia M, Hauw JJ, Ironside JW, Jellinger K, et al. Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol*. 1995; 5:459-66.

Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*. 1992; 356:577-82.

Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*. 1993; 73:1339-47.

Burger D, Hartsough GR. Encephalopathy of mink. II. Experimental and natural transmission. *J Infect Dis*. 1965; 115:393-9.

Buschmann A, Pfaff E, Reifenberg K, Muller HM, Groschup MH. Detection of cattle-derived BSE prions using transgenic mice overexpressing bovine PrP(C). *Arch Virol Suppl.* 2000; 16:75-86.

Buschmann A, Biacabe AG, Ziegler U, Bencsik A, Madec JY, Erhardt G, Luhken G, Baron T, Groschup MH. Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J Virol Methods.* 2004; 117:27-36.

Buschmann A, Groschup MH. Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. *J Infect Dis.* 2005; 192:934-42.

Buschmann A, Gretschel A, Biacabe AG, Schiebel K, Corona C, Hoffmann C, Eiden M, Baron T, Casalone C, Groschup MH. Atypical BSE in Germany--proof of transmissibility and biochemical characterization. *Vet Microbiol.* 2006; 117:103-16.

Butler DA, Scott MR, Bockman JM, Borchelt DR, Taraboulos A, Hsiao KK, Kingsbury DT, Prusiner SB. Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J Virol.* 1988; 62:1558-64.

Calzolari L, Lysek DA, Perez DR, Guntert P, Wuthrich K. Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:651-5.

Caplazi P, O'Rourke K, Wolf C, Shaw D, Baszler TV. Biology of PrP^{Sc} accumulation in two natural scrapie-infected sheep flocks. *J Vet Diagn Invest.* 2004; 16:489-96.

Capobianco R, Casalone C, Suardi S, Mangieri M, Miccolo C, Limido L, Catania M, Rossi G, Di Fede G, Giaccone G, Bruzzone MG, Minati L, Corona C, Acutis P, Gelmetti D, Lombardi G, Groschup MH, Buschmann A, Zanusso G, Monaco S, Caramelli M, Tagliavini F. Conversion of the BASE prion strain into the BSE strain: the origin of BSE? *PLoS Pathog.* 2007; 3:e31.

Carp RI, Meeker HC, Caruso V, Sersen E. Scrapie strain-specific interactions with endogenous murine leukaemia virus. *J Gen Virol.* 1999; 80:5-10.

Cartoni C, Schinina ME, Maras B, Nonno R, Vaccari G, Di Baria MA, Conte M, Liu QG, Lu M, Cardone F, Windl O, Pocchiari M, Agrimi U. Identification of the pathological prion protein allotypes in scrapie-infected heterozygous bank voles (*Clethrionomys glareolus*) by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2005; 1081:122-6.

Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, Tagliavini F, Monaco S, Caramelli M. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:3065-70.

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

Caughey BW, Dong A, Bhat KS, Ernst D, Hayes SF, Caughey WS. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry*. 1991; 30:7672-80.

Caughey B, Raymond GJ. Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol*. 1993; 67:643-50.

Caughey B. Scrapie-associated PrP accumulation and agent replication: effects of sulphated glycosaminoglycan analogues. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1994; 343:399-404.

Chandler RL. Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet*. 1961; 1:1378-9.

Chandler RL, Turfrey BA. Inoculation of voles, Chinese hamsters, gerbils and guinea-pigs with scrapie brain material. *Res Vet Sci*. 1972; 13:219-24.

Chen SG, Gambetti P. A journey through the species barrier. *Neuron*. 2002; 34:854-6.

Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM, et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*. 1985; 315:331-3.

Chesebro B, Wehrly K, Caughey B, Nishio J, Ernst D, Race R. Foreign PrP expression and scrapie infection in tissue culture cell lines. *Dev Biol Stand*. 1993; 80:131-40.

Chesebro B. BSE and prions: uncertainties about the agent. *Science*. 1998; 279:42-3.

Chesebro B, Trifilo M, Race R, Meade-White K, Teng C, LaCasse R, Raymond L, Favara C, Baron G, Priola S, Caughey B, Masliah E, Oldstone M. Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science*. 2005; 308:1435-9.

Chiesa R, Piccardo P, Ghetti B, Harris DA. Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. *Neuron*. 1998; 21:1339-51.

Clarke MC, Haig DA. Evidence for the multiplication of scrapie agent in cell culture. *Nature*. 1970a; 225:100-1.

Clarke MC, Haig DA. Multiplication of scrapie agent in cell culture. *Res Vet Sci*. 1970b; 11:500-1.

Clarke MC, Millson GC. Infection of a cell line of mouse L fibroblasts with scrapie agent. *Nature*. 1976; 261:144-5.

Cohen FE, Pan KM, Huang Z, Baldwin M, Fletterick RJ, Prusiner SB. Structural clues to prion replication. *Science*. 1994; 264:530-1.

Cohen FE, Prusiner SB. Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem*. 1998; 67:793-819.

Colchester AC, Colchester NT. The origin of bovine spongiform encephalopathy: the human prion disease hypothesis. *Lancet*. 2005; 366:856-61.

Colling SB, King TM, Collinge J, Jefferys JGR. Prion protein null mice: abnormal intrinsic properties of hippocampal CA1 pyramidal cells. *Brain Res. Assoc. Abstr*. 1995; 12 (Abstract).

Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*. 1994; 370:295-7.

