

„*Ex vivo*“ Replikation des pathogenen Prion Proteins

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

Vorgelegt von
Dipl. Biochem. Lars Heinig
geb. 29.4.1978 in Karl-Marx-Stadt, jetzt Chemnitz

Göttingen 2006

D7

Referent :

Koreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Oliver Einsle

Prof. Dr. Frauke Melchior

2.11.2006

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	Die Prion Hypothese	1
1.2	TSE-Erkrankungen	2
1.3	Die Molekularbiologie des Prion Proteins	5
1.4	Der zelluläre Zyklus des PrP	8
1.5	Mögliche Funktionen des PrP ^C	9
1.6	Modelle zur TSE-Detektierung	10
1.6.1	Tiermodelle zur Detektion von TSE-Erkrankungen	10
1.6.2	Zellkulturmodelle zur Detektion von TSE-Infektionen	12
1.7	Retroviren	13
1.8	Tetracyclin regulierte Proteinexpression	16
1.9	Aufgabenstellung	19
2	Materialien und Methoden	20
2.1	Molekulargenetische Methoden	20
2.1.1	DNA-Isolierung aus Blut	20
2.1.2	DNA-Isolierung aus Zellkulturen	20
2.1.3	DNA-Isolierung aus Gewebe	20
2.1.4	Plasmidisolierung aus transformierten Zellen	21
2.1.5	DNA-Amplifikation mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)	21
2.1.6	Reinigung von PCR-Produkten	23
2.1.7	Agarose-Gelelektrophorese	23
2.1.8	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	24
2.1.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	25
2.1.10	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	25
2.1.11	Dialyse von salzhaltigen Lösungen	26
2.1.12	Klonierung von DNA-Fragmenten	26
2.1.12.1	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	26
2.1.12.2	Ligation von DNA-Fragmenten über Restriktionsschnittstellen	26
2.1.12.3	TA-Klonierung von DNA-Fragmenten	27
2.1.12.4	Adenylierung von DNA-Fragmenten	28
2.1.13	Restriktionsfragment-Kartierung	28
2.1.14	DNA-Sequenzierung	28
2.2	Prokaryontische Techniken	30
2.2.1	Bakterienkultivierung	30
2.2.2	Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen	30
2.2.3	Transformation von <i>E. coli</i>	30
2.2.3.1	Herstellung elektro-kompetenter <i>E. coli</i>	31
2.2.3.2	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i>	31
2.2.3.3	Transformation elektro-kompetenter <i>E. coli</i>	31
2.2.3.4	Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i>	32
2.3	Eukaryontische Techniken	32
2.3.1	Kultivierung von eukaryontischen Zellen	32
2.3.2	Lebendzellzahlbestimmung von eukaryontischen Zellen	34
2.3.3	Herstellung transienter Zellen durch Micellen	34
2.3.4	Herstellung stabiler eukaryontischer Zellen durch Elektroporation	35
2.3.5	Retrovirale Transfektion eukaryontischer Zellen	35

2.4	Proteinbiochemische Methoden	36
2.4.1	Bestimmung der Transfektionseffektivität anhand der Luziferaseaktivität	36
2.4.2	Proteinextraktion aus „ <i>inclusion bodies</i> “ (IB)	36
2.4.2.1	Aufschluss der <i>E. coli</i> Zellen durch Ultraschall	36
2.4.2.2	Aufschluss der <i>E. coli</i> Zellen durch eine Retsch-Mühle	37
2.4.3	Proteinextraktion aus einer eukaryontischen Zelllinie durch Zellyse	37
2.4.4	Proteinbestimmung nach Bradford	38
2.4.5	Proteinkonzentrierung durch Ethanol-fällung	38
2.4.6	Proteinkonzentrierung durch Trichloressigsäure (TCA)	39
2.4.7	Zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese	39
2.4.8	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.4.9	Western Blot durch Elektrotransfer	41
2.4.10	Immundetektierung mit dem ECL-System	41
2.4.11	Coomassie-Blaufärbung von SDS Gelen	42
2.4.12	Ponceau-Rotfärbung von Nitrozellulosemembranen	43
2.4.13	Aufarbeitung von Gewebematerial	43
2.4.14	TSE-Infektion von eukaryontischen Zellen	43
2.4.15	Proteinase K (PK) Verdau von infizierten Proben	44
2.4.16	Trennung von PrP ^C und PrP ^{Sc} durch „ <i>immobilised metall affinity chromatography</i> “ (IMAC)	44
2.4.17	Solubilisierung von Proteinen	45
2.4.18	Fluoreszenzmikroskopie	45
2.4.19	Immunfluoreszenzmikroskopie von PrP ^C exprimierenden Zelllinien mit monoklonalen Antikörpern (mAK)	46
2.4.20	Durchflusszytometrie zur Detektion von PrP ^C und PrP ^{Sc}	46
2.4.21	Sekundärstrukturanalyse von Proteinen durch Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie	48
2.4.22	Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)	50
2.5	Materialien	51
2.5.1	Material	51
2.5.2	Antibiotika	51
2.5.3	Antikörper	51
2.5.4	Proteaseinhibitoren	52
2.5.5	Kulturmedien	52
2.5.6	Chemikalien	52
2.5.7	Medien	53
2.5.8	Lösungen	54
2.5.9	Ausgangsvektoren	57
3	Ergebnisse	62
3.1	„ <i>In vitro</i> “ Analyse des <i>prnp</i> Gens	62
3.1.1	Amplifikation des <i>prnp</i> Gens	62
3.1.2	Sequenzierung der speziesspezifischen Prion Proteine	63
3.2	Expression und Reinigung von rekombinanten PrP aus <i>E. coli</i>	66
3.3	Herstellung stabiler tTA-Expressionszelllinien	69
3.4	Herstellung doppelt stabiler PrP ^C exprimierender Zelllinien	75
3.4.1	Herstellung doppelt stabiler PrP ^C exprimierender Zelllinien durch Elektroporation	77
3.4.2	Retrovirale Herstellung doppelt stabiler PrP ^C exprimierender Zellklone	77

3.5	Western Blot Analyse der PrP ^C Expression in den verschiedenen Zelllinien	81
3.5.1	Detektionsminimum der PrP ^C Expression im WB	83
3.5.2	Tet-Abhängigkeit der PrP ^C Expression	83
3.5.3	Zeitabhängigkeit der PrP ^C Expression	84
3.5.4	PrP ^C Detektion in Zelllinien mit endogener PrP ^C Expression	85
3.6	Immunfluoreszenzanalyse der PrP ^C Expression	86
3.7	FACS Analyse der PrP ^C Expression	88
3.8	Sekundärstrukturanalyse durch die CD-Spektroskopie	89
3.9	Koexpression von PrP ^C und anderen Proteinen in einem reguliert PrP ^C exprimierenden PrP ^{0/0} Zellklon	93
3.10	Infektion der stabil PrP ^C exprimierenden Zelllinien	95
3.11	Etablierung des PK Verdaus	95
3.11.1	PK-Konzentrationsabhängigkeit des PK Verdaus	96
3.11.2	Zeitabhängigkeit des PK Verdaus	97
3.11.3	Detektion von PrP ^{Sc} in infizierten Zellkulturen	98
3.12	FACS Analyse der infizierten Zellklone	99
4	Diskussion	101
4.1	Expression und Detektion des rPrP in <i>E. coli</i>	101
4.2	Herstellung stabiler Zelllinien	102
4.2.1	Herstellung stabil tTA exprimierender Zelllinien	102
4.2.2	Herstellung doppelt stabiler PrP ^C exprimierender Zellen	103
4.3	PrP ^C Expressionsanalysen	103
4.3.1	PrP ^C Expressionsanalyse durch den WB	104
4.3.2	Immunfluoreszenzmikroskopie zur Detektion der PrP ^C Expression	105
4.3.3	PrP ^C Expressionsanalyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie	105
4.3.4	Sekundärstrukturanalyse mit Hilfe der CD-Spektroskopie	106
4.4	Ko- und Überexpression von Proteinen während der PrP ^C Expression	107
4.5	Infektion von reguliert PrP ^C exprimierenden Zellklonen	109
4.5.1	PrP ^{res} Nachweis durch den Western Blot	109
4.5.2	PrP ^{Sc} Nachweis mit Hilfe der Durchflusszytometrie	110
4.6	Mögliche Erweiterung des neu geschaffenen Systems	112
5	Zusammenfassung	114
6	Literatur	116
Anhang		
Danksagung		
Lebenslauf		

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1	Replikationsmodell des PrP ^{Sc}	1
Abb. 2	Histologischer Schnitt durch ein CJD geschädigtes Gehirn	2
Abb. 3	Epidemiologischer Zusammenhang von BSE und vCJD in England	4
Abb. 4	Auftreten von CWD in Nordamerika während der letzten 5 Jahre	5
Abb. 5	Zellmembran mit gebundenen PrP ^C	6
Abb. 6	Aufbau des murinen <i>prnp</i> Gens	7
Abb. 7	Aufbau des humanen <i>prnp</i> Gens	7
Abb. 8	Durch NMR Analyse bestätigte PrP ^C Sekundärstruktur	8
Abb. 9	Zwei vermutete PrP ^{Sc} Sekundärstrukturen, die noch nicht durch NMR Analyse bestätigt wurden	8
Abb. 10	Zellulärer Zyklus des PrP	9
Abb. 11	Schematischer Aufbau eines Retrovirus	14
Abb. 12	Genomstruktur der LTR-Region eines Retrovirus	14
Abb. 13	Replikationsmodell eines Retrovirus in der Zelle	15
Abb. 14	Strukturformel des Tetracyclins	16
Abb. 15	Regulation einer Proteinexpression durch das Tet-Off System am Beispiel des PrP	17
Abb. 16	pGEM-T Vektor	57
Abb. 17	pCMV/Bsd Vektor	58
Abb. 18	pTet-Off Vektor	58
Abb. 19	pTRE-FU Vektor	59
Abb. 20	pBI-EGFP Vektor	59
Abb. 21	pRev-TRE Vektor	60
Abb. 22	pUC19 Vektor	60
Abb. 23	pGL3 Vektor	61
Abb. 24	PCR-Amplifikate der verschiedenen <i>prnp</i> Fragmente auf einem 1%igen (w/v) Agarosegel	63
Abb. 25	BSA-Eichkurve in H ₂ O	66
Abb. 26	Expression der verschiedenen rPrP in <i>E. coli</i>	67
Abb. 27	Verschiedene Methoden der IB Reinigung des rfPrP aus <i>E. coli</i>	68
Abb. 28	Modifizierte Aufreinigung des rfPrP durch Ultraschall	68
Abb. 29	Klonierungsschema des pCMV/Bsd Tet-Off Vektors	70
Abb. 30	Strukturformel des Blastocidin	70
Abb. 31	Blasticidinresistenzkurven der verschiedenen Zelllinien	71
Abb. 32	Optimierung der Transfektionseffizienz	73
Abb. 33	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Zelllinien	74
Abb. 34	Mycoplasmentest-PCR	75
Abb. 35	Strukturformel des Hygromycins	76

Abb. 36	Hygromycinresistenz der verschiedenen Zellklone	76
Abb. 37	Klonierung des pTRE-FU Vektors mit Insert	78
Abb. 38	Stabile Transfektion durch Elektroporation	78
Abb. 39	Klonierung des retroviralen Expressionsvektors	79
Abb. 40	Stabile Transfektion durch Retroviren	80
Abb. 41	Proteinbestimmung von BSA im E1A-Lysepuffer	82
Abb. 42	WB Klonselktion der PrP ^{0/0} Zelllinie	82
Abb. 43	PrP ^C Detektionsminimum des C1 Klons	83
Abb. 44	Tet-Abhängigkeit des C1 Klons	84
Abb. 45	Zeitabhängige PrP ^C Expression des C1 Klons	84
Abb. 46	WB des selektierten Klons der 3T3 Zelllinie	85
Abb. 47	WB des selektierten Klons der N2a Zelllinie	85
Abb. 48	Immunfluoreszenzmikroskopie der verschiedenen PrP ^C exprimierenden Zellklone	86/87
Abb. 49	FACS Analyse der PrP ^C Expression	88
Abb. 50	WB der IMAC des nicht infizierten C1 Klons	90
Abb. 51	CD-Spektren der IMAC-Proben	91/92
Abb. 52	2D-Gel der PrP ^{0/0} Zellklone	93
Abb. 53	Infektion einer Zelllinie mit TSE	95
Abb. 54	Detektion von PrP ^{res} im PK abhängigen Verdau	96
Abb. 55	Detektion von PrP ^{res} im zeitabhängigen PK Verdau	97
Abb. 56	PK Verdau der verschiedenen Zellklone nach BSE-Infektion	98
Abb. 57	FACS Analyse der Zellklone	99
Abb. 58	Detektionsmöglichkeiten des Prion Proteins	103
Abb. 59	Schema der Erweiterung des bisher etablierten Zellmodells	113

Tabellenverzeichnis:

Tab. 1	TSE-Erkrankungen in verschiedenen Organismen	3
Tab. 2	Verwendete Restriktionsendonukleasen	24
Tab. 3	Eigenschaften des Bakterienstamms	30
Tab. 4	Verwendete Zelllinien	33
Tab. 5	Negativkontrollen der FACS Messung	48
Tab. 6	Primer zur Amplifikation des <i>prnp</i> Gens	62
Tab. 7	Sequenzprimer für den pGEM-T Vektor	64
Tab. 8	Aminosäuresequenzvergleich der speziesspezifischen Prion Proteine	65
Tab. 9	Verhältnis der DNA zu den Transfektions-Agenzien	72
Tab. 10	Hergestellte stabile regulierbare PrP ^C exprimierende Zellklone	81
Tab. 11	Zusammenfassung der identifizierten Proteine in der Massenspektrometrie	94

Abkürzungsverzeichnis:

%	Prozent
Ω	Ohm
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μF	Mikrofarad
μl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ad	„ <i>adjust</i> “
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Circulardichroismus
cfu	„ <i>colony forming units</i> “
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
cm	Zentimeter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Natriumdeoxycholat
DPZ	Deutsches Primatenzentrum
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„ <i>enhanced chemiluminescence</i> “
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	„ <i>enhanced green fluorescent protein</i> “
ER	endoplasmatisches Reticulum
<i>et al.</i>	„ <i>et alii</i> “
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
g	Fallbeschleunigung
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
gr.	große
GSS	Gerstmann-Sträusler-Scheinker Syndrom
h	Stunden
H ₂ O _{bid}	Bidestilliertes Wasser
HRP	Meerrettichperoxidase

Hz	Hertz
IB	„ <i>inclusion bodies</i> “
IEF	isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria Bertani
Lsg.	Lösung
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MOI	„ <i>multiplicity of infection</i> “
MPBST	5 % (w/v) Milchpulver in PBST
ng	Nanogramm
NZM	Nitrozellulosemembran
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBST	0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS
pH	pH-Wert
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PrP ^C	zelluläres Prion Protein
PrP ^{res}	degradiertes PrP ^{Sc}
PrP ^{Sc}	pathogenes Prion Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Rt	reverse Transkriptase
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N,N – Tetramethylethylenediamin

Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
U	Unit
V	Volt
v/v	Volumenprozent
Vh	Voltstunden
w/v	Massenprozent
WB	Western Blot
Wdh.	Wiederholung
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Aminosäurenabkürzungen

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

Nukleinsäurenabkürzungen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin

T	Thymin
dATP	Desoxyriboadenosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure

1 Einleitung

1.1 Die Prion Hypothese

Prion steht für „*proteinaceous infections particle*“ und ist laut der „*protein-only hypothesis*“ (Prusiner, 1982) das infektiöse Agens der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE). Die TSE-Erkrankungen werden durch eine Konformationsänderung einer apathogenen zellulären Isoform (PrP^{C}) in eine pathogene Isoform (PrP^{Sc}) verursacht. Sc steht dabei für Scrapie, da eine TSE-Erkrankung zuerst bei Schafen beobachtet wurde (Deslys *et al.*, 2001). Diese Konformationsänderung kann entweder spontan oder induziert durch exogenes PrP^{Sc} erfolgen. Dabei kommt es zur Anlagerung von PrP^{Sc} an PrP^{C} (McKinley *et al.*, 1983; Eigen, 1996). Ein Modell der induzierten Konformationsänderung ist in der Abb. 1 dargestellt.

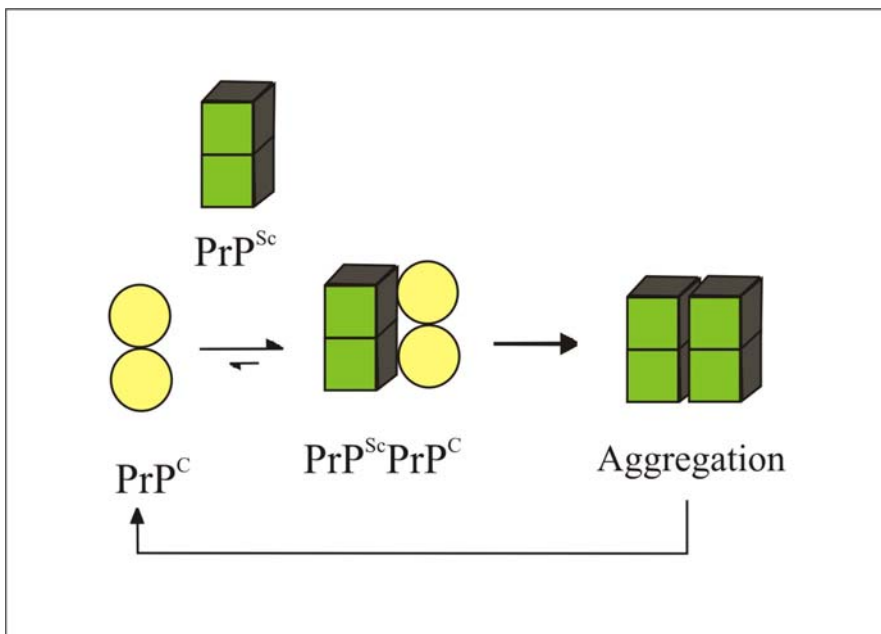


Abb. 1 Replikationsmodell des PrP^{Sc} Durch Bindung des PrP^{Sc} an das PrP^{C} wird ein $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-PrP}^{\text{Sc}}$ Intermediat gebildet, dieses bewirkt eine Konformationsänderung des PrP^{C} . Dadurch entsteht ein neues PrP^{Sc} , das zur Aggregation mit anderen PrP^{Sc} neigt (nach Jarrett *et al.*, 1993).

Durch die partielle Resistenz von PrP^{Sc} gegenüber zellulären Proteasen (Mitsuiki *et al.*, 2006) reichert sich die pathogene Isoform im Gewebe an. Besonders häufig tritt dies im zentralen Nervensystem auf, wo es zu einer Akkumulation kommt, die dann zur Bildung von Plaques führt, dargestellt in der Abb. 2. Ein Faktor X ist nach einigen Theorien eventuell mit an der Bildung von Plaques beteiligt (Telling *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997). Allerdings wird diese Theorie nicht von allen Wissenschaftlern geteilt.

Andere Forscher sind der Überzeugung, dass Nukleinsäuren (Akowitz *et al.*, 1994) oder Viren (Diringer *et al.*, 1988; Narang, 1996) für die TSE-Erkrankungen verantwortlich sind. Dagegen spricht aber, dass das infektiöse Agens gegen UV (Safar *et al.*, 2005), ionisierende Strahlung (Gibbs *et al.*, 1978), hohe Temperaturen (Brown *et al.*, 2000) sowie gegen chemische und physikalische Einflüsse (Bellinger-Kawahara *et al.*, 1987) resistent ist.

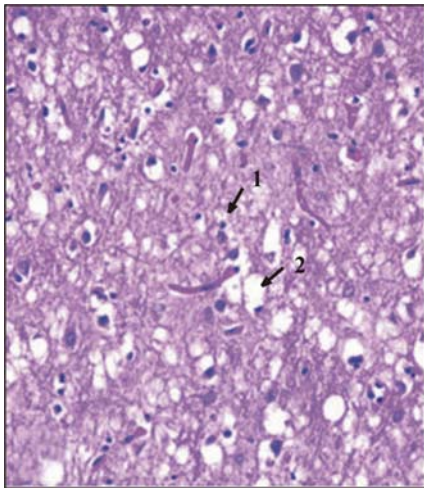


Abb. 2 Histologischer Schnitt durch ein CJD geschädigtes Gehirn
Mit 1) Plaques und 2) Löcher im Hirngewebe (nach Safar *et al.*, 2005).

1.2 TSE-Erkrankungen

Die TSE-Erkrankungen wirken sich vor allem im Gehirn der betroffenen Organismen aus. Dabei kommt es zur Ausbildung eines durchlöcherten schwammartigen Zellgewebes mit amyloiden Proteinablagerungen, den Plaques. Diese sind allerdings erst nach einer histologischen „*post mortem*“ Analyse zu beobachten. So können TSE-Erkrankungen beim Menschen gegenüber anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z. B. der amyotrophischen Lateralsklerose (ALS), abgegrenzt werden (Dupuis *et al.*, 2002). Bei einer „*ante mortem*“ Differentialdiagnose, die auf Verhaltensauffälligkeiten und Bewegungsataxien beruht (Wilesmith *et al.*, 1988), ist dies nicht möglich. Die verschiedenen bekannten TSE-Erkrankungen sind in der Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1 TSE-Erkrankungen in verschiedenen Organismen

TSE-Erkrankung	Auftreten	Literatur
Creutzfeldt-Jakob Erkrankung (CJD)	Mensch	Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921
Neue Variante von CJD (vCJD)	Mensch	Britton <i>et al.</i> , 1995
Fatale Familiäre Insomnia (FFI)	Mensch	Lugaresi <i>et al.</i> , 1986
Gerstmann-Sträusler-Scheinker Syndrom (GSS)	Mensch	Gerstmann <i>et al.</i> , 1928
Kuru	Mensch	Gajdusek <i>et al.</i> , 1957
Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)	Rind	Wells <i>et al.</i> , 1987
Chronic Wasting disease (CWD)	Elch, Weisswedelhirsch	Williams <i>et al.</i> , 1980 und 1982
Exotic Ungulate Encephalopathie (EUE)	Kudu	Cunningham <i>et al.</i> , 1993
Feline Spongiforme Encephalopathie (FSE)	Katze	Wyatt <i>et al.</i> , 1991
Traberkrankheit / Scrapie	Schaf, Ziege	Parry <i>et al.</i> , 1983
Transmissible Mink Encephalopathie (TME)	Nerz	Hartsough <i>et al.</i> , 1965

Das große Interesse an TSE-Erkrankungen begann Mitte der 90-ziger Jahre des letzten Jahrhunderts, als eine neue Variante von CJD (vCJD) auftrat. Diese Variante unterscheidet sich von CJD durch die geringe Inkubationszeit von nur einigen Monaten bis zu wenigen Jahren (Zeidler *et al.*, 1997). Ansonsten zeigten sie typische Ablagerungserscheinungen wie sie nur selten in CJD vorkommen, sie hatten aber untereinander ein fast identisches histopatologisches Muster. Deshalb führte man ein „strain typing“ ein, um diese Variante vom bekannten CJD Krankheitsablauf abzugrenzen. Die ersten Fälle von vCJD traten in England und später auch im restlichen Europa auf. Das Auftreten dieser Variante ist in Verbindung mit dem Verzehr von BSE infiziertem Rindfleisch zu sehen. In der Abb. 3 ist der epidemiologische Zusammenhang von BSE mit dem Auftreten von vCJD in England dargestellt.

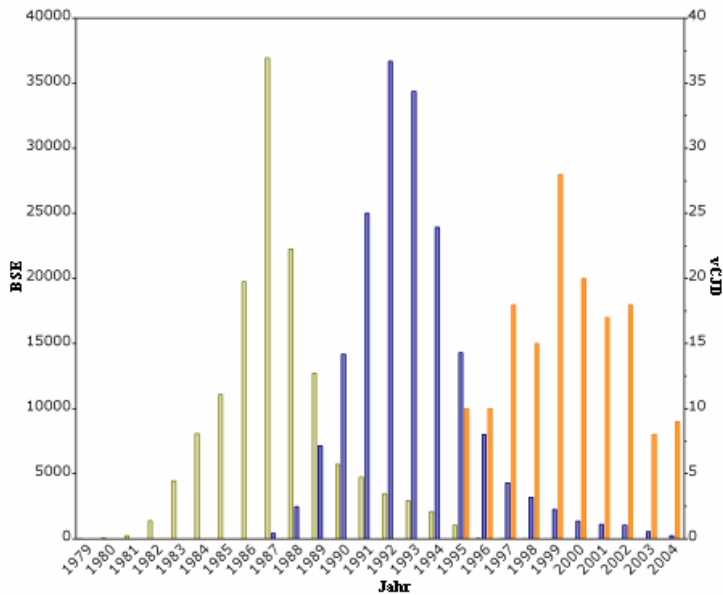


Abb. 3 Epidemiologischer Zusammenhang von BSE und vCJD in England Dargestellt ist (■) das Geburtsjahr der BSE-Tiere, (■) die BSE-Fälle in Rindern und (■) die aufgetretenen Fälle von vCJD im Menschen (nach Public Health Agency of Canada, 2006).