Collinge J, Palmer MS, Sidle KC, Gowland I, Medori R, Ironside J, Lantos P. Transmission of fatal familial insomnia to laboratory animals. *Lancet*. 1995; 346:569-70.

Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*. 1996; 383:685-90.

Collinge J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*. 2001; 24:519-50.

Collinge J, Whitfield J, McKintosh E, Beck J, Mead S, Thomas DJ, Alpers MP. Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet*. 2006; 367:2068-74.

Collins SJ, Lawson VA, Masters CL. Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet*. 2004; 363:51-61.

Come JH, Fraser PE, Lansbury PT Jr. A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90:5959-63.

Cordeiro Y, Machado F, Juliano L, Juliano MA, Brentani RR, Foguel D, Silva JL. DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J Biol Chem*. 2001; 276:49400-9.

Creutzfeldt HG. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Ges Neurol Psychiat* 1920; 57:1-18.

Cronier S, Laude H, Peyrin JM. Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:12271-6.

Danilov EP, Bukina NS, Akulova BP. Encephalopathy in mink (in russischer Sprache). *Krolikovod Zverovod* 1974; 17:34.

Dawson M, Wells GA, Parker BN, Scott AC. Primary parenteral transmission of bovine spongiform encephalopathy to the pig. *Vet Rec*. 1990; 127:338.

Deleault NR, Lucassen RW, Supattapone S. RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*. 2003; 425:717-20.

Deleault NR, Geoghegan JC, Nishina K, Kascsak R, Williamson RA, Supattapone S. Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions. *J Biol Chem*. 2005; 280:26873-9.

Derrington E, Gabus C, Leblanc P, Chnaidermann J, Grave L, Dormont D, Swietnicki W, Morillas M, Marck D, Nandi P, Darlix JL. PrPC has nucleic acid chaperoning properties similar to the nucleocapsid protein of HIV-1. *C R Biol*. 2002; 325:17-23.

Dickinson AG, Meikle VM. A comparison of some biological characteristics of the mouse-passaged scrapie agents, 22A and ME7. *Genet Res.* 1969; 13:213-25.

Dickinson AG, Stamp JT, Renwick CC. Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *J Comp Pathol.* 1974; 84:19-25.

Dickinson AG. Scrapie in sheep and goats. In: Kimberlin RH (Herausgeber) *Slow virus diseases of animals and man.* North-Holland, Amsterdam. 1976; 209-241.

Dlakic WM, Grigg E, Bessen RA. Prion infection of muscle cells in vitro. *J Virol.* 2007; 81:4615-24.

Eddy RG. Origin of BSE. *Vet Rec.* 1995; 137:648.

Eiden M, Palm GJ, Hinrichs W, Matthey U, Zahn R, Groschup MH. Synergistic and strain-specific effects of bovine spongiform encephalopathy and scrapie prions in the cell-free conversion of recombinant prion protein. *J Gen Virol.* 2006; 87:3753-61.

Eigen M. Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys Chem.* 1996; 63:A1-18.

Eklund CM, Kennedy RC, Hadlow WJ. Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse. *J Infect Dis.* 1967; 117:15-22.

Eloit M, Adjou K, Culpier M, Fontaine JJ, Hamel R, Lilin T, Messiaen S, Andreoletti O, Baron T, Bencsik A, Biacabe AG, Beringue V, Laude H, Le Dur A, Vilotte JL, Comoy E, Deslys JP, Grassi J, Simon S, Lantier F, Sarradin P. BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec.* 2005; 156:523-4.

Enari M, Flechsig E, Weissmann C. Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:9295-9.

Endo T, Groth D, Prusiner SB, Kobata A. Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry.* 1989; 28:8380-8.

Epstein V, Pointing S, Halfacre S. Atypical scrapie in the Falkland Islands. *Vet Rec.* 2005; 157:667-8.

Ertmer A, Gilch S, Yun SW, Flechsig E, Klebl B, Stein-Gerlach M, Klein MA, Schatzl HM. The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrP^{Sc} in prion-infected cells. *J Biol Chem*. 2004; 279:41918-27.

Etessami R, Chaumontet C, Laude H, Vilette D. Scratch-wounding renders cultivated cells less permissive to prion infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 330:5-10.

Everest SJ, Thorne L, Barnicle DA, Edwards JC, Elliott H, Jackman R, Hope J. Atypical prion protein in sheep brain collected during the British scrapie-surveillance programme. *J Gen Virol*. 2006; 87:471-7.

Follet J, Lemaire-Vieille C, Blanquet-Grossard F, Podevin-Dimster V, Lehmann S, Chauvin JP, Decavel JP, Varea R, Grassi J, Fontes M, Cesbron JY. PrP expression and replication by Schwann cells: implications in prion spreading. *J Virol*. 2002; 76:2434-9.

Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ, Hall SM. Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience*. 2002; 113:177-92.

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

Fraser H. A survey of primary transmission of Icelandic scrapie (Rida) in mice. In: Court LA, Cathala F (Herausgeber). *Virus non-conventionnels et affections du système nerveux central*. Masson, Paris. 1983; 34-46.

Gabus C, Derrington E, Leblanc P, Chnaiderman J, Dormont D, Swietnicki W, Morillas M, Surewicz WK, Marc D, Nandi P, Darlix JL. The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCP7 of HIV-1. *J Biol Chem*. 2001; 276:19301-9.

Gajdusek DC, Zigas V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med*. 1957; 257:974-8.

Gasset M, Baldwin MA, Lloyd DH, Gabriel JM, Holtzman DM, Cohen F, Fletterick R, Prusiner SB. Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89:10940-4.

Gavier-Widen D, Noremark M, Benestad S, Simmons M, Renstrom L, Bratberg B, Elvander M, af Segerstad CH. Recognition of the Nor98 variant of scrapie in the Swedish sheep population. *J Vet Diagn Invest.* 2004; 16:562-7.

Gerstmann J, Sträussler E, Scheinker J. Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems; zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z Ges Neurol Psychiat* 1936; 154:736-762.

Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. Experimental subacute spongiform virus encephalopathies in primates and other laboratory animals. *Science.* 1973; 182:67-8.

Gibbs CJ Jr, Bolis CL. Normal isoform of amyloid protein (PrP) in brains of spawning salmon. *Mol Psychiatry.* 1997; 2:146-7.

Gilch S, Winklhofer KF, Groschup MH, Nunziante M, Lucassen R, Spielhauer C, Muranyi W, Riesner D, Tatzelt J, Schatzl HM. Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. *EMBO J.* 2001; 20:3957-66.

Giri RK, Young R, Pitstick R, DeArmond SJ, Prusiner SB, Carlson GA. Prion infection of mouse neurospheres. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103:3875-80.

Goldmann W, Hunter N, Foster JD, Salbaum JM, Beyreuther K, Hope J. Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87:2476-80.

Goldmann W, Hunter N, Benson G, Foster JD, Hope J. Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the Sip gene. *J Gen Virol.* 1991; 72:2411-7.

Goldmann W, Martin T, Foster J, Hughes S, Smith G, Hughes K, Dawson M, Hunter N. Novel polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period. *J Gen Virol.* 1996; 77:2885-91.

Gossert AD, Bonjour S, Lysek DA, Fiorito F, Wuthrich K. Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:646-50.

Govaerts C, Wille H, Prusiner SB, Cohen FE. Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:8342-7.

Gretzschel A, Buschmann A, Eiden M, Ziegler U, Luhken G, Erhardt G, Groschup MH. Strain typing of German transmissible spongiform encephalopathies field cases in small ruminants by biochemical methods. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2005; 52:55-63.

Griffith JS. Self-replication and scrapie. *Nature*. 1967; 215:1043-4.

Groschup MH, Weiland F, Straub OC, Pfaff E. Detection of scrapie agent in the peripheral nervous system of a diseased sheep. *Neurobiol Dis*. 1996; 3:191-5.

Groschup MH, Kuczius T. Die TSE-Erregerstämme. In: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar H (Herausgeber). *Prionen und Prionkrankheiten*. Walter de Gruyter, Berlin. 2001; 117-131.

Gustafson DP, Kanitz CL. In: Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr, Alpers MP (Herausgeber). *Slow, latent, and temperate virus infections*. National Institute of Neurological Diseases and Blindness Monograph 2., U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Washington, D.C. 1965; 221.

Haase B, Doherr MG, Seuberlich T, Drogemüller C, Dolf G, Nicken P, Schiebel K, Ziegler U, Groschup MH, Zurbriggen A, Leeb T. PRNP promoter polymorphisms are associated with BSE susceptibility in Swiss and German cattle. *BMC Genet*. 2007; 8:15.

Hadlow WJ, Karstad L. Transmissible encephalopathy of mink in Ontario. *Can Vet J*. 1968; 9:193-6.

Hadlow WJ, Kennedy RC, Race RE. Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J Infect Dis*. 1982; 146:657-64.

Hamir AN, Kunkle RA, Cutlip RC, Miller JM, O'Rourke KI, Williams ES, Miller MW, Stack MJ, Chaplin MJ, Richt JA. Experimental transmission of chronic wasting disease agent from mule deer to cattle by the intracerebral route. *J Vet Diagn Invest*. 2005; 17:276-81.

Hamir AN, Kunkle RA, Cutlip RC, Miller JM, Williams ES, Richt JA. Transmission of chronic wasting disease of mule deer to Suffolk sheep following intracerebral inoculation. *J Vet Diagn Invest*. 2006; 18:558-65.

Haralambiev H, Ivanov I, Vesselinova A, Mermerski K. An attempt to induce scrapie in local sheep in Bulgaria. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1973; 20:701-9.

Harris DA, Falls DL, Johnson FA, Fischbach GD. A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88:7664-8.

Harris DA. Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br Med Bull*. 2003; 66:71-85.

Harris DA, True HL. New insights into prion structure and toxicity. *Neuron*. 2006; 50:353-7.

Hartsough GR, Burger D. Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis*. 1965; 115:387-92.

Hartung J, Zimmermann H, Johannsen H. Infektiöse Enzephalopathie beim Nerz 1. Mitteilung: Klinisch-epizootiologische und experimentelle Untersuchungen. *Monatsh Veterinärmed* 1970; 25:385-388.

Hayashi HK, Yokoyama T, Takata M, Iwamaru Y, Imamura M, Ushiki YK, Shinagawa M. The N-terminal cleavage site of PrP^{Sc} from BSE differs from that of PrP^{Sc} from scrapie. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 328:1024-7.

Hetz C, Maundrell K, Soto C. Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? *Trends Mol Med*. 2003; 9:237-43.

Hijazi N, Shaked Y, Rosenmann H, Ben-Hur T, Gabizon R. Copper binding to PrP^C may inhibit prion disease propagation. *Brain Res*. 2003; 993:192-200.

Hill AF, Antoniou M, Collinge J. Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J Gen Virol*. 1999; 80:11-4.