Die Abb. 3 zeigt, dass die ersten Fälle von vCJD 1995, also 8 Jahre nach der Identifizierung von BSE in Rindern auftraten. Außerdem, dass die Rinder nicht einmal 8 Jahre alt waren, als sie Anzeichen der Krankheit zeigten. Weiterhin ist zu erkennen, dass seit 1992 die Anzahl der Rinder mit BSE-Infektionen deutlich abgenommen hat. Dementsprechend ist auch die Anzahl der erkrankten Personen mit einem zeitlichen Abstand von 8 Jahren danach ebenfalls gesunken. Dies ist vermutlich auf strengere Kontrollen von Rinderprodukten seit dem Erkennen von BSE und seinen Auswirkungen zurückzuführen.

Seit Beginn des 21. Jahrhunderts gibt es einen neuen, durch Prionen hervorgerufenen TSE-Ausbruch. Dieses Mal allerdings nicht von BSE in Europa, sondern von CWD in Nordamerika. Von CWD sind sowohl Wild- als auch Zuchtpopulationen der Cerviden betroffen. Da noch nicht zweifelsfrei bewiesen ist, dass CWD auf den Menschen übertragbar ist, sind mögliche Folgeerscheinungen noch nicht abzuschätzen. Im Besonderen gilt dies für die nordamerikanischen Ureinwohner in den betroffenen Regionen durch ihren höheren Wildfleischverzehr. Die Abb. 4 zeigt die epidemieartige Vermehrung von CWD in Nordamerika seit 2002.

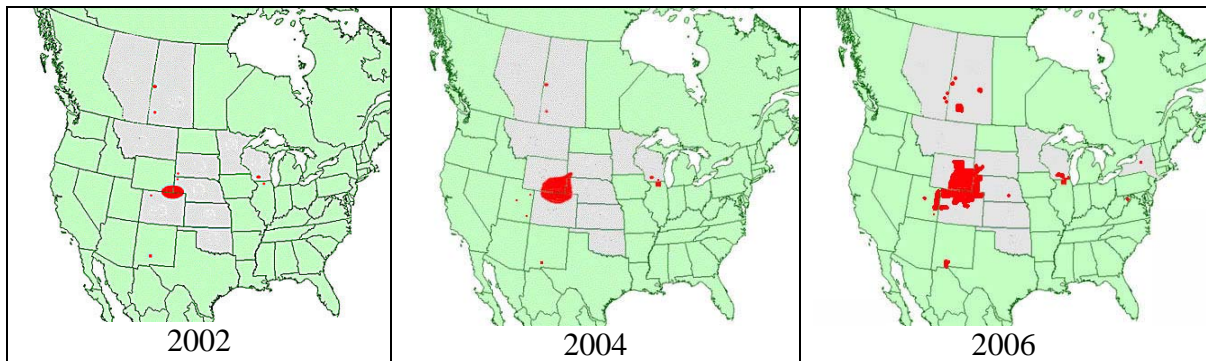


Abb. 4 Auftreten von CWD in Nordamerika während der letzten 5 Jahre Dargestellt sind (●) die infizierten Wildpopulationen und (■) die infizierten Zuchtpopulationen (nach CWD Alliance, 2006).

Aus der Abb. 4 ist zu erkennen, dass sich CWD von wenigen Fällen im Herzen Nordamerikas, zu einer Epidemie auf dem Kontinent entwickelt hat. Dabei hat sowohl die Zahl der infizierten Wild- als auch die der Zuchtpopulationen zugenommen. Zurückzuführen ist dies wahrscheinlich darauf, dass im Gegensatz zu BSE diese Krankheit vor allem durch den Speichel übertragen wird (Miller *et al.*, 2004; Belay *et al.*, 2004).

1.3 Die Molekularbiologie des Prion Proteins

Das PrP^C ist ein extrazelluläres Glykoprotein. Es besitzt eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen an Position 179 und 214 (Safar *et al.*, 1990). An den Positionen 51 bis 90 befinden sich fünf hintereinander liegende hoch konservierte glycin- und prolinreiche Oktapeptidsequenzen (Oktarepeats). Diese sind in der Lage zweiwertige Ionen, besonders Kupferionen, zu binden (Thompsett *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006). Von diesen Oktarepeats sind aber nur vier zur Komplexbildung fähig, da am fünften Oktarepeat ein Histidin fehlt (Burns *et al.*, 2005). Vor diesen Sequenzen befindet sich die Signalsequenz des PrP^C. Über einen Serinrest ist es an der Position 231 an der Zellmembran durch einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) gebunden (Stahl *et al.*, 1987). Dort wird es in drei verschiedenen Glykosylierungsformen präsentiert (Endo *et al.*, 1989). Das membrangebundene PrP^C ist in der Abb. 5 dargestellt.

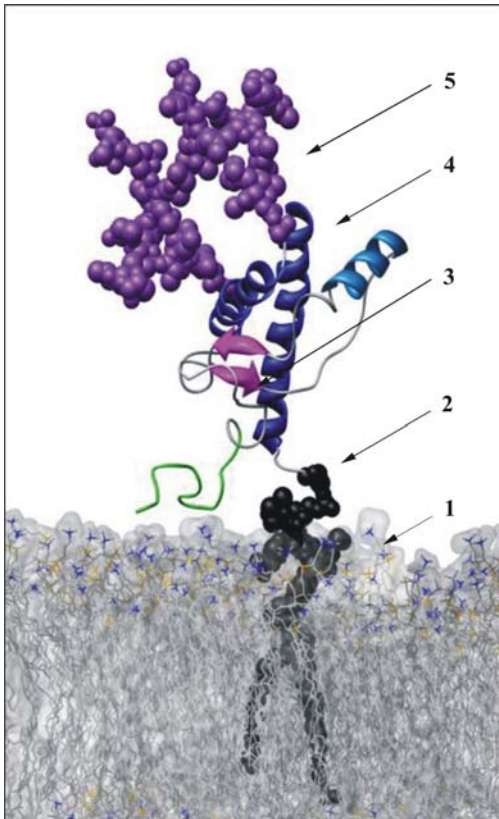


Abb. 5 Zellmembran mit gebundenen PrP^C
 Dargestellt ist das PrP^C mit 1) Zellmembran, 2) einem GPI-Anker, 3) zwei antiparallelen β -Faltblättern, 4) drei α -Helices und 5) zwei Glykosylierungen (nach DeMarco *et al.*, 2005).

Mit Hilfe des Western Blots (WB) kann die un-, mono- und diglykosylierte Form nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht des PrP^C variiert zwischen 25 kDa und 37 kDa, in Abhängigkeit von der jeweiligen Spezies und deren Glykosylierungsstufe (Caughey *et al.*, 1989; Bolton *et al.*, 1985; Endo *et al.*, 1989). Ansonsten unterscheidet sich das PrP^C vieler Spezies in nur wenigen Aminosäuren voneinander. Die Homologie beträgt bei Säugern zwischen 85 % und 97 % (Gabriel *et al.*, 1992). Zwischen Primaten und dem Menschen betragen die Gemeinsamkeiten sogar 92,9 % bis 99,6 % (Schatzl *et al.*, 1995). Das PrP^C kommt bei Säugetieren (Wu *et al.*, 2006; Windl *et al.*, 1995), Vögeln (Gabriel *et al.*, 1992), Reptilien (Simonic *et al.*, 2000), Fischen (Oidtmann *et al.*, 2003; Cotto *et al.*, 2005) und sogar in der Hefe (*S. cerevisiae*; Scheibel, 2004) vor. Daher kann man sagen, dass es ein evolutionäres hochkonserviertes Protein ist. Das Gen des PrP wird als *prnp* bezeichnet, wobei das für das Protein kodierende offene Leseraster („*open reading frame*“, ORF) in nur einem Exon lokalisiert ist (Basler *et al.*, 1986; Prusiner, 1991). Das *prnp* Gen besteht bei vielen Organismen, wie z. B. der Maus, der Ratte, dem Schaf und dem Rind, aus drei Exons und zwei Introns (Basler *et al.*, 1986), dargestellt in der Abb. 6. Die Länge des *prnp* ORF ist dabei

speziesspezifisch und variiert zwischen 759 bp und 789 bp. Beim Menschen befindet sich das *prnp* Gen auf dem Chromosom Nr. 20 und besteht aus zwei Exons, dargestellt in der Abb. 7 (Chesebro *et al.*, 1985; Oesch *et al.*, 1985). Die Expression des PrP^C konnte beim Menschen besonders in den Zellen des Nerven- (Moudjou *et al.*, 2001; Ford *et al.*, 2002) und des Immunsystems (Prinz *et al.*, 2003) nachgewiesen werden.

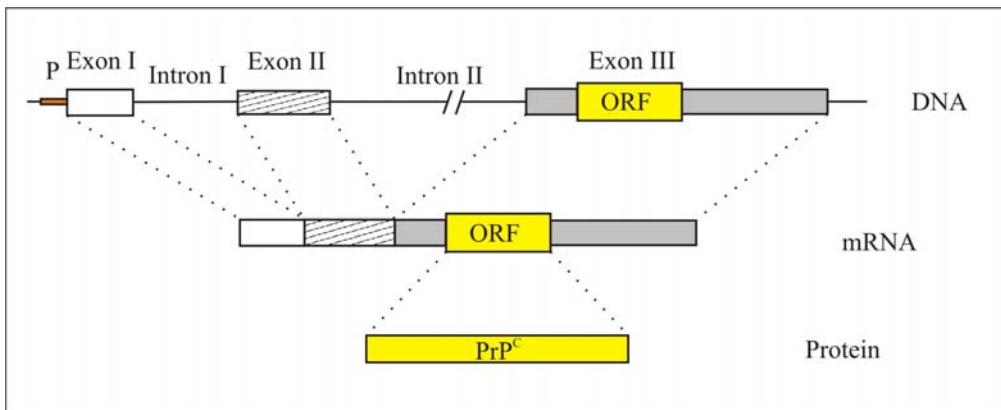


Abb. 6 Aufbau des murinen *prnp* Gens Das murine *prnp* Gen enthält drei Exons und zwei Introns. Der Promotor (P) befindet sich vor dem ersten Exon und das ORF im dritten Exon.

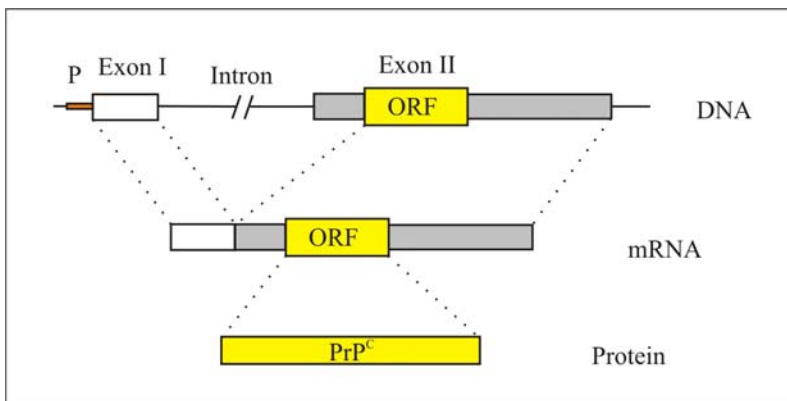


Abb. 7 Aufbau des humanen *prnp* Gens Das humane *prnp* Gen enthält zwei Exons und ein Intron. Der Promotor (P) befindet sich vor dem ersten Exon und das ORF im zweiten Exon.

Das PrP^C besteht aus drei α -Helices und zwei antiparallelen β -Faltblättern (Riek *et al.*, 1996), dargestellt in der Abb. 8. Diese Isoform bindet Kupfer, ist nicht Proteinase K (PK) resistent und nicht pathogen. Dagegen besitzt das PrP^{Sc} einen erhöhten β -Faltblattanteil, bindet kein Kupfer, ist pathogen und PK resistent. Das PrP^{Sc} neigt zur Aggregation und bildet Fibrillen, die so genannten „*scrapie associated fibrils*“ (SAF). Die 3D Struktur des PrP^C ist durch NMR Analyse bestätigt worden. Vom PrP^{Sc} dagegen, gibt es bisher keine bestätigte NMR Struktur, sondern nur verschiedene Computermodelle, diese sind dargestellt in der Abb. 9.

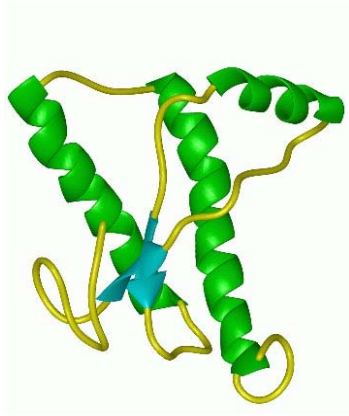


Abb. 8 Durch NMR Analyse bestätigte PrP^C Sekundärstruktur (nach Riek *et al.*, 1996)

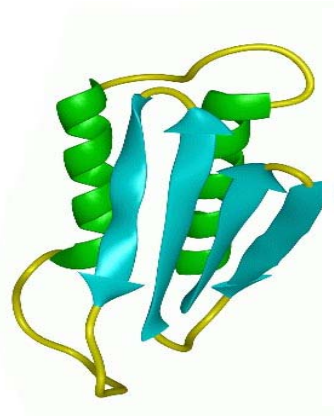
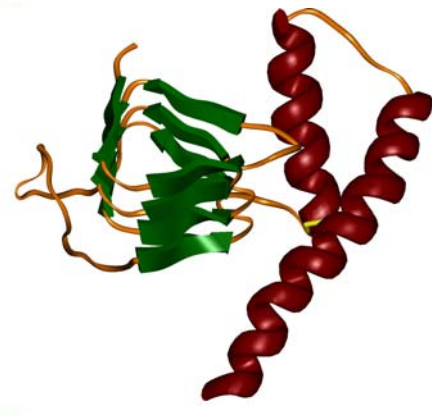


Abb. 9 Zwei vermutete noch nicht durch NMR Analyse bestätigte PrP^{Sc} Sekundärstrukturen (nach Riek *et al.*, 1996 (links); Cohen, 2006 (rechts))



Aufgrund der unterschiedlichen molekularen Eigenschaften ist eine Unterscheidung der beiden Isoformen anhand einer Sekundärstrukturanalyse durch eine CD-Spektroskopie möglich (Ziegler *et al.*, 2003; Leffers *et al.*, 2004). Ebenso durch einen WB, bei dem die beiden Isoformen vor und nach dem PK Verdau miteinander verglichen werden können. Denn nach dem PK Verdau ist kein PrP^C mehr zu detektieren, dagegen ist die degradierte Form des PrP^{Sc} als PrP^{res} erkennbar. Diese liegt wie das PrP^C in drei verschiedenen Glykosylierungsformen vor, besitzt aber aufgrund des partiellen Verdaus durch die PK ein geringeres Molekulargewicht, da nur die ersten 60 Aminosäuren abgebaut werden (Jendroska *et al.*, 1991).

1.4 Der zelluläre Zyklus des PrP

Das PrP^C durchläuft in der Zelle einen Zyklus, nachdem es am Endoplasmischen Reticulum (ER) gebildet wird. Zuerst erfolgen einige posttranslationale Modifikationen am rauen ER und im Golgi-Apparat. Das sind die Glykosylierungen, die Anheftung des Sialinsäurerestes und die Ausbildung der Disulfidbrücke. Danach gelangt das PrP^C an die Zelloberfläche, wo es über den Serinrest mit einem GPI-Anker verbunden und in allen drei Glykosylierungsstufen präsentiert wird. Durch den Membranfluss bleibt es allerdings nicht dauerhaft an der Membranoberfläche. Besonders angereichert findet man das PrP^C in den so genannten Rafts (Vey *et al.*, 1996; Taraboulos *et al.*, 1995), diese sind sphingolipid- und cholesterolreiche Membrandomänen und sind mitverantwortlich für die Endozytose, die hier besonders häufig stattfindet. Wahrscheinlich haben die Rafts ebenfalls einen Anteil an der

Konformationsänderung des PrP^C (Rogers *et al.*, 1993; Lehmann *et al.*, 1997). Sowohl das PrP^C als auch das PrP^{Sc} wandert zu den Endosomen und den Lysosomen, wo nur das PrP^C abgebaut wird (Nuziante *et al.*, 2003). In der Abb. 10 ist der zelluläre Zyklus des PrP dargestellt.

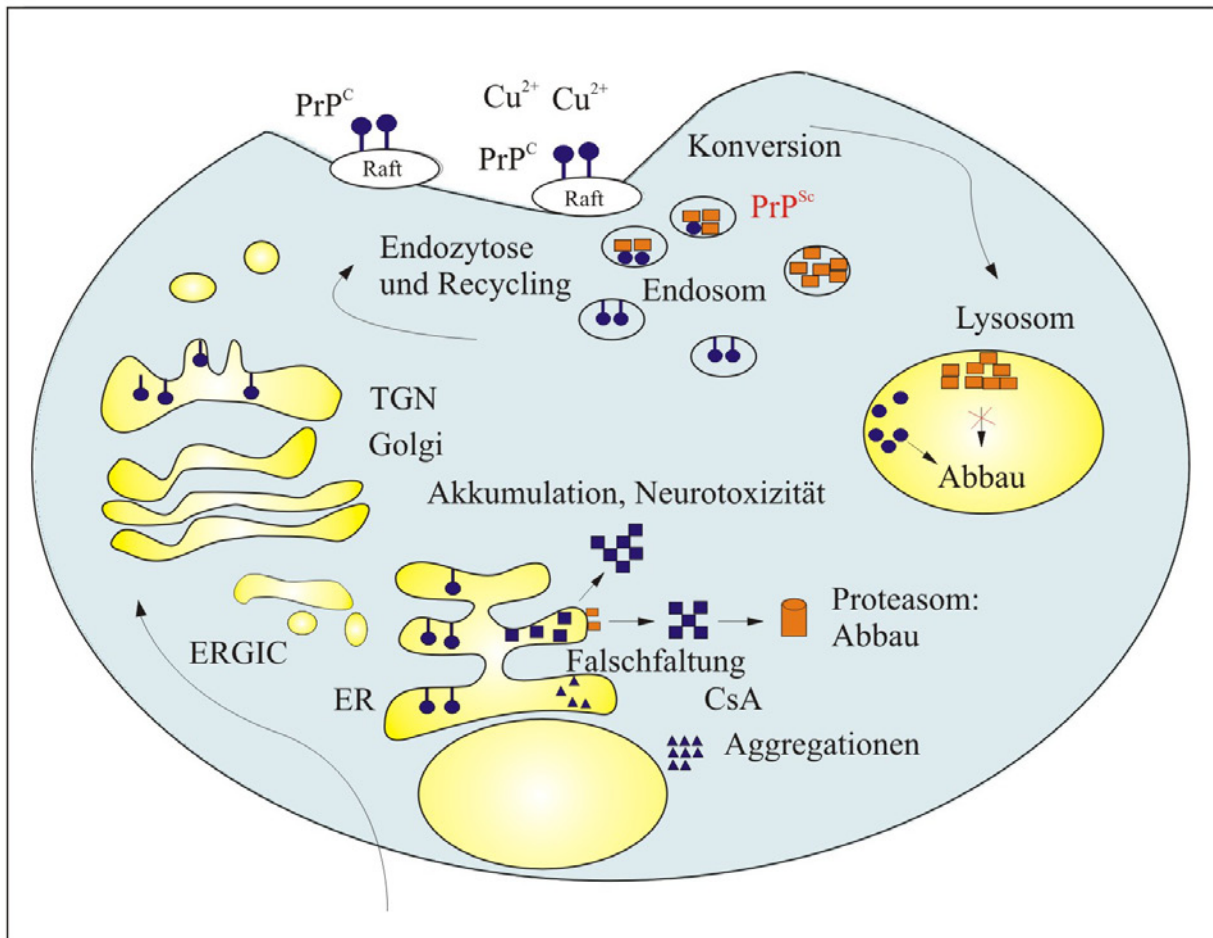


Abb. 10 Zellulärer Zyklus des PrP Die Synthese des zellulären PrP (●) erfolgt am Endoplasmischen Reticulum (ER). Nach weiteren Modifikationen am ER-Golgi-Intermediate-Kompartiment (ERGIC) und dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) wird das PrP^C an der Zelloberfläche präsentiert. Durch Endozytose an den Rafts wird das PrP aufgenommen und in die pathogene Isoform PrP^{Sc} (■) umgewandelt. Über die Endosomen gelangen die PrP Isoformen in die Lysosomen, wo das PrP^C, nicht aber das PrP^{Sc} abgebaut wird. Andere nicht pathogene PrP Isoformen können durch Fehlfaltungen entstehen (■), diese werden aber abgebaut. Ebenso können sich PrP^C Aggregate (▲) durch Zugabe von Cyclosporin A (CsA) bilden (nach Nuziante *et al.*, 2003).

1.5 Mögliche Funktionen des PrP^C

Die Funktion des zellulären PrP^C ist, trotz intensiver Bemühungen verschiedener Arbeitsgruppen bis heute noch nicht geklärt. Das Prion Protein ist ein hoch konserviertes Protein. Das deutet darauf hin, dass seine Funktion zu einem frühen evolutionären Zeitpunkt festgelegt wurde (Lupi *et al.*, 2006). Zur Klärung der Funktion des PrP^C wurden PrP „knock-out“ Mäuse hergestellt, diese zeigten keine atypischen Verhaltensweisen oder

Funktionsstörungen (Bueler *et al.*, 1992). Die Lebensdauer der Purkinje Zellen im Hirn war, im Gegensatz zu ihren Wildtyp Artverwandten, in diesen Mäusen etwas verringert (Sakaguchi *et al.*, 1996; Flechsig *et al.*, 2003).

Dem PrP^C werden verschiedene Funktionen zugeschrieben, unter anderem soll es bei den Schlafzyklen der Maus eine Rolle spielen (Tobler *et al.*, 1996). Eine Beteiligung an der Beseitigung von oxidativem Stress (Brown *et al.*, 1998) und damit zusammenhängenden Alterungsprozessen wird dem PrP^C ebenfalls zugeordnet. Da PrP^C in der Lage ist, Kupferionen zu binden, wird ihm eine Rolle im Kupfermetabolismus zugeschrieben (Kramer *et al.*, 2001). Außerdem wird ein Zusammenhang mit Viren, wie z.B. dem HIV, nicht ausgeschlossen (Gabus *et al.*, 2001; Leblanc *et al.*, 2004). Das PrP^C spielt laut neusten Erkenntnissen ebenso eine Rolle bei der Immunabwehr (Heppner *et al.*, 2004; Aguzzi, 2006).

Durch die Art der PrP^{Sc} Akkumulation wird ein Zusammenhang mit anderen amyloiden Proteinablagerungen nicht ausgeschlossen (Stewart *et al.*, 2005). Dazu gehören vor allem die neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer (Brown *et al.*, 2004), Chorea Huntington (Bertram *et al.*, 2005) und Parkinson (Bonifati *et al.*, 2006).

1.6 Modelle zur TSE-Detektierung

Seit ca. 50 Jahren werden Tiermodelle zur Untersuchung und Charakterisierung von TSE-Erkrankungen genutzt. Erst in den letzten 5 Jahren wurden verstärkt Zellkulturmodelle zur Untersuchung dieser Erkrankungen entwickelt.

1.6.1 Tiermodelle zur Detektion von TSE-Erkrankungen

Zur Untersuchung von Krankheiten wird in der Medizin häufig auf ein Tiermodell zurückgegriffen. Erst nachdem im Tiermodell Medikamente gegen Krankheiten getestet wurden, können diese auf den Menschen angewendet werden. Allerdings bieten diese Tiermodelle viele Fehlerquellen. Nur durch die Erprobung am Menschen in klinischen Studien können diese erkannt bzw. festgestellt werden. So erkrankten Probanden erst kürzlich bei Medikamententests der Firma Parexel (Rosenthal, 2006) in England.

Angewandte Tiermodelle in der Prionenforschung sind das Schaf-, Schweine-, und Rindermodell, diese ergaben sich aus den historischen Zusammenhängen des Auftretens der TSE-Erkrankungen. Allerdings sind die Modelle vom Affen, der Maus, der Ratte und des Hamsters, die heute am häufigsten angewandten. Als Affenmodelle werden dabei heute nur noch die nicht-humanen Primaten verwendet. Vertreter dieser Gruppe sind die Javaneraffen

(*Macaca mulatta*, Marcos *et al.*, 2005), die Totenkopffaffen (*Saimiri sciureus*, March *et al.*, 2005) und die Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*, Baker *et al.*, 1998). Im Moment werden Javaneraffen, am DPZ, im Rahmen eines EU-Verbundprojektes für eine Übertragungsstudie von BSE auf Primaten und einer damit zusammenhängenden Risikoabschätzung der Übertragbarkeit auf den Menschen genutzt (Lasmezas *et al.*, 2005).

Ebenso werden nicht humane Primaten (Marsh *et al.*, 2005) und transgene Mäuse für CWD Transfektionsexperimente benutzt (Browning *et al.*, 2004). Weitere Übertragungsexperimente wurden mit Schimpansen durchgeführt. Dabei wurde Kuru (Gajdusek *et al.*, 1966) genauso wie CJD (Gibbs *et al.*, 1968), durch die Ähnlichkeit der Auswirkungen von Kuru und Scrapie (Hadlow, 1959), auf Schimpansen übertragen. Dieses Modell wird heute aus ethischen Gründen aufgrund der Artverwandtschaft der Menschenaffen zum Menschen nicht mehr angewandt.

Die Übertragbarkeit von TSE-Erkrankungen wurde zuerst bei Schafen beobachtet. Dabei wurde festgestellt, dass Scrapie in Schafen auftritt und auf andere Schafe übertragen werden konnte (Cuillé *et al.*, 1936). Danach wurde entdeckt, dass es auch auf Mäuse übertragbar war (Chandler, 1961). Im Mausmodell wurde ebenfalls die Übertragbarkeit von Scrapie aus Schaf (Hadlow *et al.*, 1982; Foster *et al.*, 1993) und Ziege gezeigt (Hadlow *et al.*, 1980). Da in England Mitte der 80-ziger Jahre des letzten Jahrhunderts Übertragungen von BSE bei Rindern auftraten, wurden diese ebenfalls im Wildtyp-Mausmodell untersucht (Wilesmith *et al.*, 1991; Weissmann *et al.*, 1994). Auch wurde eine Übertragbarkeit auf Schweine gezeigt (Dawson *et al.*, 1990; Wells *et al.*, 2003).

Das Hamstermodell hingegen wurde vor allem zur Bestimmung der infektiösen Dosis des TSE-Agens benutzt (Prusiner *et al.*, 1980; Dawson *et al.*, 1991). Zur Klärung der Funktion des PrP^C werden heute aber vor allem transgene Mausmodelle eingesetzt (Weissmann *et al.*, 1993; Kretzschmar *et al.*, 1997; Biasimi *et al.*, 2006).

Die durch den hohen Pflegeaufwand teuren Tiermodelle haben alle den Nachteil, dass die Resultate von Infektionsexperimenten erst nach langer Inkubationszeit zur Verfügung stehen. Dabei bleibt unklar, ob die experimentellen Bedingungen denen einer natürlichen Infektion entsprechen. Da es zum einen die Möglichkeit der intracerebralen Infektion gibt (Foster *et al.*, 1994; Wells *et al.*, 2004) und zum anderen die der Oral (Wells *et al.*, 1994; Foster *et al.*, 2001). Der Nachteil dieser beiden Infektionsmöglichkeiten ist, dass das Tier bei der intracerebralen Inokulation den chirurgischen Eingriff eventuell nicht überlebt und bei der oralen Infektion, dass das infektiöse Agens oft nur unvollständig aufgenommen wird.

1.6.2 Zellkulturmodelle zur Detektion von TSE-Infektionen

Der Vorteil des Zellkulturmodells gegenüber dem Tiermodell liegt vor allem in der schnelleren PrP^{Sc} Detektion durch kürzere Inkubationszeiten. Die PrP^{Sc} Detektion ist in diesen Modellen um ein bis zwei Zehnerpotenzen sensitiver und ist durch unbegrenzte Verfügbarkeit an Zellmaterial schnell zu wiederholen.

Bei den verwendeten Zelllinien wird entweder das zelleigene PrP^C oder ein durch Transfektion eingeschleustes exogenes PrP^C stabil überexprimiert. Eine Überexpression des PrP^C ist notwendig, da durch PrP^{Sc} nur ein geringer Teil des PrP^C zu einer Konformationsänderung angeregt wird (Brandner *et al.*, 1996; Blattler *et al.*, 1997). Die so entstehende PrP^{Sc} Konzentration ist in nicht modifizierten Zellen zu gering, um durch einen PK Verdau nachgewiesen werden zu können. Durch eine erhöhte PrP^C Konzentration allerdings, wird das Reaktionsgleichgewicht in Richtung PrP^{Sc} verschoben (Come *et al.*, 1993).



Zu den verwendeten Zelllinien, die das endogene PrP^C überexprimieren, gehören die N2a Zellen (Bosque *et al.*, 2000; Enari *et al.*, 2001), die Smb Zellen (Birkettl *et al.*, 2001; Kanu *et al.*, 2002), die Rov Zellen (Sabuncu *et al.*, 2003; Paquet *et al.*, 2004), die 3T3 L1 Tet-Off Zellen (Stuke *et al.*, 2005), die Astrocyten (Cronier *et al.*, 2004), die HEK293 Zellen (Satoh *et al.*, 2004) und die Glioblastoma Zelllinie T98G (Kikuchi *et al.*, 2004). Besonders häufig für Experimente werden die N2a und die Rov Zellen verwendet. Diese sowie die anderen hier genannten Zellen haben allerdings einen entscheidenden Nachteil, sie alle besitzen ein endogenes PrP^C, das nach einer Infektion mit TSE ebenfalls reagiert.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit mit PrP „knock-out“ Zellen gearbeitet. Diese besitzen kein endogenes PrP^C, weshalb nach einer Transfektion mit dem *prnp* Gen auch nur das exprimierte PrP^C nachgewiesen wird und nach einer PrP^{Sc} Infektion interagieren kann. Die Ergebnisse sind aus diesem Grund im Gegensatz zu den anderen Zelllinien eindeutig. An dieser Zelllinie kann die Regulation der PrP^C Expression genau bestimmt werden. Reagiert das PrP^C in diesen Zellen auf eine TSE-Infektion, kann außerdem genauer auf die Spezies des Erregers und die des eingeschleusten PrP^C eingegangen werden. Durch Variation von Erreger und endogenem PrP^C können so Rückschlüsse auf die Übertragbarkeit von TSE-Erkrankungen über die Speziesbarriere hinweg gewonnen werden. Durch die Bestimmung der minimalen infektiösen Dosis kann eine Risikoabschätzung für verschiedene Spezies getroffen werden. Kombiniert man ein PrP „knock-out“ Zellmodell mit anderen Zellmodellen, so

können Informationen über das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen bei der TSE-Infektion erhalten werden.

Die Arbeit mit den Zellkulturmodellen hat neben der genauen Definierbarkeit des Systems den Vorteil, dass das Risiko einer TSE-Infektion für das Laborpersonal geringer ist als mit den Tiermodellen. Auch ist der Umgang mit Zellkulturen ethisch unbedenklich. Durch all diese Faktoren kann das Zellkulturmodell das Tiermodell fast ersetzen. Trotzdem kann auf Tierexperimente nicht vollständig verzichtet werden, da derzeit eine Medikamentenzulassung erst nach Tierversuchen erfolgt und ein Vergleich der beiden Modelle den größten Erkenntnisgewinn liefert.

1.7 Retroviren

Da in dieser Arbeit Zellkulturen nicht nur mit TSE infiziert wurden, sondern auch mit Retroviren, um verschiedene Gene in ein Wirtsgenom zu integrieren, wird hier auf diese Virenfamilie eingegangen.

Viren sind infektiöse Einheiten mit einer Größe von wenigen nm bis hin zu wenigen μm . Sie besitzen keinen eigenen Stoffwechsel. Daher vermehren Viren sich nicht wie Pro- und Eukaryonten sondern dadurch, dass sie in diese eindringen und deren Reproduktionsmechanismen nutzen. Dies geschieht, indem sie ihr Genom in die Wirtszelle einbringen und den wirtseigenen Replikationsapparat verwenden, um neue Virenbestandteile zu produzieren. Viren werden anhand der Symmetrieform, der Capside, der Membranhülle und nach der Art ihrer Erbinformation unterschieden. Als Erbinformation kann dabei DNA oder RNA dienen, die als Einzel- oder Doppelstrang im Virus vorliegen kann.

Das besondere an Retroviren ist, dass sie für eine eigene „*reverse transkriptase*“ (Rt) kodieren. Diese Rt wird dazu verwendet, vireneigene ssRNA in dsDNA umzuschreiben. Nach Integration der proviralen DNA in das Wirtsgenom, werden die viralen Proteine von dieser Matrize synthetisiert. Ansonsten besitzen Retroviren ein Capsid, das von einer Hüllmembran mit Glykoproteinen umgeben ist. Die Glykoproteine dienen der Erkennung der Wirtszelle und der Virus-Zell-Interaktion. Der schematische Aufbau eines Retrovirus ist in der Abb. 11 dargestellt.

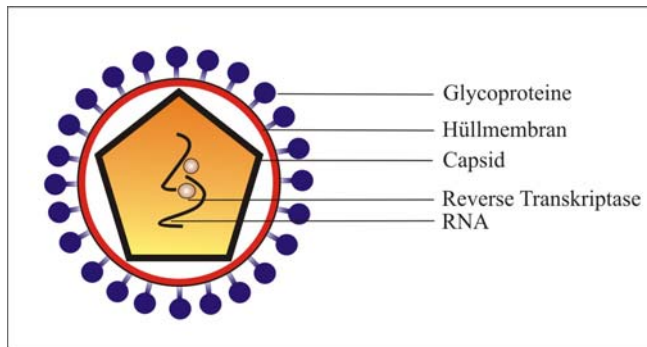


Abb. 11 Schematischer Aufbau eines Retrovirus

In das retrovirale Genom können verschiedene heterologe Gene eingebracht werden. Allerdings sollte dies zwischen den „*long terminal repeats*“ (LTR)-Regionen geschehen, dargestellt in der Abb. 12, damit die Integration in das Wirtsgenom mit hoher Frequenz erfolgen kann. Diese Eigenschaft wurde in dieser Arbeit ausgenutzt, um verschiedene Zelllinien mit *prnp* Genen zu transfizieren. Für die Transfektion der Zellen wurde ein Lentivirussystem verwendet. Zur selben Virenfamilie gehört auch das HIV. Diese Virenfamilie ist besonders effizient, da es zu einer fast 100%igen Expression des Transgens in den infizierten Zellen kommt. Der Replikationszyklus eines Retrovirus ist in der Abb. 13 dargestellt.

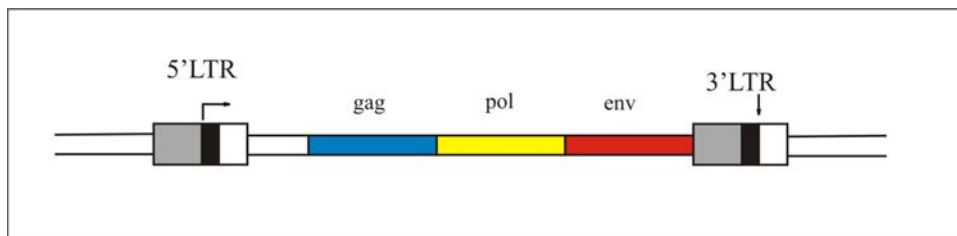


Abb. 12 Genomstruktur der LTR-Region eines Retrovirus Die DNA-Replikation erfolgt in Richtung 5'-3', dazwischen liegen die für das Virus wichtigen Proteine gag, pol und env.

In dieser Arbeit wurden *prnp* Gene eingeschleust und zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Durch Ausnutzung des Replikationsapparates des Wirts konnte das gewünschte Prion Protein exprimiert werden.

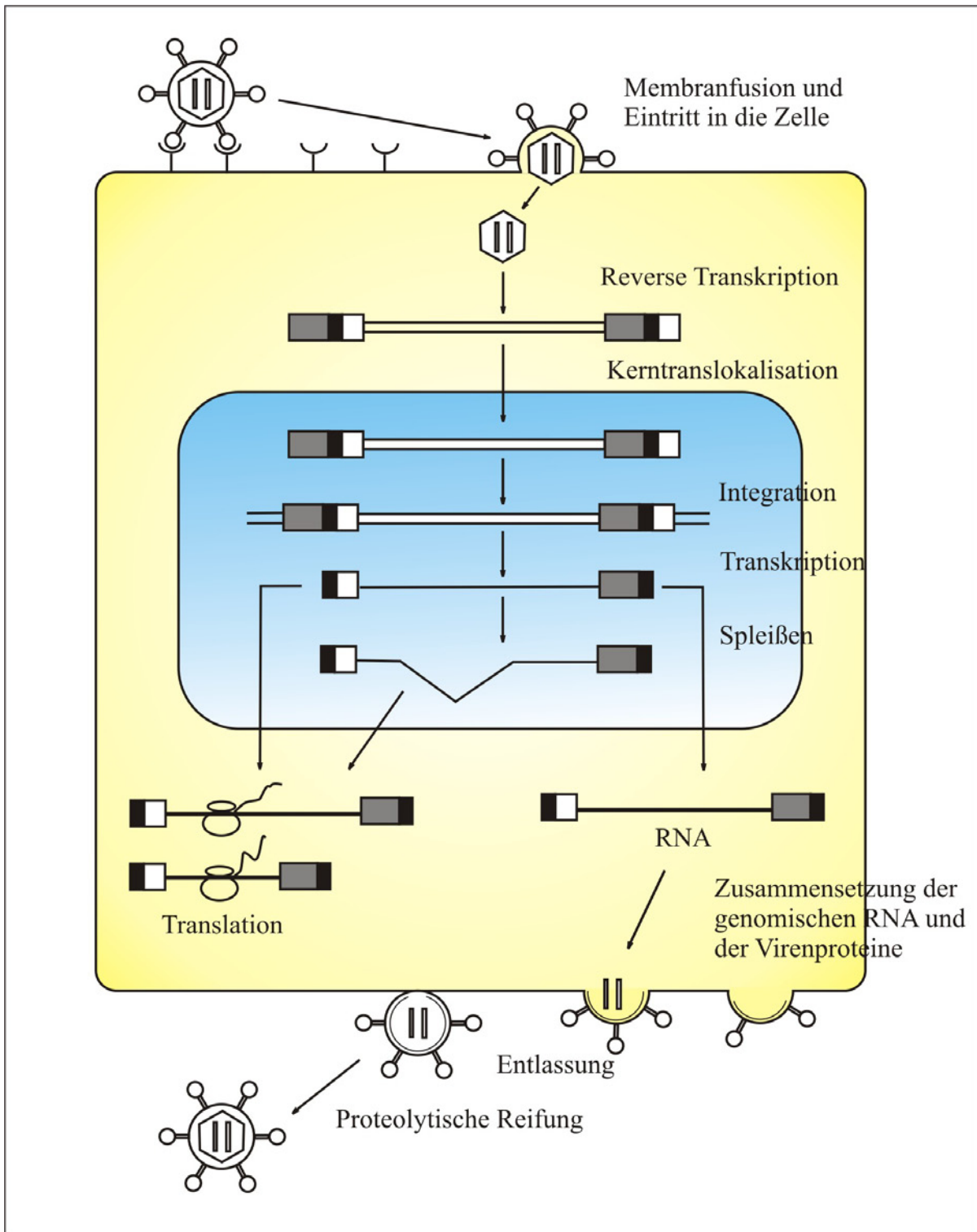


Abb. 13 Replikationsmodell eines Retrovirus in der Zelle Nach dem Eintritt des Virus in die Wirtszelle wird seine RNA durch die reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben. Die DNA wird in den Zellkern eingeschleust und in das Wirtsgenom integriert. Anschließend folgt die Transkription der Virusgene. Die hier entstandene RNA wird entweder gespleißt und dient als Matrize für die Synthese der Virusproteine oder wird unmodifiziert als Genom für neue Virenpartikel verwendet. Aus den Virenproteinen und dem Genom werden neue Viruspartikel gebildet und ohne die Zellmembran zu zerstören, ausgeschleust (nach Coffin *et al.*, 1997).

1.8 Tetracyclin regulierte Proteinexpression

Da die in dieser Arbeit verwendeten Zellen das PrP^C induzierbar exprimieren sollen, ist ein regulierbarer Promotor erforderlich. Dafür wurde das Tetracyclin (Tet)-System verwendet. Bei diesem System gibt es zwei Möglichkeiten der Regulation. Entweder das Tet-Off System, bei dem die Zellen das gewünschte Protein exprimieren, bis sie ein Signal zur Abschaltung der Expression erhalten oder das Tet-On System, bei dem die Zellen so lange kein Protein exprimieren, bis sie ein Signal erhalten. Die Expression wird durch das Antibiotikum Tetracyclin (dargestellt in der Abb. 14) oder dessen Derivat Doxycyclin (Dox) an- oder abgeschaltet. Das zytotoxischere Doxycyclin wirkt dabei 100-fach stärker als Tetracyclin (Gossen *et al.*, 1995).

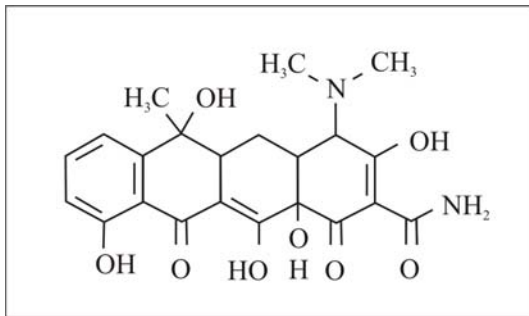


Abb. 14 Strukturformel des Tetracyclins

Das Tet-System wurde von Gossen und Bujard 1992 entwickelt und ist heute neben dem Flp-In oder dem Cre/Lox-System eines der meist genutzten Systeme zur Regulation von Proteinexpressionen.

Der Vorteil des Tet-Systems besteht darin, dass die Sequenz für den regulierbaren Promotor nicht in Eukaryonten vorkommt und damit nicht ungewollt angeschaltet werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde das Tet-Off System verwendet, da dieses eine geringere Basisexpression als das Tet-On System aufweist (Gossen *et al.*, 1995). Außerdem ist das Tet-Off System sowohl durch Tet als auch Dox regulierbar, was bei dem nur Dox regulierbaren Tet-On System nicht möglich ist. Die Funktionsweise des Tet-Off Systems für die Regulation der *prnp* Transkription ist in der Abb. 15 dargestellt.

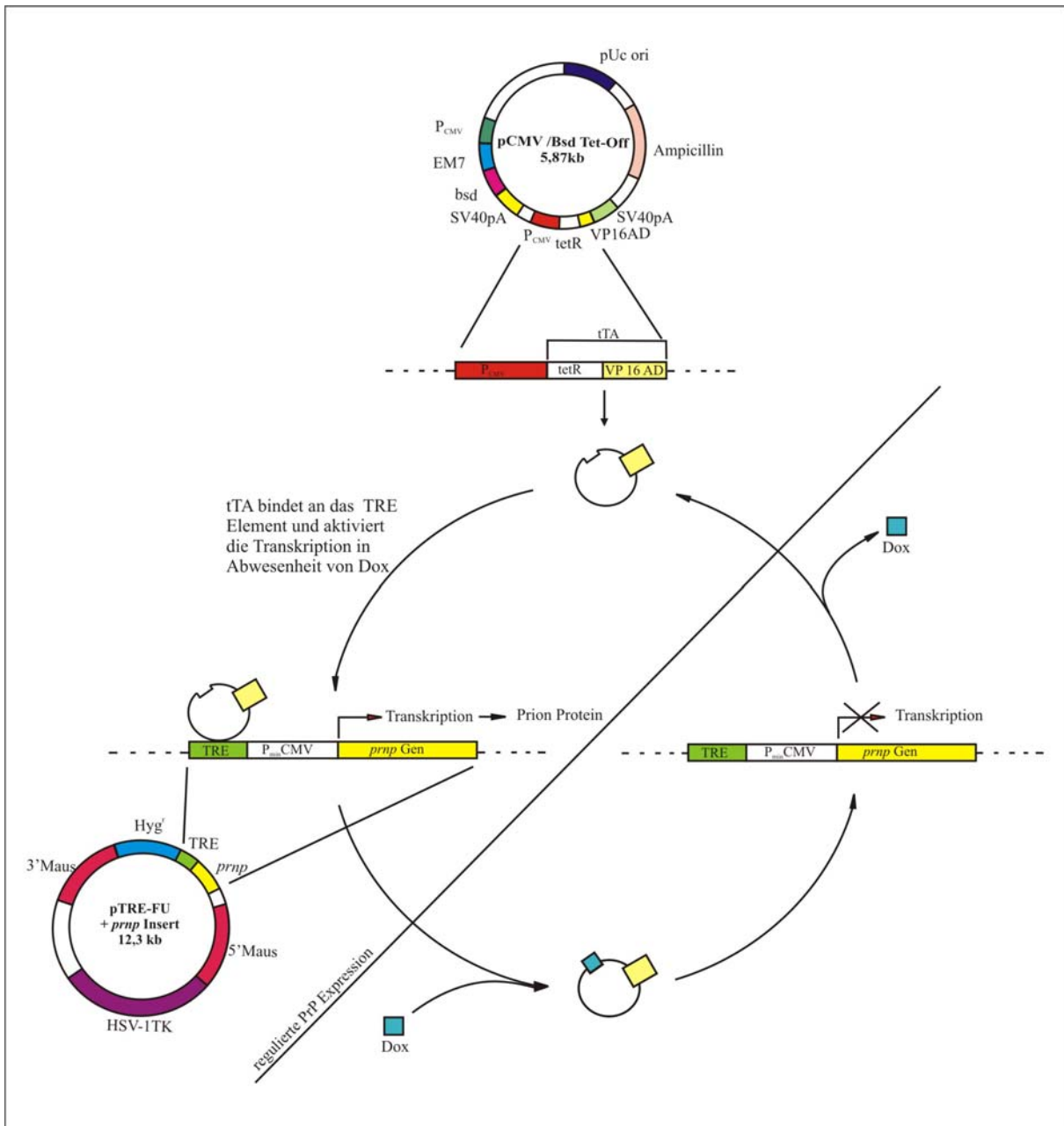


Abb. 15 Regulation einer Proteinexpression durch das Tet-Off System am Beispiel des PrP Das tTA-Element setzt sich an das TRE-Element. Deshalb kann das *prnp* Gen transkribiert und das PrP^C synthetisiert werden. Sobald sich Doxycyclin (Dox) an das tTA-Element bindet, wird die Bindung mit dem TRE-Element unterbunden und die Transkription wird verhindert. Durch diese reversible Inhibierung, kann die Transkription erneut unter der Voraussetzung beginnen, dass das Dox vom tTA-Element entfernt wird.

Da die Aktivierung nur in trans und nicht in cis Stellung erfolgen kann, spricht man von einer Transaktivierung. Dabei müssen die beiden regulatorischen Elemente auf verschiedenen Plasmiden lokalisiert sein und in die Zelle separat transfiziert werden. Bei dem Tet-Off System bindet sich das tTA-Element, welches im pCMV/Bsd Tet-Off Vektor lokalisiert ist, an das „tetracycline responsive element“ (TRE), welches sich im pTRE-FU Vektor mit dem zu transkribierenden Gen befindet. So kann das gewünschte Protein exprimiert werden. Wird aber Dox oder Tet zugegeben, bindet das Antibiotikum an das tTA-Element.

Dieses kann sich dann nicht mehr an das TRE-Element binden und die Proteinexpression wird verhindert. Erst wenn diese Inhibierung durch das Antibiotikum aufgehoben wird, kann eine erneute Proteinexpression erfolgen. Somit bildet das Antibiotikum Tet oder Dox die Grundlage für das Funktionieren dieses Systems zur reversiblen Inhibierung der Transkription des Zielgens. Durch diese Antibiotika ist das System an- oder abstellbar.