Hoffmann C, Ziegler U, Buschmann A, Weber A, Kupfer L, Oelschlegel A, Hammerschmidt B, Groschup MH. Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol*. 2007; 88:1048-55.

Hölscher C, Delius H, Bürkle A. Overexpression of nonconvertible PrP^C delta114-121 in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells leads to trans-dominant inhibition of wild-type PrP(Sc) accumulation. *J Virol*. 1998; 72:1153-9.

Horiuchi M, Priola SA, Chabry J, Caughey B. Interactions between heterologous forms of prion protein: binding, inhibition of conversion, and species barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97:5836-41.

Hornemann S, Schorn C, Wuthrich K. NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains. *EMBO Rep*. 2004; 5:1159-64.

Hörnlimann B. Historische Einführung: Prionen und Prionenkrankheiten. In: Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar H (Herausgeber). *Prionen und Prionkrankheiten*. Walter de Gruyter, Berlin. 2001; 3-20.

Hourigan J, Klingsporn A, Clark WW, de Camp M. Epidemiology of scrapie in the United States. In: Prusiner SB, Hadlow WJ (Herausgeber). *Slow transmissible diseases of the nervous system*. Academic Press, New York. 1979; 1:331-356.

Hunter GD, Millson GC. Studies on the heat stability and chromatographic behaviour of the scrapie agent. *J Gen Microbiol*. 1964; 37:251-8.

Hunter N, Goldmann W, Smith G, Hope J. The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. *Arch Virol*. 1994a;137:171-7.

Hunter N, Goldmann W, Smith G, Hope J. Frequencies of PrP gene variants in healthy cattle and cattle with BSE in Scotland. *Vet Rec*. 1994b; 135:400-3.

Hunter N, Foster JD, Goldmann W, Stear MJ, Hope J, Bostock C. Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch Virol*. 1996; 141:809-24.

Jackson GS, Hosszu LL, Power A, Hill AF, Kenney J, Saibil H, Craven CJ, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J. Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science*. 1999; 283:1935-7.

Jakob A. Über eine der multiplen Sklerose klinisch nahestehende Erkrankung des Zentralnervensystems (spastische Pseudosklerose) mit bemerkenswertem anatomischem Befund. *Med. Klin*. 1921a; 17:372–376.

Jakob A. Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde. *Z. Ges. Neurol. Psychiat*. 1921b; 64:147–228.

Jakob A. Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). Dtsch. Z. Nervenheilk. 1921c; 70:132–146.

Jarrett JT, Lansbury PT Jr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? Cell. 1993; 73:1055-8.

Jeffrey M, Wells GA. Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angasi*). Vet Pathol. 1988; 25:398-9.

Johnson RT, Gibbs CJ Jr. Creutzfeldt-Jakob disease and related transmissible spongiform encephalopathies. N Engl J Med. 1998; 339:1994-2004.

Kaneko K, Zulianello L, Scott M, Cooper CM, Wallace AC, James TL, Cohen FE, Prusiner SB. Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94:10069-74.

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

Keshet GI, Ovadia H, Taraboulos A, Gabizon R. Scrapie-infected mice and PrP knockout mice share abnormal localization and activity of neuronal nitric oxide synthase. J Neurochem. 1999; 72:1224-31.

Kimberlin RH. Early events in the pathogenesis of scrapie in mice: biological and biochemical studies. In: Prusiner S.B., Hadlow WJ (Herausgeber). Slow transmissible disease of the nervous system. Academic Press, New York, NY. 1979; 2:33-54.

Kirkwood JK, Wells GA, Wilesmith JW, Cunningham AA, Jackson SI. Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Oryx leucoryx*) and a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). Vet Rec. 1990; 127:418-20.

Kirkwood JK, Cunningham AA. Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. Vet Rec. 1994; 135:296-303.

Kirkwood JK, Cunningham AA. Scrapie-like spongiform encephalopathies (prion diseases) in non-domesticated species. In: Fowler ME, Miller RE (Herausgeber). Zoo and wild animal medicine: current therapy 4. W.B. Saunders Co, Philadelphia 1999; 662-668.

Klein TR, Kirsch D, Kaufmann R, Riesner D. Prion rods contain small amounts of two host sphingolipids as revealed by thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Biol Chem.* 1998; 379:655-66.

Klöhn PC, Stoltze L, Flechsig E, Enari M, Weissmann C. A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:11666-71.

Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, Caughey B. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature.* 1994; 370:471-4.

Kocisko DA, Priola SA, Raymond GJ, Chesebro B, Lansbury PT Jr, Caughey B. Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:3923-7.

Kreeger TJ, Montgomery DL, Jewell JE, Schultz W, Williams ES. Oral transmission of chronic wasting disease in captive Shira's moose. *J Wildl Dis.* 2006; 42:640-5.

Kuczius T, Haist I, Groschup MH. Molecular analysis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie strain variation. *J Infect Dis.* 1998; 178:693-9.

Kuczius T, Groschup MH. Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains. *Mol Med.* 1999; 5:406-18.

Kuczius T, Buschmann A, Zhang W, Karch H, Becker K, Peters G, Groschup MH. Cellular prion protein acquires resistance to proteolytic degradation following copper ion binding. *Biol Chem.* 2004; 385:739-47.

Kupfer L, Eiden M, Buschmann A, Groschup MH. Amino acid sequence and prion strain specific effects on the in vitro and in vivo convertibility of ovine/murine and bovine/murine prion protein chimeras. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1772:704-13.

Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T. Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature.* 1999; 400:225-6.

Ladogana A, Puopolo M, Croes EA, Budka H, Jarius C, Collins S, Klug GM, Sutcliffe T, Giulivi A, Alperovitch A, Delasnerie-Laupretre N, Brandel JP, Poser S, Kretzschmar H, Rietveld I, Mitrova E, Cuesta Jde P, Martinez-Martin P, Glatzel M, Aguzzi A, Knight R, Ward H, Pocchiari M, van Duijn CM, Will RG, Zerr I. Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology*. 2005; 64:1586-91.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-5.

Lasmezas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Lamoury F, Dormont D, Robain O, Ironside J, and Hauw JJ. BSE transmission to macaques. *Nature* 1996; 381:743-744.

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

Leblanc P, Alais S, Porto-Carreiro I, Lehmann S, Grassi J, Raposo G, Darlix JL. Retrovirus infection strongly enhances scrapie infectivity release in cell culture. *EMBO J*. 2006; 25:2674-85.

Lee S, Eisenberg D. Seeded conversion of recombinant prion protein to a disulfide-bonded oligomer by a reduction-oxidation process. *Nat Struct Biol*. 2003; 10:725-30.

Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. Synthetic mammalian prions. *Science*. 2004; 305:673-6.

Legname G, Nguyen HO, Baskakov IV, Cohen FE, Dearmond SJ, Prusiner SB. Strain-specified characteristics of mouse synthetic prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:2168-73.

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

Leopold JG. Der Trab ist auch eine Krankheit der Schaaf, und ist ansteckend. In: Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zu der Landwirtschaft. Fünf Theile. Mit Kupfer und Baurissen. Hofreichsgräflich-Promnitzischen Wirthschafts-Amtmann der Herrschaft Sorau. Christian Friedrich Günthern, Berlin und Glogau. 1759.

Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, Tinuper P, Zucconi M, Gambetti P. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med*. 1986; 315:997-1003.

Lysek DA, Schorn C, Nivon LG, Esteve-Moya V, Christen B, Calzolari L, von Schroetter C, Fiorito F, Herrmann T, Guntert P, Wuthrich K. Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:640-5.

Maas E, Geissen M, Groschup MH, Rost R, Onodera T, Schatzl H, Vorberg I. Scrapie infection of PrP deficient cell line upon ectopic expression of mutant prion proteins. *J Biol Chem*. 2007; Epub: 10.1074/jbc.M701309200.

Madore N, Smith KL, Graham CH, Jen A, Brady K, Hall S, Morris R. Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *EMBO J*. 1999; 18:6917-26.

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

Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol*. 1994; 8:121-7.

Manson JC, Hope J, Clarke AR, Johnston A, Black C, MacLeod N. PrP gene dosage and long term potentiation. *Neurodegeneration*. 1995; 4:113-4.

Manuelidis EE, Kim J, Angelo JN, Manuelidis L. Serial propagation of Creutzfeldt-Jakob disease in guinea pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976; 73:223-7.

Manuelidis L, Fritch W, Xi YG. Evolution of a strain of CJD that induces BSE-like plaques. *Science*. 1997; 277:94-8.

Manuelidis L. A 25 nm virion is the likely cause of transmissible spongiform encephalopathies. *J Cell Biochem*. 2007; 100:897-915.

Markovits P, Dautheville C, Dormont D, Dianoux L, Latarjet R. In vitro propagation of the scrapie agent. I. Transformation of mouse glia and neuroblastoma cells after infection with the mouse-adapted scrapie strain c-506. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1983; 60:75-80.

Marsh RF, Hadlow WJ. Transmissible mink encephalopathy. *Rev Sci Tech*. 1992; 11:539-50.

Mathiason CK, Powers JG, Dahmes SJ, Osborn DA, Miller KV, Warren RJ, Mason GL, Hays SA, Hayes-Klug J, Seelig DM, Wild MA, Wolfe LL, Spraker TR, Miller MW, Sigurdson CJ, Telling GC, Hoover EA. Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science*. 2006; 314:133-6.

McBride PA, Wilson MI, Eikelenboom P, Tunstall A, Bruce ME. Heparan sulfate proteoglycan is associated with amyloid plaques and neuroanatomically targeted PrP pathology throughout the incubation period of scrapie-infected mice. *Exp Neurol*. 1998; 149:447-54.

McGowan J. Scrapie in sheep. *Scottish Journal of Agriculture* 1922; 5:365-375.

McKenzie D, Bartz J, Mirwald J, Olander D, Marsh R, Aiken J. Reversibility of scrapie inactivation is enhanced by copper. *J Biol Chem*. 1998; 273:25545-7.

Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP, Falkow S. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol*. 1976; 127:1529-37.

Middleton DJ, Barlow RM. Failure to transmit bovine spongiform encephalopathy to mice by feeding them with extraneural tissues of affected cattle. *Vet Rec*. 1993; 132:545-7.

Milhavet O, Casanova D, Chevallier N, McKay RD, Lehmann S. Neural stem cell model for prion propagation. *Stem Cells*. 2006; 24:2284-91.

Murdoch GH, Sklaviadis T, Manuelidis EE, Manuelidis L. Potential retroviral RNAs in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol*. 1990; 64:1477-86.

Narang H. A critical review of the nature of the spongiform encephalopathy agent: protein theory versus virus theory. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002; 227:4-19.