1.9 Aufgabenstellung

Prionen sind infektiöse Proteine, die aufgrund fehlender Nukleinsäuren nicht mit den üblichen Methoden zu detektieren sind. Der nur in Sicherheitslabors anwendbare „Bioassay“, der durch die intracerebrale Inokulation von infektiösem Material erfolgt, bietet bisher die einzige Möglichkeit Prionen zu vermehren und Infektiösität sicher nachzuweisen. Eine „*ex vivo*“ Replikation von infektiösen Prionen in Zellkultur wäre daher eine deutliche Vereinfachung. Außerdem kann ein solches System zum Verständnis der molekularen Vorgänge der bis heute kaum untersuchten ersten Infektionsschritte führen. Auch zur Aufklärung der immer noch fraglichen biologischen Funktionen des zellulären Prion Proteins (PrP^C) könnte es beitragen. Bisher wurden nur Zellkulturmodelle mit endogener PrP^C Expression zur Replikation von infektiösem PrP^{Sc} beschrieben. Die Schwierigkeiten der Replikation in verschiedenen Zelltypen beruhen vermutlich auf einer zu geringen Basisexpression des PrP^C. Daher soll versucht werden, eine „*ex vivo*“ Replikation von PrP^{Sc} in verschiedenen Zelltypen in einem neuen Zellkultursystem zu erreichen. Ein solches Zellkulturmodell könnte sowohl zur Diagnose von TSE-Erkrankungen als auch zur Untersuchung von molekularwissenschaftlichen Fragestellungen dienen.

Um eine Überexpression des PrP^C zu erhalten, sollen PrP „*knock-out*“ (PrP^{0/0}) Zellen mit einem speziell konstruierten PrP Expressionsvektor stabil transfiziert werden. Diese Überexpression ist für die Detektion des PrP^{Sc} nötig, da sich nur ein geringer Teil des PrP^C in diese pathogene Isoform umfaltet. Der Expressionsvektor wurde als Kasette konstruiert damit ein *prnp* Gen eingebaut und gegen andere ausgetauscht werden kann. Dadurch sollen neue stabile regulierbare PrP^C exprimierende Zelllinien am DPZ, neben der 3T3 Tet-Off hFFI Zelllinie, einer stabil exprimierenden murinen Zelllinie für das humane PrP, etabliert werden. Diese Zellen müssen genauer in Bezug auf die Art der Regulierbarkeit sowie die An- und Abschaltung der PrP^C Expression mit Hilfe des Western Blots und der Immunfluoreszenz charakterisiert werden.

Können sich diese Zellen regulieren lassen, sollte versucht werden die Zellen mit BSE zu infizieren. Dazu müssten sie mit infektiösem Rinderhirnhomogenat inkubiert werden, um eine Infektion der Zelllinie und der Replikation des PrP^{Sc} herbeizuführen. Die Vermehrung könnte anschließend mit Hilfe des Proteinase K Verdaus beobachtet werden.

2 Materialien und Methoden

Im Folgenden werden die verwendeten Techniken aus den Bereichen der Molekulargenetik, Zellbiologie, Bakteriologie, Proteinbiochemie sowie Bioanalytik beschrieben.

2.1 Molekulargenetische Methoden

2.1.1 DNA-Isolierung aus Blut

1 ml frisch abgenommenes Vollblut wurde mit 1 ml eiskaltem Puffer C1 und 3 ml H₂O_{bid} gemischt. Anschließend folgte eine Inkubation auf Eis für 10 min, in der die Probe alle 2 min invertiert wurde. Diese Probe wurde dann für 15 min mit 1300 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,25 ml eiskaltem Puffer C1 und 0,75 ml H₂O_{bid} suspendiert. Nach 15 min Zentrifugation mit 1300 g bei 4 °C (Centrifuge 5415 C, Eppendorf) wurde das Pellet in 1 ml Puffer G2 resuspendiert und der Überstand verworfen. Zur Suspension wurden 25 µl PK Lösung zugegeben und für 60 min bei 50 °C inkubiert. Diese Suspension wurde auf eine mit 1 ml QBT Puffer equilibrierte Säule gegeben. Durch die Gravitation lief die Suspension selbständig durch die Säule. Die Säule wurde danach dreimal mit 1 ml Puffer PE gewaschen. Durch Zugabe von 2 ml Puffer QF wurde die DNA eluiert. Anschließend wurde die genomische DNA gefällt.

2.1.2 DNA-Isolierung aus Zellkulturen

Auf geerntete 1×10^6 Zellen wurden 0,5 ml eiskalter Puffer C1 und 1,5 ml H₂O_{bid} gegeben. Anschließend wurde weiter wie bei 2.1.1 verfahren.

2.1.3 DNA-Isolierung aus Gewebe

20 mg Gewebe wurden mit flüssigem Stickstoff in einem Potter durch einen Mörser zerkleinert. Danach wurde 0,1 ml einer PK Lösung zugegeben und für 2 h bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde weiter wie bei 2.1.1 verfahren.

2.1.4 Plasmidisolierung aus transformierten Zellen

Die hier beschriebene Methode ist zur Isolierung von Plasmiden aus 1 bis 5 ml Übernachtkulturen von Bakterien mit Hilfe des Plasmidisolierungs Kits von Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit) geeignet. Die Übernachtkultur wurde für 10 min mit 13000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer P1, der mit 2,5 µl RNaseA (100 mg/ml) versetzt war, resuspendiert. Die Zellen wurden durch die Zugabe von 250 µl Puffer P2 lysiert und durch vier- bis sechsmaliges Invertieren gemischt. Diese Lysisreaktion wurde durch die Zugabe von 350 µl des Puffers N3 gestoppt. Die Zellfragmente wurden danach durch Zentrifugation für 10 min mit 13000 g pelletiert und der Überstand wurde auf eine Qiagen Säule überführt. Es folgte eine Zentrifugation von 1 min mit 13000 g. Anschließend wurde die Säule mit 750 µl des Puffers PE gewaschen und zweimal wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Das an die Säulenmatrix gebundene Plasmid wurde mit 50 µl H₂O_{bid} durch Zentrifugation wie beschrieben eluiert. Das so eluierte Plasmid wurde bei -20 °C gelagert.

2.1.5 DNA-Amplifikation mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technik (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1987) ist eine enzymatische Methode für die Amplifikation spezifischer dsDNA-Fragmente. Durch zwei an den komplementären Strängen in entgegengesetzte Richtungen orientierte gebundene Oligonukleotide (Primer), wurde das zu amplifizierende DNA-Fragment synthetisiert. Durch das Einbauen verschiedener Nukleotide in den Primer konnten zusätzlich spezifische Schnittstellen an das Fragment angefügt werden. Durch wiederholte Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation wurden die DNA-Fragmente exponentiell vermehrt. Die Amplifikationsreaktionen wurden in einem Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf) durchgeführt.

PCR-Reaktionsansatz:	1,0 µl	Primer 1 (100 µM)
	1,0 µl	Primer 2 (100 µM)
	1,0 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
	5,0 µl	10 x Taq Polymerasepuffer
	0,5 µl	Taq Polymerase (2,5 U/µl)
	2,0 µl	25 mM MgCl ₂
	< 100,0 ng	dsDNA
	ad. 50,0 µl	H ₂ O _{bid}

Die optimale Annealingtemperatur für das *prnp* Gen musste zuvor durch einen Temperaturgradienten bestimmt werden. Alle anderen Bedingungen sollten dabei konstant sein. Einen Anhaltspunkt für diese Annealingtemperatur erhielt man aus der

Schmelztemperatur (T_m) der entsprechenden Primer. Diese ergab sich aus deren Basenzusammensetzung. Die einfachste Gleichung zur Berechnung der theoretischen Schmelztemperatur war folgende:

$$T_m = 4 \cdot (\text{Anzahl an G bzw. C}) + 2 \cdot (\text{Anzahl A bzw. T})$$

Diese Gleichung eignete sich allerdings nur für Primer bis zu einer Länge von 20 Nukleotiden. Für längere Primer musste diese Gleichung modifiziert werden. Die Anzahl der Zyklen ist ein Maß für die Menge am entstehenden Produkt, da theoretisch in jedem Zyklus die Anzahl der DNA-Templates verdoppelt wurde. Für die verschiedenen DNA-Fragmente wurden verschieden angepasste PCR-Programme verwendet, die in a) bis d) aufgelistet sind.

a) Amplifikation von des *prnp* Gens aus genomischer DNA

Schritt 1: T = 95,0 °C 5,00 min
 Schritt 2: T = 94,0 °C 0,50 min
 Schritt 3: T = 59,1 °C 1,00 min
 Schritt 4: T = 72,0 °C 0,75 min
 35 Wdh. der Schritte 2 bis 4
 Schritt 5: T = 72,0 °C 4,00 min
 Schritt 6: T = 4,0 °C ∞ min

b) Amplifikation des *prnp* Gens aus Vektoren

Diese Methode ist für die Verwendung eines Plasmids oder eines Bakterienklons geeignet.

Schritt 1: T = 95,0 °C 5,00 min
 Schritt 2: T = 94,0 °C 0,50 min
 Schritt 3: T = 52,0 °C 1,50 min
 Schritt 4: T = 72,0 °C 1,00 min
 25 Wdh. der Schritte 2 bis 4
 Schritt 5: T = 72,0 °C 4,00 min
 Schritt 6: T = 4,0 °C ∞ min

c) Amplifikation des tTA-Elements

Schritt 1: T = 95,0 °C 5,00 min
 Schritt 2: T = 94,0 °C 0,75 min
 Schritt 3: T = 54,0 °C 1,00 min
 Schritt 4: T = 72,0 °C 1,00 min
 32 Wdh. der Schritte 2 bis 4
 Schritt 5: T = 72,0 °C 5,00 min
 Schritt 6: T = 4,0 °C ∞ min

d) Mycoplasmentest in der Zellkultur

Schritt 1:	T = 94,0 °C	2,00 min
Schritt 2:	T = 94,0 °C	0,50 min
Schritt 3:	T = 55,0 °C	0,50 min
Schritt 4:	T = 72,0 °C	0,50 min
35 Wdh. der Schritte 2 bis 4		
Schritt 5:	T = 4,0 °C	∞ min

2.1.6 Reinigung von PCR-Produkten

Um Oligonukleotiden und andere Verunreinigungen zu entfernen, musste die PCR-Probe gereinigt werden. Die Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Das 5-fache Volumen der PCR-Probe an Puffer PB wurde zugegeben und gemischt. Anschließend wurde die Suspension in eine Säule gegeben und für 1 min mit 13000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Danach wurde die Säule mit 750 µl Puffer PE und durch Zentrifugation für 1 min mit 13000 g gewaschen. Nach dem Verwerfen des Durchlaufs wurde die Säule nochmals unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 50 µl 70 °C warmen 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 durch Zentrifugation für 1 min mit 13000 g eluiert und das Eluat bei -20 °C gelagert.

2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit anschließender Reinigung und Identifizierung wurden Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. Für die zu erwartende Größe der Fragmente von 0,2 kb bis 12 kb wurden Horizontalgele verwendet. Diese enthielten je nach berechneter Fragmentgröße 0,5 % bis 2,5 % (w/v) Agarose (Sambrook *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1969) in TAE-Puffer (0,01 M EDTA, 0,2 M Essigsäure, 0,4 M Tris mit pH 8,0). Der Nachweis der DNA-Banden erfolgte mit Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Dabei wurden jeweils 100 ml Gelvolumen mit 0,1 % (w/v) Ethidiumbromidlösung versetzt. Die Proben wurden mit 1/10 ihres Volumens an Probenpuffer (6 x Loading Dye Solution, Fermentas) versetzt und aufgetragen. Als Längenstandard diente, je nach der zu erwartenden Fragmentgröße, 1 µg des „100 bp-DNA Ladder“ oder „1 kb-DNA Ladder“ (GeneRuler, Fermentas). Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 120 V in 1 x TAE als Laufpuffer. Anschließend wurde das Bandenmuster im Gel mit einem Geldokumentationssystem (Gel Jet Imager, Intas) dokumentiert.

2.1.8 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Um dsDNA-Fragmente in einem Vektor zu klonieren, wurden diese durch bestimmte Restriktionsendonukleasen gespalten. Die Enzymkonzentrationen und Pufferbedingungen wurden dabei nach Herstellerangaben gewählt. Bei Verwendung von mehreren Restriktionsenzymen mit unterschiedlichen Pufferbedingungen wurde zuerst das Enzym mit dem Optimum bei einer niedrigeren Salzkonzentration verwendet. Anschließend wurde die Salzkonzentration erhöht und mit dem zweiten Enzym geschnitten. Der Verdau wurde für 2 h mit der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur durchgeführt. Die verwendeten Restriktionsenzyme mit den eingesetzten Pufferkonzentrationen sowie deren Erkennungssequenzen sind in der Tab. 2 aufgelistet. Die entstandenen Fragmente wurden anschließend durch eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert und dokumentiert.

Tab. 2 Verwendete Restriktionsendonukleasen

Enzym	Pufferkonzentration ¹	Erkennungssequenz
BamHI	1 x	G [▼] GATCC
HindIII	2 x	A [▼] AGCTT
ScaI	2 x	AGT [▼] ACT
SspI	1 x	AAT [▼] ATT
XhoI	2 x	C [▼] TCGAG
XmnI	1 x	GAANN [▼] NNTTC

¹ 1 x Multi-Core™ Puffer (Promega, 25 mM Tris/Acetate, pH 7,5, 100 mM Natriumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1mM DTT)

Für einen Restriktionsverdau wurde folgender Ansatz verwendet:

1 µl	Enzym (5 U)
1 µl	Puffer
x µl	DNA oder Vektor
ad. 30 µl	H ₂ O _{bid}

Das eingesetzte Volumen x an DNA-Lösung, wurde so gewählt, dass 2 bis 3 µg im Restriktionsansatz enthalten waren.

2.1.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel geschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraktions-Kit (Qiagen) gereinigt. Das ausgeschnittene Gelstück wurde in ein 1,5 ml Eppendorfggefäß gegeben, mit dem 3-fachen Volumen (w/v) an QG Puffer versetzt und bei 50 °C für 10 min aufgelöst (Thermomixer 5446, Eppendorf). Anschließend wurde die Lösung auf eine QIAquick-Säule gegeben und für 1 min in der Tischzentrifuge mit 13000 g zentrifugiert. Dieser Durchlauf wurde verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 750 µl PE Puffer durch Zentrifugation für 1 min mit 13000 g gewaschen und erneut zentrifugiert wie bereits beschrieben. Danach wurde zur Elution der DNA-Fragmente die Säule mit 30 µl H₂O_{bid} für 1 min mit 13000 g zentrifugiert.

2.1.10 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung einer Nukleinsäurekonzentration in einer Lösung wurde deren optische Dichte bei 260 nm gemessen. Dazu wurden die Proben im Verhältnis 1:100 mit H₂O_{bid} verdünnt und in eine Quarzglasküvette mit 1 cm Schichtdicke überführt. Die Messung erfolgte in einem Spektralphotometer (GeneQuant, Pharmacia Biotech). Die Konzentrationsberechnung ließ sich mit folgender Gleichung durchführen:

$$c[\text{ng}/\mu\text{l}] = OD_{260} \cdot \Sigma \cdot V_F$$

mit

c	= Konzentration
OD ₂₆₀	= Extinktion der optischen Dichte bei 260 nm
Σ	= Extinktionskoeffizient
V _F	= Verdünnungsfaktor
Σ	= 0,05 für dsDNA

Um die Reinheit der jeweiligen DNA zu ermitteln, wurde zusätzlich der Quotient von OD₂₆₀/OD₂₈₀ bestimmt. Bei einem Wert von 1,6 bis 2,0 wurde mit der Aufarbeitung fortgefahren, da der ideale Wert für wässrige dsDNA-Lösungen bei 2,0 liegt.

2.1.11 Dialyse von salzhaltigen Lösungen

Da sich Salze in den verschiedenen molekularbiologischen Techniken, wie z. B. der Transformation oder Ligation störend auswirken, mussten diese entfernt werden. Dazu wurden die salzhaltigen DNA- oder Proteinlösungen auf die Oberseite einer Dialysemembran (0,025 µm Porendurchmesser, Millipore) pipettiert. Dabei befand sich die raue Unterseite über einer 10%igen Glycerinlösung. Diese Membran wurde für 2 h bei RT inkubiert. Das Volumen der DNA-haltigen Lösung musste mind. 20 µl betragen, da ansonsten das Volumen nach der Dialyse zu gering war, um von der Membran abgenommen werden zu können.

2.1.12 Klonierung von DNA-Fragmenten

Unter Klonierung versteht man die Verknüpfung von Vektor- und Insert-DNA mittels Ligation (Weiss *et al.*, 1968; Scharf *et al.*, 1986). Für eine erfolgreiche Ligation mussten allerdings bestimmte Bedingungen erfüllt sein, die nachfolgend beschrieben werden.

2.1.12.1 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Religation des geschnittenen Vektors zu vermeiden, wurde dieser zuvor dephosphoryliert. Dabei wurden am 5'-Ende des linearen Vektors die Phosphatreste unter zu Hilfenahme des folgenden Dephosphorylierungsansatzes abgespalten:

10 µl 200 µg lineare Plasmid DNA
1 µl alkalische Phosphatase (1 U/µl)
3 µl 10 x alkalischer Phosphatase Puffer
ad. 30 µl H₂O_{bid}

Die Inkubation des Dephosphorylierungsansatzes erfolgte für 1 h bei 37 °C mit anschließender Inaktivierung des Enzyms bei 85 °C für 10 min.

2.1.12.2 Ligation von DNA-Fragmenten über Restriktionsschnittstellen

Für die Ligation von Vektor und Insert über Restriktionsschnittstellen wurden Insert und Vektor mit einem oder zwei kompatiblen Enzymen geschnitten. Wenn zwei verschiedene Restriktionsenzyme verwendet wurden, wurde die Richtung in der das Insert in den Vektor ligiert, festgelegt. Wurde dagegen nur ein Enzym verwendet, konnte das Insert in

unterschiedlichen Orientierungen im Vektor vorliegen. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Methoden angewandt. Folgender Ligationsansatz wurde dabei verwendet:

100 ng linearer Vektor-DNA
 3-facher molarer Überschuss an Insert-DNA
 2 µl 10 x T4 Ligationspuffer
 2 µl T4 Ligase (3 U/µl)
 ad. 20 µl H₂O_{bid}

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C im Wasserbad inkubiert. Die Berechnung der verwendeten optimalen Mengen an Vektor und Insert am Beispiel eines 12 kb Vektors und eines 0,8 kb Inserts ist in der nachfolgender Gleichung dargestellt:

$$[(50 \text{ ng Vektor} \cdot 0,8 \text{ kb} - \text{Insert}) / (12 \text{ kb Vektor})] \cdot 3 (\text{Überschuss Insert}) = 10 \text{ ng Insert}$$

2.1.12.3 TA-Klonierung von DNA-Fragmenten

Da normalerweise die Taq Polymerase ein Adenin an das 3'-Ende des DNA-Stranges nach der PCR synthetisiert, konnten gereinigte PCR-Produkte direkt in einen Vektor kloniert werden. Diese Methode konnte nur angewandt werden, weil ein überhängendes Thymin Bestandteil des verwendeten pGEM-T Vektors (Promega) war. Verfügte das Insert nicht über ein Adenin am 3'-Ende, musste dieses noch adenyliert werden. Ansonsten erfolgte die Ligation des Vektors mit dem Insert direkt über Nacht bei 16 °C mit dem folgenden TA-Klonierungsansatz:

0,5 µl pGEM-T Vektor (50 ng)
 5,0 µl 10 x Ligationspuffer
 0,8 µl 2 x T4 Ligase (1U/µl)
 50,0 ng DNA-Fragment
 ad. 10,0 µl H₂O_{bid}

Aufgrund dessen, dass der pGEM-T Vektor für die α-Komplementation ausgelegt ist, wurden die positiven Klone auf IPTG-XGal LB Amp Platten identifiziert, da ein Fragment, zwischen das lacZ-Gen kloniert wurde. Deshalb konnte die durch das lacZ-Gen codierende β-Galactosidase nicht gebildet werden, die sonst das X-Gal spaltete, wodurch ein blauer Indolfarbstoff gebildet würde. Aus diesem Grund erschienen die Klone mit Insert weiß. Daher wird die α-Komplementation auch als blau/weiß Selektion bezeichnet (Horwitz *et al.*, 1964; Ullmann *et al.*, 1967).

2.1.12.4 Adenylierung von DNA-Fragmenten

Durch Adenylierung wurde ein Adenin an ein DNA-Fragment angefügt, dabei wurde das Fragment durch Inkubation mit dATP und einer Polymerase adenyliert. Die Reaktion erfolgte für 2 h bei 70 °C mit folgendem Adenylierungsansatz:

1,0 µl 1 mM dATP
0,5 µl Taq (5U/µl, Qiagen)
1,0 µl 10 x Puffer
0,2 µl 25 mM MgCl₂
5,0 µl DNA-Fragment
ad.10,0 µl H₂O_{bid}

2.1.13 Restriktionsfragment-Kartierung

Durch den Einsatz mehrerer Restriktionsenzyme wurde das Plasmid in verschiedene Fragmente, mit unterschiedlichen Längen, geschnitten. Dieser Restriktionsverdau wurde anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und dokumentiert. War das gewünschte Fragment im Vektor vorhanden, konnte so gleichzeitig die Orientierung des Fragmentes bestimmt werden.

2.1.14 DNA-Sequenzierung

Um genaue Kenntnisse über die Sequenz von Genen zu erhalten, wurden diese sequenziert. Die Sequenzierung beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger, 1977. Allerdings wurden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) statt radioaktiver verwendet. Dabei wurde jedem der vier ddNTPs eine andere Fluoreszenzmarkierung zugeordnet. Neben den ddNTPs befanden sich auch Desoxyribonukleotide (dNTPs) in einem Sequenzierungsansatz, die während der Sequenzreaktion eingebaut wurden. Wurde aber ein Didesoxynukleotid eingebaut, stoppte die Synthese, da sie keine Hydroxylgruppe am 3'-Ende besaß, diese aber für eine Folgereaktion notwendig wäre. Da dieser Einbau zufällig erfolgte, entstanden DNA-Stränge mit unterschiedlichen Längen, diese konnten durch eine Kapillarelektrophorese bestimmt werden. Diese DNA-Stränge wurden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Danach wurde die Fluoreszenzmarkierung durch einen Laserstrahl detektiert. Durch die Größenbestimmung wurden die um eine Base unterschiedlichen Stränge erkannt und ihr Fluoreszenzsignal entsprechend dem Nukleotid sortiert. Durch eine Software wurde die Sequenz der DNA-Templates anschließend als Elektropherogramm ausgegeben.

Für die Bestimmung der Gensequenz aus einem Plasmid wurden 300 ng DNA benötigt oder 30 ng, wenn die Sequenz eines PCR-Fragments bestimmt werden sollte. Die Sequenz-PCR erfolgte mit folgendem Ansatz:

Sequenz-PCR Ansatz:

1,0 µl Big Dye
1,5 µl 5 x Puffer
1,0 µl 3,3 pmol/µl Primer
x µl DNA
ad.10,0 µl H₂O_{bid}

Sequenz-PCR:

Schritt 1: T = 95 °C 5,00 min
Schritt 2: T = 96 °C 0,50 min
Schritt 3: T = 50 °C 0,25 min
Schritt 4: T = 60 °C 4,00 min
25 Wdh. der Schritte 2 bis 4
Schritt 5: T = 72 °C 5,00 min
Schritt 6: T = 4 °C ∞ min

Anschließend musste das Sequenz PCR-Produkt mit folgendem Ansatz gefällt werden:

10 µl 3 M NaN₃, pH 5,5
250 µl 96%iger EtOH
90 µl H₂O_{bid}

Dieser Ansatz wurde für 15 min bei RT mit 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 250 µl 70%igem EtOH gewaschen und anschließend für 5 min mit 13000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und durch Dr. Christian Roos von der Arbeitsgruppe Primatengenetik am Deutschen Primatenzentrum sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte mittels eines 3100-Avant Genetic Analyzers (Applied Biosystems). Die erhaltenen Daten wurden anschließend mit den Sequenzanalyseprogrammen BioEdit und Chromas ausgewertet.

2.2 Prokaryontische Techniken

2.2.1 Bakterienkultivierung

Für ein optimales Wachstum der Bakterien sind Temperaturen von 37 °C und ein entsprechendes Nährmedium erforderlich. Der in dieser Arbeit verwendete Bakterienstamm ist in der Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3 Eigenschaften des Bakterienstamms

Bakterienstamm	Medium	Genotyp
<i>E. coli</i> DH5 α	Luria-Bertani (LB)	F- supE44 hsdR17 recA1 gyrA96 endA1 thi-1 relA1 deoR lambda-

Damit auf Bakterienkulturen über einen längeren Zeitraum als Referenz zurückgegriffen werden konnte, wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden die Bakterien bei einer OD₅₉₅ von 0,8 im Verhältnis von 4:1 mit Glycerin gemischt und sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die so hergestellten Kryokulturen waren bei -80 °C beliebig haltbar.

2.2.2 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen

Die optische Dichte (OD) von Bakterienkulturen wurde in einem Spektralphotometer (Uvikon 810, Kontron) bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 595 nm (OD₅₉₅) wurde gegen das Medium als Leerwert, in einer 1 ml Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm (Halbmikro Einmalküvetten, Ratiolab), gemessen.

2.2.3 Transformation von *E. coli*

Für eine elektrische oder chemische Transformation von DNA wurden kompetente *E. coli* Zellen benötigt. Die Zellen mussten kompetent sein, da sie nur so Fremd-DNA aufnehmen konnten.

2.2.3.1 Herstellung elektro-kompetenter *E. coli*

Zur Herstellung elektro-kompetenter Zellen wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden *E. coli* Stamm angeimpft und über Nacht bei 37 °C mit 200 rpm im Rundschtüttler inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag 200 ml LB-Medium angeimpft und unter gleichen Bedingungen wie am Vortag im Rundschtüttler inkubiert. Beim Erreichen einer OD₅₉₅ von 0,8 bis 1,0 wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zu 50 ml aliquotiert und 10 min bei 4 °C mit 1100 g zentrifugiert (Minifuge GL, Heraeus Christ). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 50 ml eiskaltem H₂O_{bid} resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C mit 1100 g sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet in 25 ml eiskaltem H₂O_{bid} resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach der erneuten Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das Pellet in 10 ml einer eiskalten 10%igen (v/v) Glycerinlösung mit 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und zu 200 µl in vorgekühlte sterile Eppendorfgefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Die so hergestellten elektro-kompetenten *E. coli* Zellen behielten ihre Transformationskompetenz für 2 Monate. Danach wurden neue kompetente Zellen hergestellt.

2.2.3.2 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*

LB-Medium wurde mit einer Übernachtskultur angeimpft, wie bei 2.2.3.1 beschrieben. Bei Erreichen einer OD₅₉₅ von 0,6 bis 0,8 wurden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend zu 50 ml aliquotiert und 5 min mit 1100 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde wie beschrieben zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden in je 5 ml eiskalter 20%iger (v/v) Glycerinlösung mit 0,1 M CaCl₂ aufgenommen und in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert. Diese wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.3.3 Transformation elektro-kompetenter *E. coli*

Für die Elektroporation wurden 100 µl elektro-kompetenter Zellen eingesetzt. Die Zellsuspension wurde unmittelbar vor der Transformation auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in eine mit Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Anschließend wurden 10 µl salzfreie DNA-Lösung zugegeben. Die DNA-Menge für eine

optimale Transformationseffizienz lag bei 50 ng. Die Elektroporation wurde bei einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25 μ F und einem Widerstand von 200 Ω durchgeführt (GENE PULSER II, Bio-Rad). Nach der Elektroporation wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium versetzt. Danach wurde die Zellsuspension in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und bei 37 °C mit 200 rpm für 1 h auf dem Rundschtüttler inkubiert. In dieser Zeit normalisierte sich der Zellstoffwechsel und das verantwortliche Gen für die Antibiotikaresistenz wurde translatiert. Danach wurden unterschiedliche Bakterienverdünnungen auf LB-Amp Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert, damit am nächsten Tag die Bakterienklone selektiert werden konnten

2.2.3.4 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*

Die chemisch kompetenten *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut. 50 μ l dieser Zellen wurden mit dem zu transfizierenden Plasmid für 20 min auf Eis inkubiert. Diese Suspension wurde anschließend für 90 s im Wasserbad bei 42 °C erhitzt und danach für 2 min auf Eis gekühlt. Damit sich die Antibiotikaresistenz ausbilden konnte, wurden 950 μ l LB-Medium zugegeben und bei 37 °C und 200 rpm für 1 h auf einem Rundschtüttler inkubiert. Danach wurde der Ansatz wie bei der Transformation elektro-kompetenter *E. coli* Zellen ausplattiert.

2.3 Eukaryontische Techniken

2.3.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Für die Zellkulturarbeiten wurden die Empfehlungen für den Umgang mit eukaryontischen Zellen befolgt (Lindl, 2000). Die verwendeten Zelllinien sind in der Tab. 4 dargestellt. In flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingelagerte Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und für 5 min mit 100 g zentrifugiert (Centrifuge 5810, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in dem entsprechenden Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

Tab. 4 Verwendete Zelllinien

Zellstämme	Gewebe	Medium	Referenz
PrP ^{0/0}	murine neuronale PrP ^{0/0} Zellen	DMEM + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin	Kretzschmar <i>et al.</i> , 1997
N2a	Maus Neuroblastoma Zellen	RPMI 1640 + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin	Klebe <i>et al.</i> , 1969
3T3	Swiss albino Maus Fibroblasten Zellen	DMEM + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin	Todaro <i>et al.</i> , 1963
3T3 L1 Tet-Off	modifizierte 3T3 Zellen	DMEM + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin	Buschmann <i>et al.</i> , 2000
PT67	modifizierte 3T3 Zellen	DMEM + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin + 4 mM L-Glutamine + 4,5 g/l Glucose	Miller <i>et al.</i> , 1996

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die adherent wachsenden Zellen in dem entsprechenden Zellkulturmedium unter sterilen Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach Erreichen von 70 % bis 90 % Konfluenz wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 x Trypsin/EDTA bei 37 °C vom Zellkulturflaschenboden durch Schwenken gelöst. Dies wurde im Mikroskop kontrolliert. Danach wurde die Trypsinreaktion mit 4 Volumen Kulturmedium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit 100 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde je nach Zelltyp mit einer Verdünnung von 1:3 bis 1:20 in neue Kulturflaschen passagiert. Experimentelle Daten wurden mit Hilfe von Transfektionsexperimenten erst nach mind. drei Passagen und einer Woche in Kultur erhoben. Zur Lagerung von Zellen und Verifizierung experimenteller Daten wurden Kryokulturen der Zellen angelegt. Zum Einfrieren der Zellen wurden jeweils 1 x 10⁶ Zellen im Einfriermedium (10 % DMSO + 25 % FCS + 65 % Medium) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen (Nalgene) überführt. Diese Kryoröhrchen wurden in eine Kryobox (Cryo 1 °C Freezing Container,

Nalgene) überführt und mit Isopropanol langsam über Nacht im Gefrierschrank auf -80 °C abgekühlt. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.3.2 Lebendzellzahlbestimmung von eukaryontischen Zellen

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Dabei wurde die Eigenschaft toter Zellen benutzt, sich durch Trypanblau färben zu lassen. Im Gegensatz dazu besaßen lebende Zellen diese Eigenschaft nicht. Dafür wurden die Zellen abtrypsiniert und mit 100 g für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einer definierten Menge Medium resuspendiert. 20 µl dieser Suspension wurden mit 20 µl 0,5 % Trypanblau gemischt und in eine Neubauerkammer zwischen Objektträger und Deckgläschen gebracht. Unter dem Mikroskop wurden dann die lebenden Zellen ausgezählt, deren Gesamtzellzahl sich nach folgender Gleichung berechnen lässt:

$$\text{Lebendgesamtzellzahl} = \text{gezählte Zellzahl} [\text{ml}]^{-1} \cdot 2 \cdot 10^4 \cdot V [\text{ml}]$$

2.3.3 Herstellung transienter Zellen durch Micellen

Zur transienten Transfektion von eukaryontischen Zellen wurde das Effectene- und das SuperFect Transfektionsreagenz (Qiagen) verwendet. Das SuperFect Reagenz legt sich um die DNA, wodurch ihre Stabilität erhöht wurde und diese über Endozytose in die Zellen eingeschleust werden konnten. Das Effectene benötigt dazu noch ein kondensierendes Agens (Enhancer). Dieser DNA-Transfektions-Komplex wurde dann in Micellen verpackt und in die Zelle eingeschleust (Tang *et al.*, 1996). Die eigentliche Transfektion erfolgte durch eine Fusion der Micellen mit den Lipiden der Zellmembran, wodurch die zu transfizierende DNA in das Zytoplasma der Zellen eingeschleust wurde.

Dazu wurden 1×10^5 Zellen auf einer 12 Well Platte ausplattiert. Am nächsten Tag wurden zur Bestimmung der optimalen Transfektionseffizienz verschiedene Konzentrationen DNA und Transfektionsreagenzien zugegeben. Dafür wurden die Zellen mit Medium ohne Serum für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Auf diese Zellen wurde der DNA-Transfektions-Komplex gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und mit Vollmedium weiter inkubiert.

Zur Bestimmung der optimalen Transfektionseffizienz wurden Zellen mit dem pGL3 Vektor transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität gemessen.

2.3.4 Herstellung stabiler eukaryontischer Zellen durch Elektroporation

Mit einem Enzym wurden 100 µg eines Vektors linearisiert. Dieser wurde anschließend durch 0,25 kV und 0,975 F in 5×10^6 abtrypsinisierte Zellen mit dem Gene Pulser II (Bio-Rad) elektroporiert. Anschließend wurden zur Etablierung stabil transfizierter Zellen diese in eine 6 cm Zellkulturschale (Greiner) überführt. 24 h später wurde durch Zugabe eines Antibiotikums die Selektion gestartet. Das dabei verwendete Antibiotikum war abhängig vom Selektionsmarker auf dem Vektor mit dem die eukaryontischen Zellen transfiziert wurden. Zur Entfernung abgestorbener Zellen wurde das Medium alle zwei Tage abgenommen und die Zellkulturschale gründlich mit PBS gewaschen. Das Wechseln des Mediums erfolgte so lange, bis nur noch einzelne Zellklone im Mikroskop zu erkennen waren. Die Selektionsdauer war abhängig von der verwendeten Antibiotikakonzentration, die zuvor anhand der Antibiotikaresistenz nicht transfizierter Zellen ermittelt wurde.

2.3.5 Retrovirale Transfektion eukaryontischer Zellen

Für die Retrovirale Infektion von Eukaryonten wurde der Vector pRevTRE verwendet. Da dieser Vektor allein keine Zellen infizieren kann, wurde dieser zunächst in die PT67 Zelllinie mit 0,25 kV und 0,975 µF elektroporiert. Diese Zelllinie exprimiert die Virushüllproteine, verpackte den Vektor in ein Capsid mit Virushülle und gab ihn über die Zellmembran in das Zellmedium ab, ohne dass die Zellen dabei zerstört wurden. Dieses Medium wurde anschließend durch einen 0,45 µm Zelluloseacetatfilter filtriert, so dass nur Medium mit Viren im Durchlauf übrig blieben. Um eine Infektion zu erreichen, wurde ein „multiplicity of infection“ (MOI) von 0,5 bis 3 „colony forming units“ (cfu) pro Zelle benötigt. Die zu infizierende Zelllinie musste für eine retrovirale Transfektion zu 60 % konfluent in einer Zellkulturflasche gewachsen sein. Zu dieser Kultur wurden 4 µg/ml Polybrene gegeben, damit sich die Virenpartikel besser an die Zellen binden und eindringen konnten (Davis *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005; Landazuri *et al.*, 2006). Anschließend wurde diese Zelllinie mit dem Durchlauf der Filtration für 24 h inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und durch normales Zellkulturmedium ersetzt. Nach 2 Tagen wurde mit der Selektion stabil transfizierter Zellen durch die Zugabe eines Antibiotikums begonnen. Da sich in der zu

infizierenden Zelllinie und auf dem retroviralen Vektor verschiedene Resistenzgene befanden, blieben nach der Selektion nur die Zellen übrig, die beide Resistenzen ausgeprägt hatten.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Transfektionseffektivität anhand der Luziferaseaktivität

Zur Bestimmung der optimalen Transfektionseffektivität wurde die Luziferaseaktivität in den transient transfizierten Zellen gemessen. Dazu wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion mit 50 µl Lysepuffer lysiert. Um die Zelltrümmer zu entfernen, wurde die Zellsuspension abgenommen und für 2 min mit 13000 g zentrifugiert. 50 µl des Überstandes wurden im Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold) mit 100 µl Luziferasereagenz resuspendiert und das dabei emittierte Licht nach 5 s gemessen. Nach einer statistischen Auswertung konnte die optimale Effektivität bestimmt werden.

2.4.2 Proteinextraktion aus „inclusion bodies“ (IB)

Proteine können in *E. coli* angereichert und mit Ausbeuten von bis zu 100 mg/l extrahiert werden. Bei hoher Überexpression rekombinanter Proteine kommt es häufig zur Aggregation von Proteinen in „inclusion bodies“ (IB). Zur Gewinnung des nativen Proteins wurden die IB isoliert. Unter geeigneten Anreicherungs- und Präparationsbedingungen beträgt die Reinheit des Proteins in den IB $\approx 90\%$. Da die IB als Proteinaggregate eine hohe Dichte aufweisen, ist eine Isolierung durch einfache Zentrifugation möglich. Für diese Aufreinigung wurden verschiedene Methoden angewandt.

2.4.2.1 Aufschluss der *E. coli* Zellen durch Ultraschall

Eine Übernachtskultur von *E. coli* Zellen, die ein rekombinantes Protein exprimieren, wurde angeimpft. 12 h später wurden 5 ml dieser Kultur für 5 min mit 1100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 5 ml Puffer I (1 mM EDTA, 0,1 M Tris/HCl, pH 7) resuspendiert. 1,5 mg Lysozym wurden zugegeben, mit dem Ultraturrax (Labsonic 2000, Braun) gemischt und anschließend für 30 min bei 4 °C inkubiert. Während der Ultraschallbehandlung musste die Probe im Eisbad gekühlt werden, da durch die hohe lokale Energie der Scherkräfte Wärme freigesetzt wurde. Die Proben wurden in verschiedenen Zeitintervallen dem Ultraschall ausgesetzt, 1 x 30 s, 1 x 1 min und 3 x 1 min. Dabei wurde

nach jeder Minute die Probe für 1 min auf Eis gekühlt. Nach Abschluss der Ultraschallbehandlung wurde MgCl_2 (3 mM Endkonzentration) und DNase (10 $\mu\text{g/ml}$ Endkonzentration) zugegeben. Die Lösungen wurden anschließend für 30 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zugabe von 0,5 Volumen an Puffer II (60 mM EDTA, 6 % Trition X 100, 1,5 M NaCl, pH 7) mit einer erneuten Inkubation von 30 min. Danach wurde die Probe für 20 min mit 13000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit Hilfe eines Ultraturrax in 1 ml Puffer III (20 mM EDTA, 0,1 M Tris/HCl, pH 7) gelöst. Diese Probe wurde solange zentrifugiert wie beschrieben und mit dem Ultraturrax gelöst, bis eine Schaumbildung nicht mehr auftrat. Wurde dieser Punkt erreicht, war das Detergens vollständig ausgewaschen. Danach wurde die Probe aliquotiert und ein Teil auf ein SDS-PAGE-Gel zur Kontrolle aufgetragen.

2.4.2.2 Aufschluss der *E. coli* Zellen durch eine Retsch-Mühle

Im Gegensatz zur Ultrazentrifugation beruht der Zellaufschluss mit Hilfe der Retsch-Mühle auf rein mechanischen Kräften. Es wurde eine Übernachtskultur wie bei 2.4.2.1 angelegt und aufgearbeitet sowie mit Puffer inkubiert. Danach wurden 500 μl dieser Probenlösung in 2 ml Eppendorfgläser mit je 0,5 g Glasperlen gegeben. Diese Proben wurden anschließend unterschiedlichen Zeitintervallen mit der Retsch-Mühle (Tissuelyser, Qiagen) mit 25 Hz behandelt, 1 x 1 min, 1 x 5 min und 1 x 10 min. Anschließend wurden die Proben im Eisbad gekühlt. Nach Zugabe von 450 μl Puffer I wurden die Proben mit 13000 g für 3 min bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde MgCl_2 (3 mM Endkonzentration) und DNase (10 $\mu\text{g/ml}$ Endkonzentration) zugegeben. Es folgte eine Inkubation von 30 min bei RT. Nach Zugabe von 370 μl von Puffer II folgte eine Inkubation für 30 min. Anschließend wurden diese Proben für 10 min mit 13000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Puffer III aufgenommen und zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in Puffer III resuspendiert und ein Teil zur Analyse auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen.

2.4.3 Proteinextraktion aus einer eukaryontischen Zelllinie durch Zellyse

Abtryspierte Zellen wurden für 5 min mit 100 g abzentrifugiert und das Pellet in 500 μl E1A-Puffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Igepal) resuspendiert und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert und im Abstand von jeweils 5 min invertiert. Pro 100 μl enthält dieser Puffer je 1 μl DNase, 1 μl RNase und je 1 μl der Proteaseinhibitoren

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, gegen Serin- und Cysteinproteasen), Leupeptin (gegen Thiolproteasen), Pepstatin A (gegen saure Proteasen) und Aprotinin (gegen Serinproteasen). Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min mit 13000 g und bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 100 µl E1A-Puffer resuspendiert. Für eine weitere optionale Auftrennung wurde die Pelletsuspension dreimal für 20 s sonifiziert. Anschließend wurde die Suspension für 5 min mit 13000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Pr1 und das Zellpellet, dass in 100 µl E1A-Puffer resuspendiert wurde, mit Pr2 gekennzeichnet.

2.4.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums einer Proteinlösung von 465 nm nach 595 nm. Diese Verschiebung wurde durch die Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brilliantblau an Proteine hervorgerufen (Bradford, 1976). Diese Proteinbestimmung wurde mit Hilfe eines Protein Assays (Bio-Rad) durchgeführt. Die Extinktion einer proteinhaltigen Probenlösung wurde nach 10 min Inkubation bei 595 nm gegen eine proteinlose Probenlösung als Referenzwert mit einem Absorptionsmessgerät (GENios, TECAN) bestimmt. Die Probenlösung besteht aus 150 µl H₂O_{bid}, 40 µl Bradfordreagenz und 10 µl Probe. Die Proteinextinktion wurde aus dem statistischen Mittel von drei Messungen bestimmt. Zur Bestimmung der Konzentration einer unbekanntes Proteinlösung wurde diese gegen eine Rinderserumalbumin (BSA)-Eichreihe gemessen und durch lineare Regression ermittelt.

2.4.5 Proteinkonzentrierung durch Ethanol fällung

Für verschiedene Methoden, wie z. B. der WB, wurde eine definierte Proteinkonzentration benötigt. War sie zu gering, wurde die Probenlösung mit EtOH gefällt. Die Proteinlösung wurde mit dem 2,2-fachen Volumen an 96%igen EtOH resuspendiert und für 1 h bei -80 °C inkubiert. Danach wurde die Suspension für 20 min mit 13000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70%igen EtOH gewaschen und unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und die restliche Lösung bei RT durch eine Speed Vac (Speed Vac Concentrator, Intas) getrocknet. Anschließend wurde die Probe in einem geeigneten Puffervolumen resuspendiert.

2.4.6 Proteinkonzentrierung durch Trichloressigsäure (TCA)

Zu einer Proteinlösung wurde TCA zu einer Endkonzentration von 10 % (v/v) gegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert (Bennet, 1967). Im Anschluss wurde die Lösung mit 13000 g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Wasser zu einer definierten Endkonzentration resuspendiert.

2.4.7 Zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese

Proteingemische können mit der 2D-Gelelektrophorese in zwei Dimensionen aufgetrennt werden (Klose, 1975). Dabei werden die Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt in der Zweiten dagegen nach ihrem Molekulargewicht in einem Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gel aufgetrennt. Dadurch ist es möglich, das Proteom einer Zelle zu charakterisieren. Die Proteine wanderten in der ersten Dimension auf einem pH-Gradienten im elektrischen Feld so lange, bis sie ihren isoelektrischen Punkt erreicht hatten, das heißt, ihre Nettoladung gleich Null war. Der Ladungszustand der Proteine wurde dabei durch alle positiven und negativen Ladungen der Aminosäureseitenketten, die dreidimensionale Struktur, die Phosphorylierungen und die Glykosylierungen bestimmt. In dieser Arbeit wurde ein pH-Gradient in Form eines Hydrofilms (GE Healthcare) verwendet. Der verwendete Gradient war dabei von der zu untersuchenden Probe abhängig. Ein pH-Gradient von 3 bis 10 wurde für die erste Einstufung der zu erwartenden Proteine aus dem Zelllysate verwendet. Die gesuchten Proteine wurden später durch eine Einengung des pH-Bereiches genauer aufgetrennt. Als Proteingemische wurden nur zuvor gereinigte und fraktionierte Proben eingesetzt. Da das Zelllysate durch einen salzreichen Puffer aufgearbeitet wurde, mussten die Salze wieder entfernt werden, da sie verhinderten, dass die benötigte Spannung für die 2D-Gelelektrophorese aufgebaut werden konnte. Die Salze wurden durch eine Dialyse (siehe 2.1.11) entfernt. Anschließend wurden die Proteine in 120 µl Rehydrationspuffer (8 M Harnstoff, 2 % (w/v) CHAPS, 0,002 % Bromphenolblau, 0,5 % (v/v) IPG Puffer, 0,2 % (w/v) DTT) aufgenommen und für 10 min bei RT unter Schwenken inkubiert. Die IPG Strips (Immobiline DryStrip pH 3-10, GE Healthcare) wurden anschließend mit dieser Lösung beladen. Über Nacht erfolgte dann eine aktive Rehydrierung bei 50 V. Im Anschluss daran wurde ein Spannungsgradient aufgebaut. Dieser lief mit einer Gesamtlaufzeit von 9250 Voltstunden (Vh) im Ettan IPGphor II (Amersham Biosciences). Dazu wurde das folgende Programm verwendet:

1. Schritt	50 V	10 h
2. Schritt	200 V	1 h
3. Schritt	2000 V	1 h
4. Schritt	3000 V	7000 Vh
5. Schritt	10 V	5 h

Der 5. Schritt diente dazu, dass die Proteine nicht ungewollt bis zur weiteren Verwendung diffundierten. Die Strips wurden jetzt entweder bei -80 °C eingefroren oder sofort für ein SDS-PAGE-Gel aufgearbeitet. Dazu wurden die Strips mit 10 ml Equilibrierungspuffer (6 M Harnstoff, 2 % SDS, 30 % Glycerin, 0,002 % Bromphenolblau, 50 ml Tris/HCl, pH 8,8) und mit 1 % (w/v) DTT versetzt und für 30 min und 100 rpm im Schwenkschüttler equilibriert. Anschließend wurde der Equilibrierungspuffer mit 2,5 % (w/v) Jodacetamid versetzt und die Strips für 30 min und 100 rpm alkyliert. Danach wurden die Strips in ein SDS-Gel eingelegt und die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Damit keine Luftblasen die Gelelektrophorese störten, wurde die Geltasche vor dem Beladen mit dem Gelstrip mit einer 0,4%igen (w/v) Agaroselösung in SDS-Laufpuffer überschichtet.

2.4.8 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist ein diskontinuierliches Proteintrennungsverfahren im elektrischen Feld (Laemmli, 1970). Die Proteine werden, wie zuvor beschrieben, dabei nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Proteinproben die nicht fokussiert wurden, mussten nach ihrer Aufarbeitung mit Dithiothreitol (DTT) und SDS im Probenpuffer versetzt werden, so dass diese anionischen Detergenzien nach dem Erhitzen der Probe auf 85 °C die Proteine umschließen und diese negativ beladen. Die entstehende Nettoladung ist bei allen so behandelten Proteinen gleich, so dass die Proteine nur nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe wandern im elektrischen Feld zur Anode, wobei die jeweilige relative Laufstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes ist.

Für die Trennung von Proteinen wurde das Mini-PROTEAN 3 System (Bio-Rad) genutzt. Dieses System ermöglichte die Trennung der Proteine auf einer 1 mm dicken und 7 cm langen Gellaufstrecke. Die verwendeten Gele bestanden dabei aus zwei Teilen mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen, einem 12%igem Trenngel mit darüber liegendem 4%igem Sammelgel. Zur Polymerisation der Gele wurde N,N,N,N-Tetramethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) verwendet. Die Anzahl der Probetaschen im Sammelgel wurde durch die aufgetragene Proteinkonzentration bestimmt. Die Proteine wurden in

Lithiumdodecylsulfat (LDS)-Probenpuffer (141 mM Tris Base, 2 % LDS, 10 % Glycerin, 0,51 mM EDTA, 0,22 mM SERVA Blue G250, 0,175 mM Phenol Rot, 106 mM Tris/HCl, pH 8,5) aufgenommen und für 15 min bei 95 °C inkubiert. Als Laufpuffer wurde ein MOPS-Puffer (1 M MOPS, 1 M Tris Base, 0,0205 M EDTA) verwendet. Für das Sammelgel wurde eine konstante Spannung von 100 V und für das Trenngel 200 V angelegt. Nach 1 h wurde die Elektrophorese beendet. Die aufgetrennten Proteine wurden nun entweder auf eine Membran transferiert und über einen ECL-Blot detektiert oder aber mit Coomassie-Brilliantblau im Gel angefärbt. Bestimmte Spots wurden bei der 2D-Gelelektrophorese ausgeschnitten und durch die Massenspektrometrie bestimmt.