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

Nguyen J, Baldwin MA, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein peptides induce alpha-helix to beta-sheet conformational transitions. *Biochemistry.* 1995; 34:4186-92.

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

Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell.* 1985; 40:735-46.
Onnasch H, Gunn HM, Bradshaw BJ, Benestad SL, Bassett HF. Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Vet Rec.* 2004; 155:636-7.

Orem NR, Geoghegan JC, Deleault NR, Kascsak R, Supattapone S. Copper (II) ions potently inhibit purified PrPres amplification. *J Neurochem.* 2006; 96:1409-15.

Orge L, Galo A, Machado C, Lima C, Ochoa C, Silva J, Ramos M, Simas JP. Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *J Gen Virol.* 2004; 85:3487-91.

Paisley LG, Hostrup-Pedersen J. A quantitative assessment of the risk of transmission of bovine spongiforme encephalopathy by tallo-based calf-milk-replacer. *Prev Vet Med* 2004; 63:135-149.

Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, 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; 90:10962-6.

Pan T, Colucci M, Wong BS, Li R, Liu T, Petersen RB, Chen S, Gambetti P, Sy MS. Novel differences between two human prion strains revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem.* 2001; 276:37284-8.

Parchi P, Zou W, Wang W, Brown P, Capellari S, Ghetti B, Kopp N, Schulz-Schaeffer WJ, Kretzschmar HA, Head MW, Ironside JW, Gambetti P, Chen SG. Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:10168-72.

Parry HB. Scrapie: a transmissible and hereditary disease of sheep. *Heredity*. 1962; 17:75-105.

Pattison IH, Millson GC. Experimental transmission of scrapie to goats and sheep by the oral route. *J Comp Path* 1961; 71:171-176.

Pattison, IH. Experiments with scrapie with special reference to the nature of the agent and the pathology of the disease. In: Gajdusek DC, Gibbs C J Jr, Alpers M P (Herausgeber). Slow, latent and temperate virus infections. National Institute of Neurological Diseases and Blindness Monograph 2. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Washington, D.C. 1965; 249-257.

Pattison IH. The relative susceptibility of sheep, goats and mice to two types of the goat scrapie agent. *Res Vet Sci*. 1966; 7:207-12.

Pattison IH, Hoare MN, Jebbett JN, Watson WA. Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Vet Rec*. 1972; 90:465-8.

Pattison IH, Hoare MN, Jebbett JN, Watson WA. Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Br Vet J*. 1974 ; 130:65-67.

Pearson GR, Gruffydd-Jones TJ, Wyatt JM, Hope J, Chong A, Scott AC, Dawson M, Wells GA. Feline spongiform encephalopathy. *Vet Rec*. 1991; 128:532.

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

Priola SA, Chesebro B. A single hamster PrP amino acid blocks conversion to protease-resistant PrP in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *J Virol*. 1995; 69:7754-8.

Priola SA. Prion protein and species barriers in the transmissible spongiform encephalopathies. *Biomed Pharmacother*. 1999; 53:27-33.

Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 1982; 216:136-44.

Prusiner SB. Molecular biology of prions causing infectious and genetic encephalopathies of humans as well as scrapie of sheep and BSE of cattle. *Dev Biol Stand*. 1991; 75:55-74.

Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. *Science*. 1991; 252:1515-22.

Prusiner SB, Scott MR. Genetics of prions. *Annu Rev Genet*. 1997; 31:139-75.

Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:13363-83.

Race RE, Fadness LH, Chesebro B. Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol*. 1987; 68:1391-9.

Race RE, Caughey B, Graham K, Ernst D, Chesebro B. Analyses of frequency of infection, specific infectivity, and prion protein biosynthesis in scrapie-infected neuroblastoma cell clones. *J Virol*. 1988; 62:2845-9.

Race R. The scrapie agent in vitro. *CurrTop Microbiol Immunol*. 1991; 172: 181-93.

Ramaswamy G, Slack FJ. siRNA. A guide for RNA silencing. *Chem Biol*. 2002; 9:1053-5.

Ridley RM, Baker HF. To what extent is strain variation evidence for an independent genome in the agent of the transmissible spongiform encephalopathies? *Neurodegeneration*. 1996; 5:219-31.

Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature*. 1996; 382:180-2.

Riesner D, Kellings K, Post K, Wille H, Serban H, Groth D, Baldwin MA, Prusiner SB. Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity. *J Virol*. 1996; 70:1714-22.

Rochet JC, Lansbury PT Jr. Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr Opin Struct Biol*. 2000; 10:60-8.

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

Rubenstein R, Deng H, Race RE, Ju W, Scalici CL, Papini MC, Kascsak RJ, Carp RI. Demonstration of scrapie strain diversity in infected PC12 cells. *J Gen Virol*. 1992; 73:3027-31.

Russelakis-Carneiro M, Saborio GP, Anderes L, Soto C. Changes in the glycosylation pattern of prion protein in murine scrapie. Implications for the mechanism of neurodegeneration in prion diseases. *J Biol Chem.* 2002; 277:36872-7.

Saborio GP, Soto C, Kascsak RJ, Levy E, Kascsak R, Harris DA, Frangione B. Cell-lysate conversion of prion protein into its protease-resistant isoform suggests the participation of a cellular chaperone. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 258:470-5.

Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr. Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem.* 1993; 268:20276-84.

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

Safar JG, Kellings K, Serban A, Groth D, Cleaver JE, Prusiner SB, Riesner D. Search for a prion-specific nucleic acid. *J Virol.* 2005; 79:10796-806.