2.4.9 Western Blot durch Elektrotransfer

Zum Blotten eines SDS-Gels wurde das Invitrogen XCell II Blot Modul verwendet. Alle verwendeten Materialien wurden im Blotpuffer getränkt. Auf zwei Lagen eines Schaumstoffes wurden drei Lagen 3 mm dickes Filterpapier (Whatman) gelegt. Darüber wurde das SDS-PAGE-Gel luftblasenfrei aufgelegt. Auf dieses Gel wurde eine entsprechend der Gelgröße zurechtgeschnittene Nitrozellulosemembran (NZM) mit einer Porengröße von 0,2 µm (Schleicher & Schuell) luftblasenfrei auflegt. Dann wurde eine Lage 3 mm dickes Filterpapier darüber gelegt und von der Mitte des Blots alle eventuellen Luftblasen mit einer Stripette zum Rand herausgedrückt. Im Anschluss daran wurden wiederum zwei Lagen 3 mm dickes Filterpapier und zwei Lagen Schaumstofftuch aufgelegt. Dieses so genannte „Sandwich“ wurde in eine Blotkammer eingeklemmt und diese mit 5 % Transferpuffer (0,5 M Bicine, 0,0205 M EDTA, 0,5 M Tris/HCl), 20 % Methanol und 75 % Wasser aufgefüllt. Da die Proteine in dem Gel durch das SDS negativ geladen waren, musste die NZM an der Anode liegen. Der Transfer der gebundenen Proteine erfolgte anschließend von der Kathode zur Anode. Für den Transfer wurden 30 V für 1 h angelegt. Um den vollständigen Transfer zu prüfen, wurde anschließend das SDS-PAGE-Gel mit Coomassie-Blau angefärbt.

2.4.10 Immundetektierung mit dem ECL-System

Die NZM wurde nach dem Blotten für 1 h mit 5 % (w/v) Milchpulver in PBST (MPBST) bei 37 °C inkubiert und anschließend dreimal für 5 min mit einem 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS Puffer (PBST) gewaschen. Anschließend wurde die NZM mit einem 1:2000 verdünnten murinen anti-PrP Antikörpermix (mAk-mix) in MPBST für 2 h inkubiert. Der anti-PrP mAk-

mix bestand aus einer Mischung aus 6 gegen das PrP gerichtete Maus-IgG mAbs, diese waren das 3B5, 4F2, 8G8, 11C6, 12F10 und das 14D3 (Krasemann *et al.*, 1996; Krasemann *et al.*, 1999). Danach wurde die NZM dreimal für 5 min mit 0,1 % PBST Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit einem 1:10000 verdünntem Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierten Ziege anti-Maus IgG Ak in MPBST inkubiert. Danach wurde die NZM fünfmal für 5 min mit 0,1 % PBST Puffer und zweimal für 7 min mit PBS Puffer gewaschen. Zum Entwickeln der NZM wurde sie in eine ECL-Folientasche gelegt und im Dunkeln mit 2 ml einer 1:1 Mischung zweier Substratlösungen inkubiert. Die Substratlösung 1 (2,5 M Luminol, 0,4 M p-Cumarinsäure, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0) und Substratlösung 2 (0,09 % (v/v) H₂O₂, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0) wurden direkt vor der Anwendung miteinander gemischt. Diese Lösung wurde 1 min auf der NZM inkubiert, bevor die überschüssige Lösung mit einer Stripette durch Rollen weggedrückt wurde. Ein Detektionsfilm (Hyperfilm, Amersham Biosciences) wurde anschließend für 10 s bis 5 min belichtet und mit dem Filmentwicklungsgerät Kodak Elite Chrome 400 entwickelt. Wenn mit dem bloßen Auge schon eine Lumineszenz beobachtet werden konnte, reichte ein kurzes Auflegen des Films auf die NZM. Reichte diese Belichtungszeit nicht aus, so wurde der Film über Nacht belichtet und am nächsten Tag entwickelt. Konnten immer noch keine Banden erkannt werden, wurde die Membran mit einer 0,1 M Glycinlösung, pH 2,9 abgestrippt und die Immundetektierung mit erhöhten Antikörperkonzentrationen und längeren Inkubationszeiten wiederholt.

2.4.11 Coomassie-Blaufärbung von SDS Gelen

Proteine in SDS-Gelen wurden mit der Coomassie-Blaufärbung nachgewiesen. Dabei bindet sich der Farbstoff an die Proteine, nicht aber an die Gelmatrix. Für die Färbung wurde kolloidales Brilliantblau G (Sigma) verwendet. Das Gel wurde nach der Elektrophorese für 60 min mit 40 % (v/v) EtOH und 10 % (v/v) Essigsäure in H₂O_{bid} fixiert. Danach wurde das Gel zweimal mit 100 ml H₂O_{bid} gewaschen und für 12 h in der Färbelösung inkubiert. Diese bestand aus 20 ml des kolloidalen Brilliantblau, 20 ml Methanol und 60 ml H₂O_{bid}. Nach der Inkubation wurde das Gel so lange mit 1%iger (v/v) Essigsäure gewaschen, bis nur noch die blaugefärbten Proteine und keine unspezifischen Banden zu erkennen waren (Neuhoff, 1985). Das entfärbte Gel wurde anschließend eingeschweißt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die so angefärbten Proteine konnten für eine massenspektrometrische Analyse verwendet werden, da der Farbstoff diese Analysemethode nicht beeinträchtigt und die Detektionsgrenze der Färbemethode bei 30 ng liegt.

2.4.12 Ponceau-Rotfärbung von Nitrozellulosemembranen

Die Ponceau-Rotfärbung ist eine reversible Proteinfärbemethode auf Nitrozellulose- und Zellulosemembranen, die nachfolgende Nachweismethoden wie den WB nicht beeinträchtigt. Die Membran wurde in der Ponceau-Rotlösung (2 % (w/v) Ponceaurot in 3 % (v/v) TCA) für 3 min bei RT inkubiert und dann viermal mit 100 ml H₂O_{bid} so lange gewaschen, bis nur noch die Proteinbanden rot gefärbt waren. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei 50 ng (Li *et al.*, 1989). Die gefärbten Banden auf der Membran wurden eingescannt und mit dem Ergebnis des WB verglichen. Damit die Membran erneut verwendet werden konnte, wurde sie bis zur vollständigen Entfärbung mit H₂O gewaschen.

2.4.13 Aufarbeitung von Gewebematerial

Von einem zu untersuchenden Gewebematerial wurde das Gewicht bestimmt und mit Hilfe eines Zellschredders (Qiagen) durch schrittweise Zugabe von Tris-Puffer (100 mM KCl, 320 mM Saccharose, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5) zu einem 10%igem (w/v) Homogenat verarbeitet. Da es während der Homogenisierung zu Wärmeentwicklung und Autolyse kam, wurden alle Arbeiten bei 4 °C durchgeführt.

2.4.14 TSE-Infektion von eukaryontischen Zellen

Da mit TSE-Erregern nur im S3 Labor gearbeitet werden darf, wurden alle Arbeiten in diesem Bereich durchgeführt. Ansonsten wurden die Zellen unter den gleichen Bedingungen gehalten wie die nicht infizierten. Sobald eine Zellkulturflasche zu 80 % bewachsen war, konnte sie infiziert werden. Dazu wurde ein 10%iges (w/v) Hirnhomogenat für 20 min bei 80 °C erhitzt und anschließend durch gründliches Vortexen gemischt (Lehmann *et al.*, 2005). Danach wurde das Medium der Zellen entfernt und die Zellen mit 1 % (w/v) BSE-Hirnhomogenat in Bezug auf das uninfizierte Zellkulturmedium für 5 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach 5 h wurde dieses Medium entfernt und in uninfiziertem Zellkulturmedium weiter kultiviert. Nach 2 Tagen weiterer Kultivierung wurden die Zellen getestet, ob eine BSE-Infektion vorlag. Für eine WB Analyse wurden die Zellen geerntet und entweder sofort aufgearbeitet oder bei -80 °C gelagert. Alle anderen PrP Detektionsmöglichkeiten, wie z. B. die FACS Analyse, erforderten, dass die Zellen sofort verwendet werden mussten. Zur Untersuchung der Infektionsstabilität wurden die Zellen passagiert, indem sie bei einer

erreichten Konfluenz von 80 % im Verhältnis 1:5 gesplittet wurden. Das Pellet wurde eingefroren und mit den späteren Passagen verglichen.

2.4.15 Proteinase K (PK) Verdau von infizierten Proben

Da das PrP^C PK sensitiv und das PrP^{Sc} PK resistent ist, wurde der PK Verdau zum Nachweis von PrP^{res} verwendet. Die PK Resistenz des PrP^{Sc} variierte dabei in Abhängigkeit von der verwendeten PK und des PrP^{Sc} Materials. Aus diesem Grund wurden verschiedene Konzentrationen und Inkubationszeiten untersucht. Dazu wurden 20 µg bis 50 µg Protein mit PK Puffer (1 mM CaCl₂, 0,5 % (w/v) SDS, Tris/HCl, pH 7,8) versetzt und für 5, 10, 20, 30, 45 und 60 min bei 37 °C verdaut. Die eingesetzten PK Mengen variierten dabei von 0,01 µg/ml bis 500 µg/ml. Der PK Verdau wurde mit 0,1 M PMSF in Isopropanol gestoppt. Anschließend wurden die Proben im LDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen

2.4.16 Trennung von PrP^C und PrP^{Sc} durch „immobilised metall affinity chromatography“ (IMAC)

Da sich die beiden PrP Isoformen in der Fähigkeit Kupfer zu binden unterscheiden, wurde eine Affinitätschromatographie benutzt, um sie zu trennen. Die dabei verwendete Form war die IMAC. In der IMAC-Säule binden aromatische Aminosäuren, hauptsächlich Histidin, zweiwertige Metallionen durch Chelatkomplexierung. Die Ablösung dieses Komplexes hängt dabei von der Dissoziationskonstante ab. Diese ist abhängig von der Ladungszahl des Metallions und vom aromatischen Charakter der Aminosäure. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte dann durch eine Absenkung des pH-Wertes und durch eine Komplexbindung mit einem anderen Chelator, wie z. B. EDTA.

Für die Trennung der PrP Isoformen wurden 5 ml Säulen (Amersham Biosciences) mit „*fast flow chelating sepharose*“ als Säulenmatrix verwendet. Diese wurden mit 15 ml H₂O_{bid} gewaschen und mit Kupferionen durch 5 ml einer 0,1 M CuSO₄-Lösung beladen. Um nicht gebundene Ionen zu entfernen, wurde die Säule mit 50 ml H₂O_{bid} gewaschen. Anschließend erfolgte die Equilibrierung durch 25 ml Waschpuffer (500 mM KCl, 1 mM Imidazol, 20 mM Tris/HCl, pH 8,0) und danach mit 50 ml Equilibrierungspuffer (1 % Octylglykopyranosid in Waschpuffer). Im Anschluss wurde der Überstand von in Tris-Puffer solubilisierten (siehe 2.4.17) und zentrifugierten Proteinen auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die

Säule für 1 min mit 13000 g zentrifugiert. Danach wurde zur Entfernung unspezifischer gebundener Proteine die Säule mit 15 ml Waschpuffer gewaschen. Gefolgt von der Elution der spezifisch gebundenen Proteine durch 15 ml Elutionspuffer (0,1 M EDTA in Waschpuffer). Zur Entfernung noch nicht verdrängter Proteine von der Säule, wurden diese mit 0,5 M EDTA in Waschpuffer gewaschen. Die Säule wurde anschließend regeneriert und konnte erneut verwendet werden. Wasch-, Durchlauf- und Elutionsfraktionen wurden in jeweils 2 ml Fraktionen gesammelt und analysiert. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde anschließend bestimmt und jeweils 30 µg auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.4.17 Solubilisierung von Proteinen

Für die IMAC konnten nur gelöste Proteine verwendet werden, da sonst die Poren des Säulenmaterials verstopfen würden. Aus diesem Grund mussten diese Proteine solubilisiert werden. Die Proteine wurden dabei entweder aus der Zellkultur, aus *E. coli* oder aus Hirnmaterial gewonnen. Dabei lag das Probenmaterial infiziert oder uninfiziert vor. Zur Solubilisierung wurde das Material bei 4 °C aufgetaut und anschließend für 15 min mit 700 g und 4 °C zentrifugiert. Die Angaben der Mengen beziehen sich hier jeweils auf 1 Gramm Material. Wurde weniger Material eingesetzt, wurde entsprechend weniger Puffer verwendet. Der Überstand wurde bei -80 °C eingefroren und das Pellet mit 3 ml 10 % (w/v) Octylglykopyranosid resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension durch Zugabe von 15 ml Tris-Puffer auf 2 % (w/v) Octylglykopyranosid verdünnt. Zu dieser Suspension wurden je 10 µl der Proteinaseinhibitoren Pepstatin A, Leupeptin und PMSF mit je einer Konzentration von 1 µg/µl zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Suspension wurde am nächsten Tag für 2 min mit 10000 g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und wie bereits beschrieben zentrifugiert. Dieser Überstand wurde jetzt für die IMAC eingesetzt. Zur Überprüfung wurde nach jedem Zwischenschritt eine Probe entnommen und auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen.

2.4.18 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Darstellung fluoreszierender Proteine in Zellen wurde die Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Die zu untersuchende Zellkultur wuchs auf einem 15 mm x 15 mm großen Deckgläschen an, das auf dem Boden einer Zellkulturplatte lag. Nach Erreichen einer Konfluenz von 90 %, wurde die Zellkultur zur Entfernung abgestorbener Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Deckgläschen verkehrt herum mit einer

Konservierungslösung aus 10 % Glycerin und 90 % PBS auf einem Objektträger an den Rändern mit Klarlack fixiert. Dieser Objektträger wurde anschließend im Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX70) betrachtet und mit dem Kamerasystem Zeiss Axioskop VisiTron Systems dokumentiert. Damit eine Fluoreszenz beobachtet werden konnte, wurden die Zellen mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, dabei konnte eine Emission bei 530 nm für grün fluoreszierende Chromophore beobachtet werden. Anschließend wurden die Bilder mit dem Programm Spot (Diagnostic Instrument) ausgewertet.

2.4.19 Immunfluoreszenzmikroskopie von PrP^C exprimierenden Zelllinien mit monoklonalen Antikörpern (mAK)

Zur Detektion von PrP in Zellkulturen wurde die Immunfluoreszenz eingesetzt. Dafür wurde eine Zellkonfluenz von 90 % benötigt. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Medium abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie durch Inkubation mit Aceton/Methanol im Verhältnis 1:1 (v/v) für 30 s permeabilisiert und fixiert. Die Lösung wurde abgenommen und zweimal mit PBS für 5 min gewaschen. Danach wurde mit dem murinen anti-PrP mAk-mix in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS für 1 h bei 37 °C unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde der Ak abgenommen und zweimal mit 3 % FCS (v/v) in PBS gewaschen. Der sekundäre Ak, ein Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugierter Ziege anti-Maus IgG2 in einer Verdünnung von 1:2000 wurde zugegeben und für 1 h im Dunkeln bei 37 °C unter Schwenken inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ak abgenommen und zweimal mit 3 % FCS (v/v) in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und dokumentiert.

2.4.20 Durchflusszytometrie zur Detektion von PrP^C und PrP^{Sc}

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie („*fluorescence activated cell sorting*“, FACS) können Zellen ohne Markierungen auf Eigenschaften wie Größe und Granularität analysiert werden. Dies geschieht durch einen Detektor und einen Laserstrahl. Werden die Zellen oder aber Teile von ihnen mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie FITC, DAPI oder Alexa markiert, können ihre Fluoreszenzeigenschaften gemessen werden. In dieser Arbeit wurde die FACS Analyse zur Detektion von PrP^C und PrP^{Sc} in verschiedenen Zelllinien mit Hilfe von FITC markierten anti-Maus Sekundärantikörpern verwendet. Der FITC Farbstoff wird mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und emittiert bei einer Wellenlänge von 530 nm grünes Licht. Die dabei

entstandenen Emissionskurven wurden zur Analyse der PrP Expression in der Zellkultur verwendet.

Sollte die Expression im Zellkern mit betrachtet werden, wurde 0,3%iges (v/v) Trition X 100 zur Permeabilisierung der Zellmembran und des Zellkerns verwendet. Wurden die Zellen nur intrazellulär betrachtet, wurde Saponinpuffer (0,5 % (w/v) Saponin in PBS) statt Trition X 100 verwendet, da Saponin nur die Zellmembran permeabilisiert und nicht die Zellkerne. Wurde nur die Oberfläche der Zellen untersucht, wurde keine dieser beiden Permeabilisierungsreagenzien eingesetzt.

Für die FACS Analyse wurden 1×10^6 Zellen verwendet, diese wurden von der Zellkulturflasche abtrypsiniert und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch Resuspension in 200 μ l Formaldehydpuffer (4 % (v/v) in PBS) fixiert und für 8 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit 100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet weiter verwendet. Zu dem Pellet wurden 200 μ l Saponinpuffer zugegeben und für 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend wiederum für 5 min mit 100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zu dem Pellet wurden 100 μ l Primärantikörperlösung, ein Maus anti-PrP mAk-mix zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Suspension wie beschrieben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet anschließend zur Entfernung des restlichen ungebundenen Ak mit 500 μ l PBS gewaschen und zentrifugiert. Zum Pellet wurden 100 μ l Sekundärantikörperlösung, eine FITC konjugierter Ziege anti-Maus Ak-Lösung, zugegeben und im Dunkeln für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension wie bereits beschrieben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet anschließend zur Entfernung des restlichen nicht gebundenen Ak noch zweimal mit 500 μ l PBS gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 100 μ l 0,5 % (w/v) BSA in PBS resuspendiert und im FACS gemessen.

Vorversuche wurden mit uninfizierten Proben in einem LSR II Durchflusszytometer (BD Bioscience) am Deutschen Primatenzentrum durchgeführt und infizierte Proben wurden mit einem FACS Calibur (Becton Dickinson) am Primatenzentrum des Paul-Ehrlich-Institutes, der Bundesbehörde für Seren und Vakzine in Langen gemessen. Mit den Programmen CellQuest 3.3 und FlowJo (Tree Star) wurden die Daten ausgewertet. Zur Vermeidung von Fehlinterpretationen bei der Auswertung mussten die in der Tab. 5 angegebenen Negativkontrollen mitbestimmt werden.

Tab. 5 Negativkontrollen der FACS Messung

Nr.	Zellen	prim. AK	sek. AK
1	+	-	-
2	+	-	+
3	+	+	Isotyp
4	+	+	anti-Kaninchen
5	+	+	+

Die Probe 1 wurde zur Ermittlung der Eigenfluoreszenz der Kontrollzelllinie benötigt, die Probe 2 zur Bestimmung unspezifischer Bindungen des zweiten Ak an diese Zellen. Zur Analyse der Spezifität der Bindung des zweiten Ak an den ersten Ak wurden die Proben 3 und 4 benötigt. Als Vergleich zur untersuchenden Zellkultur wurde die Probe 5 verwendet.

2.4.21 Sekundärstrukturanalyse von Proteinen durch Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Mittels der CD-Spektroskopie können Wechselwirkungen chiraler Substanzen mit zirkular polarisiertem Licht in Abwesenheit eines magnetischen Feldes detektiert werden. Im Gegensatz zu linear oder planar polarisiertem Licht, bestehend aus links- und rechtszirkular polarisiertem Licht gleicher Intensität, besteht ein zirkular polarisierter Lichtstrahl aus zwei planaren, senkrecht zueinander polarisierten und um 90° phasenverschobenen Lichtstrahlen. Je nach Polarisation, links- oder rechtszirkular, rotiert der elektrische Vektor dabei um die Richtungsachse. Der CD ist dabei als die Differenz der Absorption ΔA von links- (A_{lcp}) und rechtszirkular (A_{rcp}) polarisiertem Licht definiert (Fasman, 1996):

$$\Delta A = A_{lcp} - A_{rcp} = \varepsilon_{lcp} c \cdot l - \varepsilon_{rcp} c \cdot l = \Delta \varepsilon c \cdot l$$

Hierbei bezeichnen ε die jeweiligen dekadischen molaren Extinktionskoeffizienten, c die Molarität des Analyten und l die optische Weglänge. Für den dekadischen molaren CD $\Delta \varepsilon$ gilt somit:

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_l - \varepsilon_r$$

Moderne, kommerziell erhältliche CD-Spektrometer bestimmen die allgemein sehr niedrigen Werte von ΔA mittels einer Modulationstechnik und können zuverlässige Werte von $\Delta \varepsilon$ liefern. Besonders in der biochemischen Literatur wird jedoch eine traditionellere Methode verwendet. Diese basiert auf der Tatsache, dass planar polarisiertes Licht beim Durchgang durch ein zirkulardichroisches Medium aufgrund der unterschiedlichen Absorption der beiden

zirkularen Komponenten in elliptisch polarisiertes Licht konvertiert wird. Dabei beschreibt die Spitze des elektrischen Vektors weder eine oszillierende noch zirkular rotierende Bahn um die Richtungsachse. Von dieser „elliptischen“ Form des elektrischen Vektors wurde die Bezeichnung „Elliptizität“ (θ) abgeleitet. Diese ist anhand der jeweiligen Ausrichtung und Amplitude ihrer beiden zirkularen Komponenten beschreibbar. Es gilt dabei:

$$\theta \text{ (deg)} = 180 \ln 10 \Delta A / 4\pi = 32,98 \Delta A$$

Somit ist θ linear abhängig vom CD. Um die Abhängigkeit von Pfadlänge und Konzentration zu eliminieren und so zu standardisierten Werten zu gelangen, wird die molare Elliptizität $[\theta]$ definiert:

$$[\theta] = 100 \theta / cl = 3298 \Delta \epsilon$$

CD-Spektren von Proteinen werden auch als „Aminosäurereste bezogene Elliptizität“ ($[\Theta]_{MRW}$) angegeben:

$$[\Theta]_{MRW} \text{ (deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}) = (\Theta M_r) / (10 c l N_A)$$

mit:

Θ - gemessenes Signal (mdeg)

M_r - Molare Masse des Proteins

N_A - Anzahl der Aminosäuren des Proteins

Hierbei ist zwischen Nah- und Fern-UV-CD-Spektren zu unterscheiden. Bei ersterem (250-300 nm) wird die Chiralität der Umgebung aromatischer Aminosäuren detektiert, die im Allgemeinen mit der nativen Tertiärstruktur von Proteinen verbunden ist.

Für die Analyse der Proteinsekundärstruktur wird das Fern-UV-CD-Spektrum von 180 bis 250 nm benötigt, da in diesem Bereich die $n \rightarrow \pi^*$ und die $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergänge der Carbonylgruppe der Säureamidbindung liegen. Aufgrund der Chiralität der Peptidbindungen ist daher das CD-Spektrum eine Möglichkeit der Sekundärstrukturanalyse. Für die Strukturanalyse eines unbekanntes Peptides/Proteins wird das CD-Spektrum gemessen und anschließend mit einer mathematischen Linearkombination der CD-Spektren von Proteinen mit bekanntem Anteil ungeordneter, α -helikaler und β -Faltblattstrukturen angepasst. Aus der Anpassung der Sekundärstrukturkomponenten erhält man dann die jeweiligen Anteile für das unbekanntes Protein und kann so Rückschlüsse auf dessen Sekundärstruktur ziehen.

Für die CD-Spektroskopie wurde jeweils 1 mg einer Proteinprobe untersucht. Die Probe wurde in CD-Puffer gelöst (10 mM Tris, 100 mM KCl, 320 mM Saccharose, 10 % Glycerin, 0,01 % NP40, pH 7,5) und bei 10 °C mit einer 1 mm Küvette im J-810 Spektropolarimeter (Jasco) gemessen. Die CD-Spektroskopie wurde in der Abteilung Enzymologie der Biochemischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durch Herrn Dipl. Biochem. Knut Kölbl durchgeführt.

2.4.22 Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)

Unter Massenspektrometrie (MS) versteht man die Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, die einen Strahl gasförmiger Ionen erzeugt. Diese werden durch einen Massenanalysator nach ihrem Masse/Ladungs Quotient, der an einem Detektor abgelesen werden kann, aufgetrennt. Um ein Proteingemisch zu analysieren, musste es dazu auf einer Matrix zur Kristallisation gebracht werden. Dieses wird anschließend im Vakuum einem intensiven Laserimpuls ausgesetzt. Dabei kommt es zur Freisetzung der Energie wobei ein Teil der Matrix mit der Probe schlagartig verdampft und ionisiert wird. Im elektrischen Feld werden die geladenen Ionen nach ihrer Flugzeit in einem Messrohr in Verbindung mit einer gepulserten Ionenerzeugung („*time-of-flight*“, TOF) detektiert. So können Proteine mit verschiedenen Molekulargewichten auf Grund ihrer zeitversetzten Detektion durch ihr spezifisches Masse/Ladungsverhältnis bestimmt werden.

Verschiedene Zelllinien mit und ohne PrP^C Expression wurden für ein 2D-SDS-PAGE-Gel aufgearbeitet. Das entstandene 2D-Gel wurde mit einer Coomassie-Blaufärbung angefärbt und bestimmte Proteine nach dem Vergleich der Gelbilder ausgestanzt und analysiert durch eine MALDI-TOF-MS von Dr. Olaf Jahn in der Arbeitsgruppe Proteomics am MPI für experimentelle Medizin in Göttingen. Dort wurden die Proteinproben zuerst mit Trypsin in Peptidfragmente gespalten, dies geschah durch einen In-Gelverdau im Genesis ProTeam 150 Advanced Digest (Tecan) automatisch. Anschließend wurden die Proben auf eine α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure-Matrix beladen (Jahn *et al.*, 2006). Diese Proben wurden anschließend mit einer Laserintensität bei einem Masse/Ladungsverhältnis von 500 bis 4000 ionisiert. Von jeder Probe wurden jeweils 25 Messpunkte analysiert. Diese wurden im Ultraflex I MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics) bestimmt. Die erhaltenen Fragmente wurden mit dem Programm BioTools 3.0 (Bruker Daltonics) identifiziert. Dabei wurden die Peptidmassen mit den theoretischen Massenlisten aus der Proteindatenbank verglichen. Es

handelte sich dabei um Daten, die bei einem theoretischen Verdau „*in silico*“ mit den verwendeten Proteasen aller bekannten Proteine ermittelt werden konnten. Durch einen Vergleich mit der Entrez NCBI Proteindatenbank wurden diese verifiziert.

2.5 Materialien

2.5.1 Material

Material	Firma	Kat. Nr.
0,025 µm Dialysemembran	Millipore	VSWP01300
0,2 µm Protran NZM	Schleicher & Schuell	FD0262-1
12 Well Platte	Greiner	665180
6 cm Zellkulturschale	Greiner	628160
6 x Loading Dye	Fermentas	R0611
75 cm ² Zellkulturflasche	Greiner	658170
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad	500-0006
Filterpapier	Whatman	3030-6185
GeneRuler 1 kb-Ladder	Fermentas	SM0311/2/3
GeneRuler 100 bp-Ladder	Fermentas	SM0321/2/3
Halbmikro Einmalküvetten	Ratiolab	Nr. 2712010
Hyperfilm	Amersham Biosciences	RPN 3103K
Kryobox	Nalgene	5100
Kryoröhrchen	Nalgene	5000
pH Strips 3-10	GE Healthcare	17-6001-11
SeeBlue Plus2	Invitrogen	LC5925

2.5.2 Antibiotika

Amphotericin B	Sigma	A-2411
Ampicillin	Boehringer Mannheim	835269
Blasticidin S HCl	Invitrogen	46-1120
Doxycyclin	Sigma	D-9891
Hygromycin B	Sigma	H-0654
Neomycin	Serva	30250
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech GmbH	P06-07100
Tetracyclin	Sigma	T-3383

2.5.3 Antikörper

POD/Ziege anti-Maus IgG	Dianova	115-035-003
FITC/Ziege anti-Maus IgG2	Dianova	115-095-003
mAk anti-Maus IgG	DPZ	aus Hybridomakulturen

2.5.4 Proteaseinhibitoren

Pepstatin A	Sigma	P4265
Leupetin	Sigma	L0649
Aprotenin	Sigma	A3428
PMSF	Carl Roth GmbH	6367.1

2.5.5 Kulturmedien

Agar	Difco Laboratories	0140-07-4
DMEM	PAN Biotech GmbH	P04-02500
RPMI 1640	PAN Biotech GmbH	P04-18500
FCS	PAN Biotech GmbH	3302-P250316
L-Glytamin	PAA Laboratories GmbH	M11-004
Trypsi/EDTA	PAN Biotech GmbH	P10-023100
Hefe-Extrakt	Carl Roth GmbH	2363.2
Bacto-Trypton	Carl Roth GmbH	8952.2

2.5.6 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Merck	8.05740.0250
30%ige H ₂ O ₂ Lösung	Merck	822287
Acrylamid	Sigma	A-3553
Agarose	Carl Roth GmbH	3367.3
APS	Sigma	A3678
ATP	Sigma	A6419
Bicine	Sigma	B3876-2509
Bis-Tris	Sigma	B 9754
Bromphenolblau	Merck	1.08122.0025
CaCl ₂	Merck	A428388
DMSO	Merck	1.02952.1000
DNase	Sigma	D-4138
DOC	Merck	1.06504.0100
DTT	AppliChem	A2948.0025
EDTA	Carl Roth GmbH	8040.2
Essigsäure	Merck	1.00063.1000
Ethanol	Carl Roth GmbH	9065.2
Ethidiumbromid	Applichem	A1152.0025
Formaldehyd	Sigma	25.254-9
Glycerin	Carl Roth GmbH	3783.1
Glycin	Carl Roth GmbH	3908.3
Guanidin HCl	Carl Roth GmbH	0037.1
HCl	Merck	1.00317.100
Hepes	Carl Roth GmbH	9105.3
Isopropanol	Merck	1.09634.2500
KCl	Merck	4936-1000
Kolloidales Brilliant Blau G	Sigma	B-2025
LDS	Invitrogen	NP0008
Luminol	Sigma	A8511
Lysozym	Eurogentec	ME-0510-10
Methanol	Carl Roth GmbH	4627.2

Methylenblau	Riedel De Haën AG	28514
MgCl ₂	Merck	8.14733.0500
Milchpulver	Carl Roth GmbH	T145.1
MOPS	Carl Roth GmbH	6979.3
N,N,-Methylenbisacrylamid	Gibco	15516-016
Na ₂ EDTA	Merck	1.08418.1000
Na ₂ HPO ₄	Merck	1.06585.5000
Na-Acetat	Merck	TA644068
NaCl	Carl Roth GmbH	3957.1
NaH ₂ PO ₄	Merck	1.06346.1000
NaOH	Carl Roth GmbH	6771.2
Natriumacetat	Merck	T-644068
Noniden P40	Sigma	I3021
o-Phosphorsäure	Merck	1.00565.0500
p-Cumarinsäure	Merck	8.00237.0010
Phenol Rot	Sigma	P3532
Polybren	Aldrich	10-768-9
Proteinase K	Roche	03115879001
RNase A	Qiagen	1018048
Saccharose	Merck	K31517487
Saponin	Sigma	024K2505
SDS	Merck	8.22050.1000
TCA	Carl Roth GmbH	8789
TEMED	Carl Roth GmbH	2367.3
Tricine	Carl Roth GmbH	6977.1
Tris Base	Sigma	T1503
Tris	Carl Roth GmbH	4855.3
Triton X 100	Merck	1.08603.1000
Trypanblau	Merck	K13268032
Tween-20	Merck	8.17072.1000
Xylencyanol	Merck	1.10590.0005

2.5.7 Medien

LB-Medium: Das Medium musste nach der Herstellung autoklaviert werden, danach wurde das Medium bei RT bis zur Verwendung gelagert.

10,00 g	Bacto - Trypton
5,00 g	Hefe - Extrakt
10,00 g	NaCl
ad. 1,00 l	H ₂ O

LB-Platten: Das Medium wurde autoklaviert und danach auf eine Temperatur von 56 °C abgekühlt. Anschließend wurden die Platten gegossen. Danach folgte eine Lagerung der Platten bei 4 °C bis zur ihrer weiteren Verwendung. Für LB-Amp Platten wurde zusätzlich noch 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) zugegeben, allerdings erst nach dem Abkühlvorgang.

	10,00 g	Bacto-Trypton
	5,00 g	Hefe-Extrakt
	10,00 g	NaCl
	15,00 g	Agar
	ad. 1,00 l	H ₂ O
Zellkulturmedium:	500,00 ml	DMEM oder RPMI 1640
	10,00 % (v/v)	FCS
	1,00 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin 100 µg/ml
Zelleinfriermedium:	65,00 % (v/v)	Medium entsprechend der Zelllinie
	25,00 % (v/v)	FCS
	10,00 % (v/v)	DMSO
Gewebehomogenat:	10,00 % (w/v)	Gewebe in 100 mM Tris-Puffer

2.5.8 Lösungen

Proteinase K Stammlösung:	10,00 % (v/v)	Glycerin
	40,00 mg/ml	Proteinase K
	100,00 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	25,00 mM	CaCl ₂
mAk-mix:	Eine Mischung aus 6 (3B5, 4F2, 8G8, 11C6, 12F10 und 14D3) im gleichen Verhältnis gegen das PrP gerichteten mAks, aus Hybridomakulturen, am DPZ gewonnen.	
CD-Puffer:	10,00 mM	Tris
	100,00 mM	KCl
	320,00 mM	Saccharose
	10,00 % (v/v)	Glycerin
	0,01 % (v/v)	NP40, pH 7,5
Tris-Puffer:	100,00 mM	KCl
	320,00 mM	Saccharose
	10,00 mM	Tris/HCl, pH 7,5
Lysis-Puffer für PK Verdau:	100,00 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	100,00 mM	NaCl
	10,00 mM	EDTA
	0,50 % (v/v)	NP 40
	0,50 % (w/v)	DOC
	ad. 100,00 ml	H ₂ O
Rehydrationspuffer:	8,00 M	Harnstoff
	2,00 % (w/v)	CHAPS
	0,50 % (v/v)	IPG Puffer
	0,20 % (w/v)	DTT
	0,02 % (w/v)	Bromphenolbau

Equilibrierungspuffer:	6,00	M	Harnstoff
	2,00	% (w/v)	SDS
	50,00	ml	Tris/HCl, pH 8,8
	30,00	% (v/v)	Glycerin
	0,02	% (w/v)	Bromphenolbau
Saponinpuffer:	0,50	% (w/v)	Saponin in PBS
10 x Probenpuffer:	50,00	% (v/v)	Glycerin
	0,25	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,25	% (w/v)	Xylencyanol
10 x TAE-Laufpuffer:	0,40	M	Tris, pH 8,0
	0,01	M	EDTA
	0,20	M	Essigsäure
1 x T4-Ligationspuffer:	30,00	mM	Tris/HCl, pH 7,8
	10,00	mM	MgCl ₂
	10,00	mM	DTT
	0,10	mM	ATP
Puffer I:	1,00	mM	EDTA
	100,00	mM	Tris/HCl, pH 7,0
Puffer II:	60,00	mM	EDTA
	6,00	% (v/v)	Triton X 100
	1,50	M	NaCl, pH 7,0
Puffer III:	20,00	mM	EDTA
	0,10	M	Tris/HCl, pH 7,0
LDS-Probenpuffer:	106,00	mM	Tris/HCl, pH 8,5
	141,00	mM	Tris Base
	2,00	% (w/v)	LDS
	10,00	% (v/v)	Glycerin
	0,51	mM	EDTA
	0,22	mM	SERVA Blue G 250
	0,17	mM	Phenol Rot
SDS-Trenngel:	4,00	ml	Acryl-/Bisacrylamid (37,5:1)
	3,35	ml	H ₂ O
	2,50	ml	375 mM Tris/HCl, pH 8,8
	0,10	%	SDS
	50,00	µl	10%iges APS
	5,00	µl	TEMED

SDS-Sammelgel (4 %):	1,70	ml	Acryl-/BisAcrylamid (37,5:1)
	10,20	ml	H ₂ O
	125,00	mM	Tris/HCl, pH 6,8
	0,10	ml	10%iges SDS
	0,03	% (w/v)	APS
	ad. 20,00	µl	TEMED
20 x MOPS-Laufpuffer:	1,00	M	MOPS
	1,00	M	Tris Base
	0,02	M	EDTA
20 x WB Transferpuffer:	0,50	M	Bicine
	0,02	M	EDTA
	0,50	M	Tris/HCl
PBS Puffer:	120,00	mM	NaCl
	17,00	mM	Na ₂ HPO ₄
	3,00	mM	KH ₂ PO ₄ , pH 7,2
PBST Puffer:	0,10	% (w/v)	Tween 20 in PBS Puffer
MPBST:	5,00	% (w/v)	Magermilchpulver in PBST Puffer
ECL-Substratlösung 1:	100,00	µl	Tris/HCl, pH 8,0
	4,40	µl	90 mM p-Cumarinsäure
	10,00	µl	250 mM Luminol
	ad. 1,00	ml	H ₂ O
ECL-Substratlösung 2:	100,00	µl	Tris/HCl, pH 8,0
	3,00	µl	30%ige H ₂ O ₂ Lösung
	ad.1,00	ml	H ₂ O
E1A-Lysepuffer:	Bei diesem Puffer wird pro 1 ml jeweils 1 µl RNase, DNase, PMSF, NP40 und Pepstatin A zugegeben		
	50,00	mM	Hepes
	150,00	mM	NaCl
	0,10	% (v/v)	Igepal
C1:	438,14	g	Saccharose
	4,06	g	MgCl ₂
	4,84	g	Tris base/HCl, pH 7,5
	42,00	g	Triton X 100
	ad. 1,00	l	H ₂ O
G2:	76,42	g	Guanidine HCl
	11,17	g	Na ₂ EDTA
	3,63	g	Tris base/NaOH, pH 8,0
	250,00	ml	20%ige Tween 20 Lösung
	50,00	ml	10%ige Triton X 100 Lösung
	ad. 1,00	l	H ₂ O

QBT:	750,00 mM	NaCl
	50,00 mM	MOPS
	15,00 % (v/v)	Isopropanol
	0,15 % (v/v)	Triton X 100 pH 7,0
PE:	1,00 M	NaCl, pH 7,0
	50,00 mM	MOPS
	15,00 % (v/v)	Isopropanol
N3 :	3,00 M	Kaliumacetat, pH 5,5
QF:	1,25 M	NaCl
	50,00 mM	Tris/HCl, pH 8,5
	15,00 % (v/v)	Isopropanol

Qiagen Puffer P1, P2 keine Angaben vom Hersteller

2.5.9 Ausgangsvektoren

pGEM-T

Der pGEM-T Vektor (Promega) wurde zur Amplifikation von PCR-Fragmenten in *E. coli* genutzt. Da er ein überhängendes Thymin enthält, konnte er zum Ligieren von Fragmenten mit einem überhängenden Adenin verwendet werden. Als Selektionsmarker wurde Ampicillin verwendet.

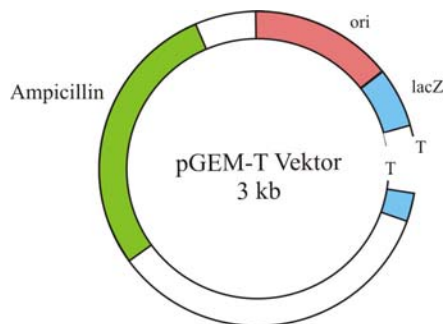


Abb. 16 pGEM-T Vektor Dieser Bakterien-expressionsvektor mit einem überhängenden Thymin wurde zur Klonierung von Fragmenten mit einem überhängenden Adenin verwendet. Selektiert konnten die Klone durch die Amicillinresistenz und das LacZ-Gen.

pCMV/Bsd

Der pCMV/Bsd Vektor (Invitrogen) enthält als Resistenzmarker Blasticidin (Bsd) (Takeuchi *et al.*, 1958). Dieser Vektor wurde für die Selektion auf stabile Zellklone verwendet. Die Resistenz gegen den Translationsinhibitor Blasticidin S wurde durch das Enzym Blasticidin S Desaminase von *Aspergillus terreus* gewährleistet (Kimura *et al.*, 1994).

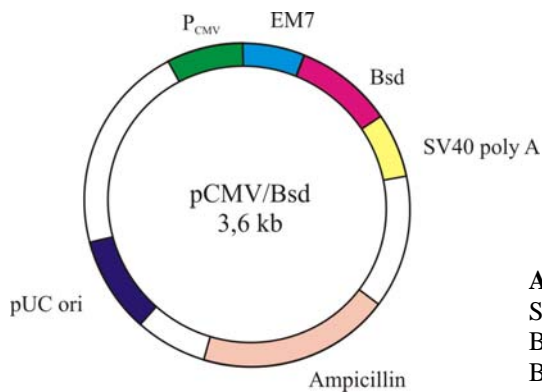


Abb. 17 pCMV/Bsd Vektor Der Vektor kann zur Selektion auf stabile eukaryontische Zellen durch eine Blasticidinresistenz verwendet werden. Zur Selektion in Bakterien wurde die Ampicillinresistenz verwendet.

pTRE Tet-Off

Der pTRE Tet-Off Vektor ist Teil eines Zwei-Komponenten-Systems zur regulierten Proteinexpression mittels Tet oder Dox durch Bindung eines tTA-Elementes. Als Selektionsmarker wurde dabei Neomycin verwendet.

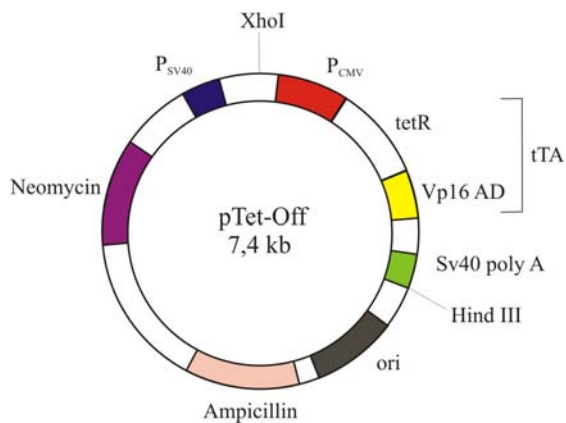


Abb. 18 pTet-Off Vektor Er ist Teil eines Zwei-Komponenten-Systems zur regulierten Proteinexpression in Eukaryonten durch die Expression des tTA-Elementes, wobei Neomycin als Selektionsresistenz verwendet wird. Zur Selektion in Bakterien wurde die Ampicillinresistenz verwendet.

pTRE-FU

Der pTet-FU Vektor wurde am DPZ von Herrn Dr. Stuke entwickelt. Dieser Vektor wurde für ein „gene targeting“ in der Maus konstruiert. Mit ihm konnten verschiedene Gene in das Mausgenom eingebracht werden. Da er über ein TRE-Element verfügte, konnten die so eingeschleusten Gene durch Bindung an ein tTA-Element gezielt an- und abgeschaltet werden.

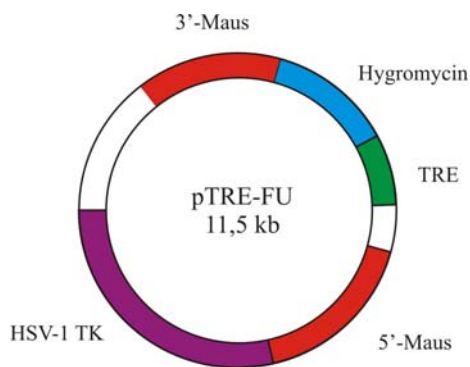


Abb. 19 pTRE-FU Vektor Dieser Vektor ist der zweite Teil des Zwei-Komponenten-Systems. Durch das TRE-Element können die dahinter liegenden Gene reguliert transkribiert und durch die Hygromycinresistenz selektiert werden.

pBI-EGFP

Der pBI-EGFP Vektor (BD Bioscience) besitzt zwei gegenläufige CMV_{Min} Promotoren, die durch ein TRE-Element reguliert werden konnten. Dieser Fakt wurde zur An- und Abschaltung der EGFP Expression ausgenutzt.

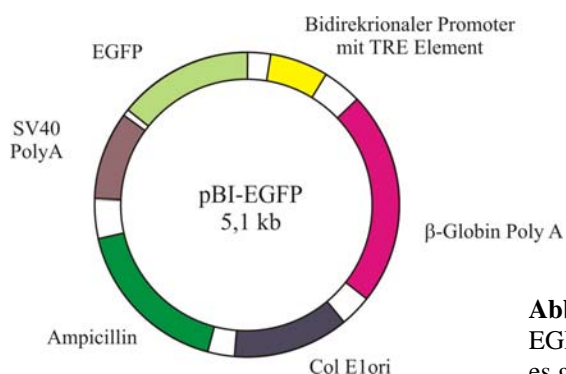


Abb. 20 pBI-EGFP Vektor Dieser Vektor exprimiert ein EGFP unter Kontrolle eines TRE-Elementes, dadurch kann es gezielt an- und abgeschaltet werden.

pRev-TRE

Der pRev-TRE Vektor (Clontech) ist ein retroviraler Vektor in den verschiedene Gensequenzen eingebracht werden konnten. Durch ein TRE-Element waren diese ebenfalls, wie der pTRE-FU Vektor, regulierbar. Als Selektionsmarker in Eukaryonten wurde dabei Hygromycin verwendet.

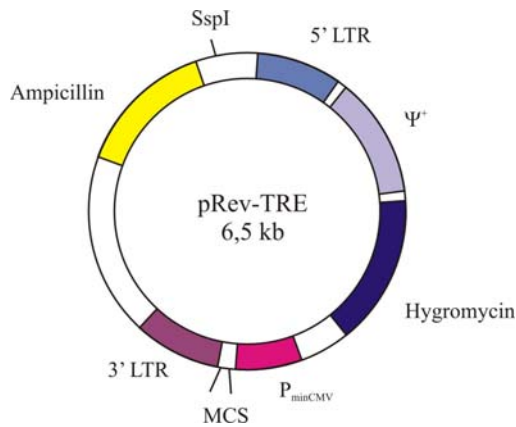


Abb. 21 pRev-TRE Vektor Dieser Vektor ist Teil eines Retrovirus. Zwischen die LTR-Regionen kann ein Gen kloniert und mit hoher Frequenz in andere Organismen integriert werden. Durch die Transfektion in die PT67 Zelllinie wird der Vektor durch das Verpackungssignal Ψ in einen Retrovirus umgewandelt und aus den Zellen, ohne diese zu zerstören ausgeschleust. Durch eine anschließende Infektion mit diesem Retrovirus können stabile eukaryontische Zellen durch Selektion mit Hygromycin hergestellt werden.

pUC19

Der pUC19 Vektor (Fermentas) wurde für Testtransfektionen in *E. coli* verwendet (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). Durch das LacZ Gen konnten Klone leicht selektiert werden.

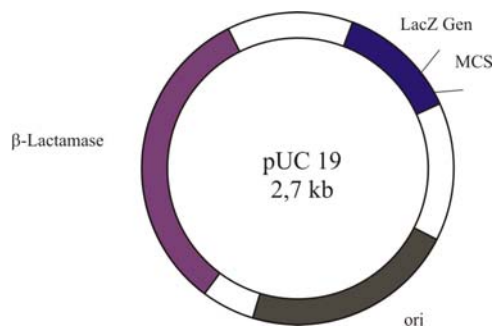


Abb. 22 pUC19 Vektor Dieser Vektor kann zur Integration von DNA-Fragmenten in die MCS des LacZ Gens genutzt und über die β-Lactamase in Bakterien selektiert werden.

pGL3

Der pGL3 Vektor (Promega) ist ein Luziferase-Reporter-Vektor. Er wurde zur Analyse der Genexpression in transfizierten eukaryontischen Zellen verwendet.

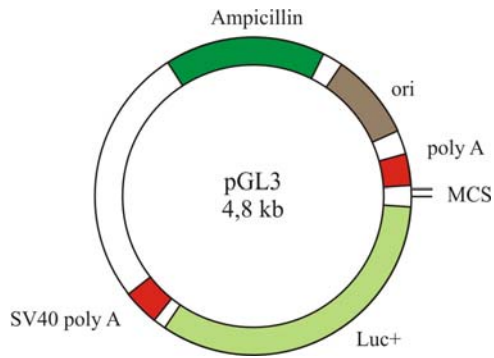


Abb. 23 pGL3 Vektor Dieser Vektor ist zur Expression von Luziferase fähig, dies kann zur Bestimmung der Luziferaseaktivität genutzt werden.