Saiki RK, Scharfs S, Faloona F, Mullis KB, Hor GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-1354.

Schätzl HM, Laszlo L, Holtzman DM, Tatzelt J, DeArmond SJ, Weiner RI, Mobley WC, Prusiner SB. A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J Virol.* 1997; 71:8821-31.

Scott MR, Kohler R, Foster D, Prusiner SB. Chimeric prion protein expression in cultured cells and transgenic mice. *Protein Sci.* 1992; 1:986-97.

Scott M, Groth D, Foster D, Torchia M, Yang SL, DeArmond SJ, Prusiner SB. Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell.* 1993; 73:979-88.

Seuberlich T, Botteron C, Benestad SL, Brunisholz H, Wyss R, Kihm U, Schwermer H, Friess M, Nicolier A, Heim D, Zurbriggen A. Atypical scrapie in a swiss goat and implications for transmissible spongiform encephalopathy surveillance. *J Vet Diagn Invest.* 2007; 19:2-8.

Sigurdsson B. Rida – a chronic encephalitis of sheep. With general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. *Brit Vet J.* 1954; 110:341-354.

Sigurdsson EM, Brown DR, Alim MA, Scholtzova H, Carp R, Meeker HC, Prelli F, Frangione B, Wisniewski T. Copper chelation delays the onset of prion disease. *J Biol Chem.* 2003; 278:46199-202.

Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, Caughey B. The most infectious prion protein particles. *Nature.* 2005; 437:257-61.

Sklaviadis T, Akowitz A, Manuelidis EE, Manuelidis L. Nucleic acid binding proteins in highly purified Creutzfeldt-Jakob disease preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90:5713-7.

Solassol J, Crozet C, Lehmann S. Prion propagation in cultured cells. *Br Med Bull.* 2003; 66:87-97.

Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4:49-60.

Soto C, Castilla J. The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. *Nat Med.* 2004; 10:63-7.

Spraker TR, Miller MW, Williams ES, Getzy DM, Adrian WJ, Schoonveld GG, Spowart RA, O'Rourke KI, Miller JM, Merz PA. Spongiform encephalopathy in free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) and Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) in northcentral Colorado. *J Wildl Dis.* 1997; 33:1-6.

Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell.* 1987; 51:229-40.

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

Stamp JT, Brotherston JG, Zlotnik I, Mackay JM, Smith W. Further studies on scrapie. *J Comp Pathol.* 1959; 69:268-80.

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

Stephenson DA, Chiotti K, Ebeling C, Groth D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Carlson GA. Quantitative trait loci affecting prion incubation time in mice. *Genomics*. 2000; 69:47-53.

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

Supattapone S. Prion protein conversion in vitro. *J Mol Med*. 2004; 82:348-56.

Taraboulos A, Serban D, Prusiner SB. Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. *J Cell Biol*. 1990; 110:2117-32.

Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Laszlo L, Prusiner SB. Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol*. 1995; 129:121-32.

Telling GC, Scott M, Hsiao KK, Foster D, Yang SL, Torchia M, Sidle KC, Collinge J, DeArmond SJ, Prusiner SB. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:9936-40.

Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell*. 1995; 83:79-90.

Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Mastrianni J, Lugaresi E, Gambetti P, Prusiner SB. Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science*. 1996; 274:2079-82.

Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*. 1996; 380:639-42.

Tranulis MA, Osland A, Bratberg B, Ulvund MJ. Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. *J Gen Virol*. 1999; 80:1073-7.

Vaccari G, Petraroli R, Agrimi U, Eleni C, Perfetti MG, Di Bari MA, Morelli L, Ligios C, Busani L, Nonno R, Di Guardo G. PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie. Brief report. *Arch Virol.* 2001; 146:2029-37.

Vaccari G, Di Bari MA, Morelli L, Nonno R, Chiappini B, Antonucci G, Marcon S, Esposito E, Fazzi P, Palazzini N, Troiano P, Petrella A, Di Guardo G, Agrimi U. Identification of an allelic variant of the goat PrP gene associated with resistance to scrapie. *J Gen Virol.* 2006; 87:1 395-402.

Vana K, Zuber C, Nikles D, Weiss S. Novel aspects of prions, their receptor molecules, and innovative approaches for TSE therapy. *Cell Mol Neurobiol.* 2007; 27:107-28.

Vanik DL, Surewicz KA, Surewicz WK. Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions. *Mol Cell.* 2004; 14:139-45.

van Keulen LJ, Schreuder BE, Melaen RH, Poelen-van den Berg M, Mooij-Harkes G, Vromans ME, Langeveld JP. Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Vet Pathol.* 1995; 32:299-308.

van Keulen LJ, Schreuder BE, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA. Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol Suppl.* 2000; 16:57-71.

Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, Anderson RG, Taraboulos A, Prusiner SB. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:14945-9.

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

Vilotte JL, Soulier S, Essalmani R, Stinnakre MG, Vaiman D, Lepourry L, Da Silva JC, Besnard N, Dawson M, Buschmann A, Groschup M, Petit S, Madelaine MF, Rakatobe S, Le Dur A, Vilette D, Laude H. Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *J Virol.* 2001; 75:5977-84.

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

Warner RG, Hundt C, Weiss S, Turnbull JE. Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. *J Biol Chem.* 2002; 277:18421-30.

Weiss S, Proske D, Neumann M, Groschup MH, Kretzschmar HA, Famulok M, Winnacker EL. RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *J Virol.* 1997; 71:8790-7.

Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec.* 1987; 121:419-20.

Wells GA, Wilesmith JW. The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol.* 1995; 5:91-103.

Wells GA, Hawkins SA, Austin AR, Ryder SJ, Done SH, Green RB, Dexter I, Dawson M, Kimberlin RH. Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs. *J Gen Virol.* 2003; 84:1021-31.

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

Wilesmith JW, Wells GA, Cranwell MP, Ryan JB. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec.* 1988; 123:638-44.

Wilesmith JW, Ryan JB, Atkinson MJ. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec.* 1991; 128:199-203.

Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet.* 1996; 347:921-5.

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

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

Williams ES, Young S. Spongiform encephalopathies in Cervidae. *Rev Sci Tech.* 1992; 11:551-67.

Willoughby K, Kelly DF, Lyon DG, Wells GA. Spongiform encephalopathy in a captive puma (*Felis concolor*). *Vet Rec.* 1992; 131:431-4.

Wong C, Xiong LW, Horiuchi M, Raymond L, Wehrly K, Chesebro B, Caughey B. Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. *EMBO J.* 2001; 20:377-86.

Wopfner F, Weidenhofer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, Werner T, Schatzl HM. Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol.* 1999; 289:1163-78.

Wyatt JM, Pearson GR, Smerdon TN, Gruffydd-Jones TJ, Wells GA. Spongiform encephalopathy in a cat. *Vet Rec.* 1990; 126:513.

Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez Garcia F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wuthrich K. NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:145-50.

Zhang H, Kaneko K, Nguyen JT, Livshits TL, Baldwin MA, Cohen FE, James TL, Prusiner SB. Conformational transitions in peptides containing two putative alpha-helices of the prion protein. *J Mol Biol.* 1995; 250:514-26.

Ziegler U, Buschmann A, Schulz J, Groschup MH. Untersuchungen zur analytischen Empfindlichkeit von BSE-Schnelltests. In: DVG (Herausgeber) AVID-Mitteilungen, 23. Tagung Virologie, Kloster Banz, Staffelstein, 15.-17. September 2004; V6.

Zigas V, Gajdusek DC. Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea. *Med J Aust.* 1957; 44:745-54.

Danksagung

Mein Dank gilt all den Menschen, die zum Entstehen meiner Promotionsarbeit beigetragen haben, sei es durch ihre praktische, gedankliche oder emotionale Unterstützung.

Prof. Dr. Uwe Truyen danke ich für die Gelegenheit eine externe Doktorarbeit anfertigen zu dürfen.

Prof. Dr. Martin H. Groschup danke ich für die Überlassung des Themas, die gewährte forschersche Freiheit und die stete Unterstützung. Seine fachlichen Anregungen waren oft ein Anstoß in die richtige Richtung und sein Vertrauen in meine Arbeit trug wesentlich zum Gelingen derselben bei.

Dr. Markus Geißen danke ich für meine wissenschaftliche Ausbildung und die Betreuung der Arbeit. Er führte mich in die Welt der Zellkulturen ein und half mir bei meinen ersten Schritten auf den Pfaden der Molekularbiologie, war immer zu einer Diskussion bereit, hatte für fast jedes Problem einen Lösungsansatz und ertrug meine emotionalen Höhen und Tiefen als Freund. „Was Du auch noch machen kannst...“, „Das ist doch gar kein Problem.“ und „definitiv“ werden mir genauso unvergessen bleiben, wie unsere philosophischen Debatten über die Probleme der Welt und die menschliche Moral.

Katrin Werner danke ich für ihre großartige Hilfe in allen praktischen Belangen dieser Arbeit. Sie half mir bei meinen ersten Schritten in die Welt des Laborlebens und hat mich später durch hervorragende technische Assistenz unterstützt. Sie hat Bitten erfüllt, bevor sie auch nur ausgesprochen waren.

Dr. Roland Riebe gebührt mein Dank für die Bereitstellung der „Zellbank-Zelllinien“ und die wichtigen Hinweise und Mahnungen bezüglich des Umgangs mit selbigen.

Dr. Anne Buschmann, Dr. Martin Eiden und **Dr. Christine Hoffmann** haben für mich ihre Freizeit geopfert, um diese Dissertation in einem sehr komprimierten Zeitraum auf inhaltliche und formale Verwirrungen zu überprüfen. Darüber hinaus hatten sie immer ein offenes Ohr für meine Fragen und waren zu Diskussionen bereit, auch wenn sie eigentlich keine Zeit hatten. Dafür danke ich ihnen sehr.

Dan Balkema danke ich für die zahllosen Male, in denen er den Fehlerteufel aus meinen englischen Texten vertrieben hat.

Darüber hinaus gebührt mein Dank allen **Kollegen des INNT** für das nette Arbeitsklima und die Unterstützung bei den vielen Kleinigkeiten des Arbeitsalltags.

Jule, die gar nicht wusste, was sie auslösen würde, als sie mich am Ostersonntag anrief: „Ich hab eine gute Nachricht für Dich...“, **Anja, Leila, Kerstin, Doro, Marc, Rolf, Andrea, Dirk, Franzi** und **Magnus** sowie **Anke, Christina, Carina, Annett** und **André** danke ich für ihre Freundschaft und die wunderbare Zeit zusammen.

Mein letzter und größter Dank gilt aber meiner **Familie**. Ohne ihre Liebe, ihre Unterstützung und ihr Vertrauen in mich wäre ich nicht an dem Punkt, an dem ich heute bin.