3 Ergebnisse

3.1 „In vitro“ Analyse des *prnp* Gens

3.1.1 Amplifikation des *prnp* Gens

Zur Amplifikation des *prnp* Gens aus genomischer DNA wurde diese zuerst isoliert. Beim Menschen (*Homo sapiens*) und Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) erfolgte dies aus dem Blut. Bei der Maus (*Mus musculus*) aus dem Schwanzgewebe. Die genomische DNA vom Rhesusaffen (*Macaca mulatta*), Bonobo (*Pan paniscus*), Schimpansen (*Pan troglodytes*), Gorilla (*Gorilla gorilla*), Elch (*Alces alces shirasi*), Rind (*Bos taurus*), Schaf (*Ovis aries*) und großen (gr.) Tümmler (*Tursiops truncatus*) wurde von der „German Primate Bank“ und der „German Gen Bank“ über Dr. Christian Roos bezogen. Die Amplifikation des *prnp* Gens der verschiedenen Spezies erfolgte mit den in der Tab. 6 dargestellten Primern. Da das *prnp* Gen später über eine BamHI Schnittstelle in den pTRE-FU Vektor kloniert werden sollte, wurde diese beim Primerdesign vor das Startcodon bzw. nach dem Stopcodon eingefügt.

Tab. 6 Primer zur Amplifikation des *prnp* Gens

Spezies	5' → 3' Primer	3' → 5' Primer
Mensch, Javaneraffe, Rhesusaffe	G CGGATCC ATGGCGAACCTTGGCTGCT	G CGGATCC TCA T CCCACTATCAGGAAG
Schimpanse, Bonobo, Gorilla	G CGGATCC ATGGCAAACCTTGGCTGCT	G CGGATCC TCA T CCCACTATCAGGAAG
Maus	G CGGATCC ATGGCGAACCTTGGCTACT	G CGGATCC TCA T CCCACGATCAGGAAG
Elch, Rind, Schaf	G CGGATCC ATGGTGAAAAGCCACATAGG	G CGGATCC CTA T CCTACTATGAGAAAAATG
gr. Tümmler	G CGGATCC ATGGGAAAAGCTGTGTGAGCT	G CGGATCC TCA T GCAGTAGAAGAATGC

Die BamHI Schnittstelle (blau) ist vor dem Start- bzw. Stopcodon (rot) dargestellt.

Mit den oben genannten Primern wurde das *prnp* Gen aus verschiedenen Spezies amplifiziert. Aufgrund der Schmelztemperatur der Primer wurde die theoretische Annealingtemperatur nach Rychlik (Rychlik *et al.*, 1990) am Beispiel des Javaneraffen bestimmt. Die optimale

Annealingtemperatur wurde anschließend mit Hilfe eines Temperaturgradienten ermittelt (siehe 2.1.5a). Bei dieser PCR wurde festgestellt, dass die optimale Annealingtemperatur für den Javaneraffen um 2 Grad höher liegt als der theoretische Wert. Mit dieser modifizierten PCR wurden alle anderen *prnp* Fragmente aus der jeweiligen DNA amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und unter UV-Licht betrachtet. Bei allen Spezies war eine Bande bei einer Größe von ca. 750 Basenpaaren (bp) zu erkennen, dargestellt in der Abb. 24. Diese Bande wurde aus dem Gel isoliert und die DNA mit Hilfe eines Gelelutionskits (Qiagen) über eine Säule gereinigt (siehe 2.1.9). Das eluierte Fragment wurde anschließend in den pGEM-T Vektor kloniert. Da bei der Amplifikation ein zusätzliches Adenin an das 3'-Ende des Fragmentes angehängt wurde, konnte es mit dem überhängenden Thymin des Vektors ligiert werden (siehe 2.1.12.3). Dies war bei den meisten Fragmenten ohne weiteres möglich. Nur die Fragmente vom gr. Tümmler, Elch, Rind und Maus mussten nach der Elution noch adenyliert werden (siehe 2.1.12.4).

Die Klonierung in diesen Bakterienexpressionsvektor wurde zur Überprüfung der Sequenz und der Expression des Prion Proteins der einzelnen Spezies und in *E. coli* durchgeführt.

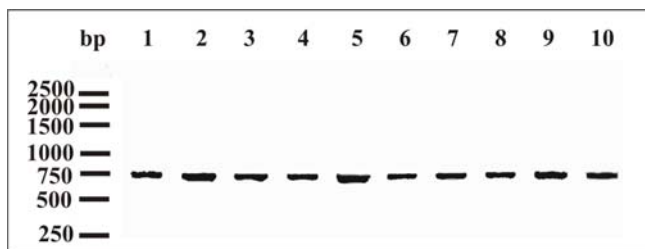


Abb. 24 PCR-Amplifikate der verschiedenen *prnp* Fragmente auf einem 1%igen (w/v) Agarosegel. Je 300 ng wurden von 1) Bonobo, 2) Schimpanse, 3) Gorilla, 4) Rhesusaffe, 5) Javaneraffe, 6) Rind, 7) Elch, 8) Mensch, 9) gr. Tümmler und 10) Maus aufgetragen.

3.1.2 Sequenzierung der speziesspezifischen Prion Proteine

Die Transformation des *E. coli* Stammes DH5 α mit den verschiedenen speziesspezifischen pGEM-T Vektoren erfolgte chemisch, mit der CaCl_2 -Methode (siehe 2.2.3.4) und durch Elektroporation (siehe 2.2.3.3). Dabei erwies sich die CaCl_2 -Methode als die Effektivere, da es bei einer Testtransformation mit dem pUC 19 Vektor zu einer Transformationseffizienz von 1×10^9 kam und bei der Elektroporation lediglich zu einer von 1×10^6 . Da das *prnp* Gen, in den pGEM-T Vektor zwischen das lacZ-Gen kloniert wurde, konnten positive Klone durch α -Komplementation auf IPTG-XGal LB-Amp-Platten selektiert werden. Zum Ausschluss von

„falsch positiven“ Klonen wurde zusätzlich eine Vektor-PCR durchgeführt (siehe 2.1.5b). Danach wurden die positiven Klone über Nacht in LB-Amp-Flüssigkulturen angezogen und das Plasmid anschließend isoliert (siehe 2.1.4). Das isolierte Plasmid wurde mit dem Enzym XmnI geschnitten. Dabei befand sich eine Schnittstelle des Enzyms auf dem Insert und die andere im Vektorrückgrat, so dass zwei Fragmente mit unterschiedlichen Größen entstehen mussten. Dieser Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) wurde in einem 1%igem (w/v) Agarosegel dokumentiert. Die Bakterienklone, die keine zwei Fragmente aufwiesen, wurden als „falsch positive“ identifiziert, die positiven Klone wurden weiter analysiert. Von den so positiv identifizierten Bakterienklonen wurde die Nukleinsäuresequenz der verschiedenen in den pGEM-T Vektor ligierten *prnp* Gene bestimmt. Dazu wurden jeweils 300 ng Plasmid-DNA für eine Sequenzreaktion benötigt (siehe 2.1.18). Die dabei verwendeten Sequenzprimer sind in der Tab. 7 aufgeführt. Die Primer wurden so gewählt, dass sie 30 Nukleotide vor dem Startcodon oder komplementär 30 Nukleotide nach dem Stopcodon an den DNA-Strang banden.

Tab. 7 Sequenzprimer für den pGEM-T Vektor

Primer	Basensequenz
5' → 3'	GTT TTC CCA GTC ACG AC
3' → 5'	GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG

Die Nukleotidsequenz wurde mit Hilfe des Programms pDRAW 32 (AcaClone Software) in die Aminosäuresequenz (ASS) umgewandelt. Diese wurde dann sowohl mit den bekannten Sequenzen aus der Entrez Proteinbank des NCBI als auch miteinander verglichen. Stimmt die ASS der jeweiligen Spezies überein, so wurden diese Klone weiter verwendet, anderenfalls wurde das *prnp* Fragment erneut amplifiziert und kloniert. Der Vergleich zwischen den verschiedenen speziesspezifischen ASS untereinander ist in der Tab. 8 dargestellt. Der Gorilla und der Bonobo entsprachen dabei dem Schimpansen und der Rhesusaffe dem Javaneraffen, deshalb wurden sie hier nicht dargestellt.

Tab. 8 Aminosäuresequenzvergleich der speziesspezifischen Prion Proteine

Mensch	__MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPG_GWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGGW
Javaneraffe	_____
Schimpanse	_____
Maus	____.Y.L.A...TM.T.V....._.T.
Elch	MVKSHI.S.I.....M...V.....G.....
Schaf	MVKSHI.S.I.....M...V.....G.....
Rind	MVKSHI.S.I.....M...V.....G.....
gr. Tümmler	_____
Mensch	GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGG_____WGQGGGTHSQWNKPSKPKTNM
JavaneraffeN..H.....S.
Schimpanse	_____
MausS.....S....._.N.....L
ElchG....._.....
SchafG....._S.....
RindWGQPHGGG....._..G.....
gr. TümmlerG.....N.._.....
Mensch	KHMAGAAAAGAVVGGLGGYVLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYRENMHRYPNQVYYRPMDEY
JavaneraffeM.....L...N.....Y.....V.Q.
SchimpanseM.....
MausM.....M...N.W.....Y.....V.Q.
Elch	..V.....M.....L...N.....Y.....V.Q.
Schaf	..V.....S...M.....L...N.....Y.....V.H.
Rind	..V.....M.....L.....V.Q.
gr. Tümmler	..V.....M.....L.....Y.....V.Q.
Mensch	SNQNNFVHDCVNITIKQRTVTTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAYY__Q
JavaneraffeH.....K....._.
Schimpanse	.S.....H....._.
MausH.....V...QK.....DGR
Elch	N...T.....V..H.....I.....Q...E..._.
Schaf	...D.....V..H.....I..I.....Q....._.
RindEH.....I...K.....Q....._.
gr. Tümmler	N...S.....K..V.....
Mensch	RGSSMVLFSPPVILLISFLIFLIVG
Javaneraffe	_____
Schimpanse	_____
Maus	.S..T.....
Elch	..A.VI.....
Schaf	..A.VI.....
Rind	..A.VI.....
gr. Tümmler	_____

Aus dem Aminosäuresequenzvergleich ist erkennbar, dass sich zwei Gruppen herausgebildet haben, die sich geringfügig in der Sequenz unterscheiden. Zum einen die Primaten und zum anderen der Artiodactyla. Nur die ASS der Maus und des gr. Tümmlers wiesen größere Abweichungen zu den anderen Prion Proteinen auf. Trotz dieser Unterschiede wurde festgestellt, dass sich die Prion Proteine bis auf das des gr. Tümmlers in nur max. 17 % der Aminosäuren voneinander unterscheiden. Dies bestätigt die Aussage, dass das PrP ein hoch konserviertes Protein ist.

3.2 Expression und Reinigung von rekombinanten PrP aus *E. coli*

Da der pGEM-T Vektor ein Bakterienexpressionsvektor ist, wurde in *E. coli* ein speziesspezifisches PrP durch das entsprechende *prnp* Fragment exprimiert. Da es zu einer Überexpression des Proteins kam, sammelte sich das PrP an und konnte aus IB gereinigt werden. Um zu sehen, welches PrP besonders gut exprimiert wurde, wurden die verschiedenen PrP exprimierenden Bakterienklone verglichen. Dazu wurden je 50 ml LB-Medium mit den verschiedenen transformierten *E. coli* angeimpft und bei einer OD₅₉₅ von 5 pelletiert. Anschließend wurde die Zellmembran durch Gefrierbruch und Lysozym zerstört, so dass der gesamte Zellinhalt als Proteingemisch vorlag. Von diesem Proteingemisch wurde die Konzentration gegen eine BSA-Eichreihe bestimmt, dargestellt in der Abb. 25.

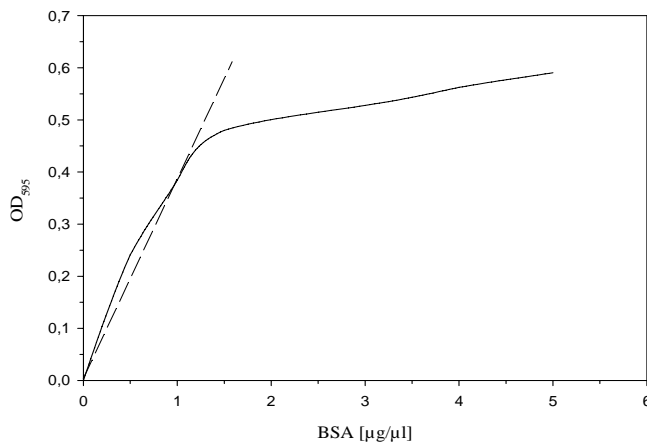


Abb. 25 BSA-Eichkurve in H₂O Die lineare Regression der Eichgeraden wurde zur Bestimmung einer unbekannt Proteinkonzentration benutzt.

Die Proteinmenge ergab sich aus der linearen Regression der BSA-Eichgeraden. Die dabei verwendete Geradengleichung war folgende:

$$y = 0,32 x + 0,03 \text{ mit } r^2 = 0,96$$

Zur Untersuchung der rPrP Expression in *E. coli* wurden je 30 µg Gesamtprotein pro Geltasche auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde anschließend geblottet und der WB mit dem ECL-System entwickelt. Die Expressionsmuster der verschiedenen PrP exprimierenden Bakterienklone sind in der Abb. 26 dargestellt.

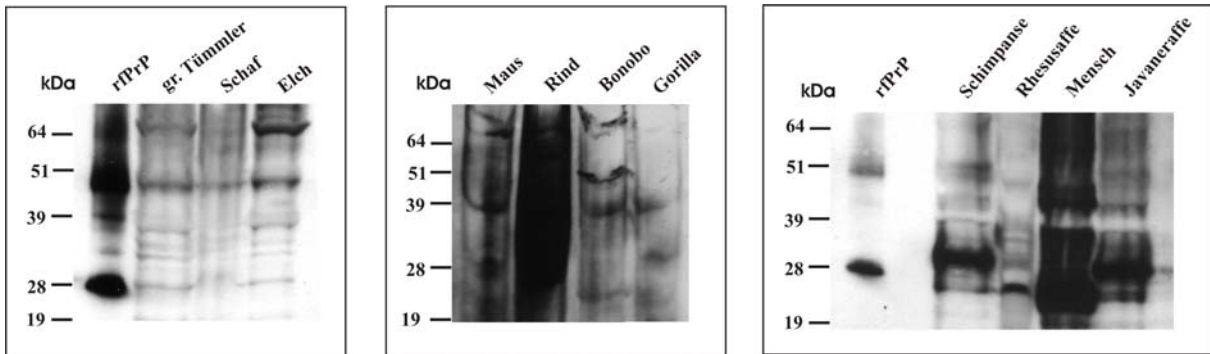


Abb. 26 Expression der verschiedenen rPrP in *E. coli* Detektiert wurde das rPrP vom gr. Tümmeler, Schaf, Elch, Maus, Rind, Bonobo, Gorilla, Schimpanse, Rhesusaffe, Mensch und Javaneraffe mit dem mAk-mix im WB. Als Vergleich wurde rekombinantes Javaneraffen PrP (rfPrP) verwendet.

Aus der Abb. 26 ist erkennbar, dass in *E. coli* bestimmte PrP Spezies besser exprimiert wurden als andere. Da *E. coli* keine Glykosylierungen durchführen kann, konnte nur die unglykosylierte Form bei 28 kDa detektiert werden. In *E. coli* kommt es allerdings zur Bildung von 50 kDa großen PrP Dimeren, diese waren bei allen Spezies vorhanden. Allerdings konnte diese Bande aufgrund der Antikörperspezifität nur unvollständig detektiert werden. Sie wurde bei allen Spezies durch eine Ponceau-Rotfärbung der NZM nachgewiesen. Zu den stark überexprimierenden PrP in *E. coli* gehört der Mensch, der Schimpanse, der Javaneraffe, der Rhesusaffe, das Rind und die Maus. Der Bonobo, der Gorilla, der Elch, das Schaf, und der gr. Tümmeler wurden dagegen nur schwach exprimiert. Für die quantitative Reinigung wurde deshalb eine der stark überexprimierenden Spezies verwendet. Diese war der Javaneraffe, da er ebenfalls eines der meist genutzten Prionenforschungsobjekte ist. Für die Reinigung des Prion Proteins wurden verschiedene Methoden getestet. Diese waren die einfache Lyse der Zellen durch Gefrierbruch mit Lysozym, die Ultraschallbehandlung (siehe 2.4.2.1) und mit Hilfe einer Retsch-Mühle (siehe 2.4.2.2). Das rfPrP wurde durch diese verschiedenen Methoden gereinigt und im WB aufgetragen, geblottet und durch das ECL-System detektiert, dargestellt in der Abb. 27.

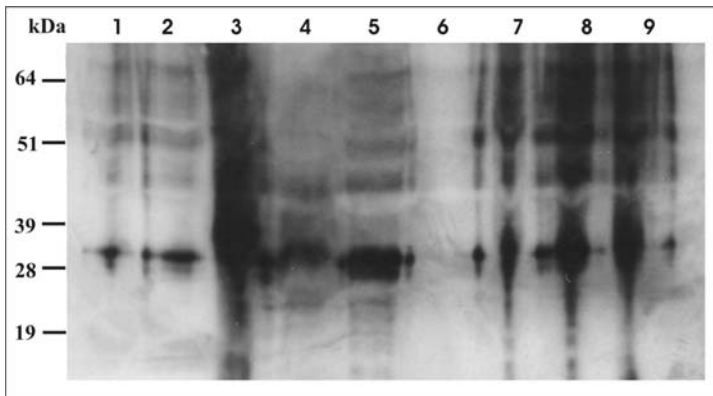


Abb. 27 Verschiedene Methoden der IB Reinigung des rfPrP aus *E. coli* Das durch den mAk-mix im WB detektierte rfPrP wurde gereinigt durch 1) Gefrierbruch, 2) Gefrierbruch mit Lysozymzugabe, 3) 30 s Ultraschallbehandlung, 4) 1 min Ultraschallbehandlung, 5) 3 min Ultraschallbehandlung, 6) *E. coli* Negativkontrolle, 7) 1 min Retsch-Mühle, 8) 5 min Retsch-Mühle und 9) 10 min Retsch-Mühle.

Aus der Abb. 27 ist erkennbar, dass die Aufreinigung der IB mittels Ultraschall, die Bahnen 3 bis 5, die besten und saubersten Ausbeuten liefert. Die Ausbeuten der Retsch-Mühle, die Bahnen 7 bis 9, sind zwar ähnlich gut, allerdings ist diese Proteinaufreinigung nicht so sauber. Aus diesem Grund wurde für die weitere Aufreinigung die Ultraschallbehandlung benutzt. Dazu wurde der Javaneraffen *E. coli* Klon angezogen und die Reinigung wiederholt. Nachdem das Detergenz ausgewaschen war, wurde noch zweimal mit Waschpuffer die proteinhaltige Lösung gewaschen. Das Ergebnis ist in der Abb. 28 dargestellt.

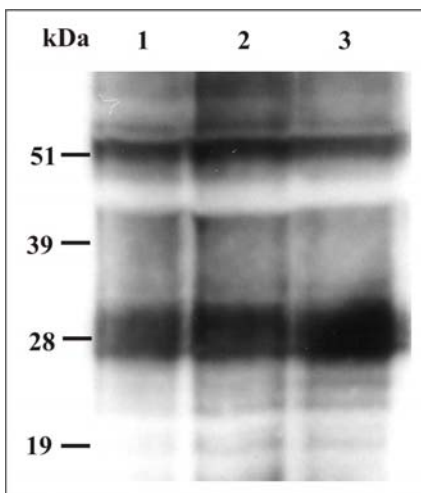


Abb. 28 Modifizierte Aufreinigung des rfPrP durch Ultraschall Mit 1) 30 s, 2) 1 min und 3) 3 min Ultraschallbehandlung.

Nach der modifizierten Aufreinigung konnten keine Reinheitsunterschiede mehr zwischen den verschiedenen Zeitintervallen der Ultraschallbehandlungen festgestellt werden. Deshalb wurden alle weiteren Zellaufschlüsse jeweils für 1 min mit Ultraschall behandelt und nach dem modifizierten Protokoll aufgearbeitet. Bei einer so gereinigten Übernachtkultur konnten 5 µg rekombinantes PrP pro ml gewonnen werden. Neben der unglykosylierten Form wurde dabei auch das PrP Dimer isoliert und gereinigt. Das rekombinante Javaneraffen PrP (rfPrP) wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Außerdem wurde es anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt.

3.3 Herstellung stabiler tTA-Expressionszelllinien

Für die regulierte PrP^C Expression im Zellkulturmodell wurden drei verschiedene Zelllinien verwendet. Diese waren die 3T3, die N2a und die PrP^{0/0} Zelllinie. Da diese Zelllinien das PrP^C reguliert exprimieren sollten, wurde ein regulatorisches System benötigt. Dieses war das Tet-System. Der pTet-Off Vektor wurde als Regulationsvektor verwendet. Da von der 3T3 Zelllinie bereits eine stabil tTA exprimierende Zelllinie vorlag (3T3 L1 Tet-Off), musste diese nicht mit dem pTet-Off Vektor transfiziert werden, sondern nur die beiden Zelllinien N2a und PrP^{0/0}. Dazu wurde der pTet-Off Vektor mit dem Enzym ScaI linearisiert und anschließend in die Zellen transfiziert. Dabei wurden jeweils 500 µg des linearen Vektors in je 5 x 10⁶ Zellen bei 0,25 kV und 975 µF elektroporiert. Nach 2 Tagen wurde mit einer Neomycinselektion begonnen.

Die N2a und die PrP^{0/0} Zelllinie erwiesen sich während der Selektion gegenüber diesem Antibiotikum als resistent. Aus diesem Grund musste ein neuer Vektor mit einem anderen Selektionsmarker konstruiert werden. Dazu wurde das tTA-Element über XhoI und HindIII aus dem pTet-Off Vektor geschnitten und in den Vektor pCMV/Bsd kloniert, dargestellt in der Abb. 29. Als Selektionsmarker in dem neuen Vektor pCMV/Bsd Tet-Off wurde Blasticidin statt Neomycin verwendet.

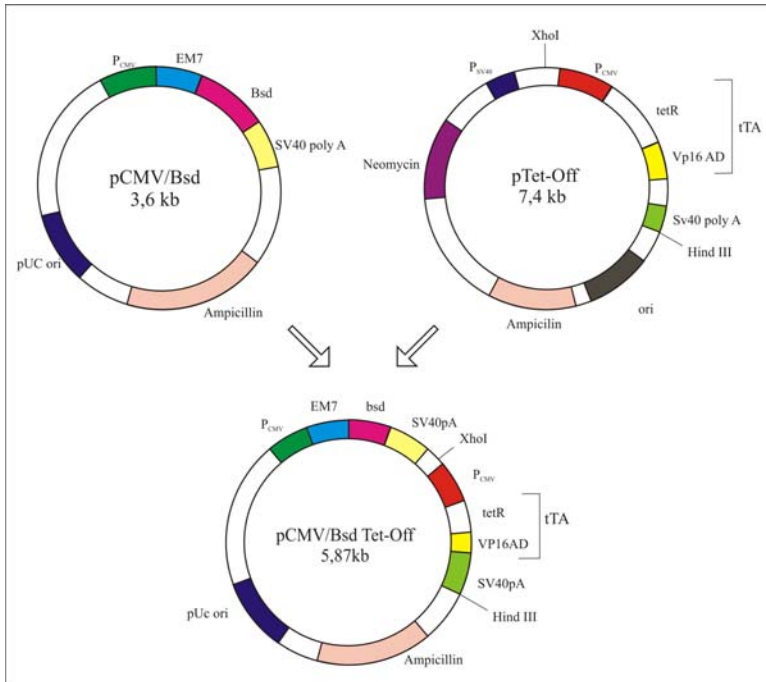


Abb. 29 Klonierungsschema des pCMV/Bsd Tet-Off Vektors Der neue Vektor bestand aus einem Blasticidin (Bsd), einem Promotor (P_{CMV}) sowie dem tTA-Element, das Teil eines Zweikomponenten-Regulationssystems ist. Des Weiteren besaß der neue Vektor eine Ampicillinresistenz zur Selektion in Bakterien sowie ein Poly A Signal (SV40pA).

Der in der Abb. 29 dargestellte Vektor pCMV/Bsd Tet-Off wurde zur Herstellung stabil transfizierter Zelllinien verwendet. Die verschiedenen Zellklone wurden durch das Antibiotikum Blasticidin selektiert, dargestellt in der Abb. 30.

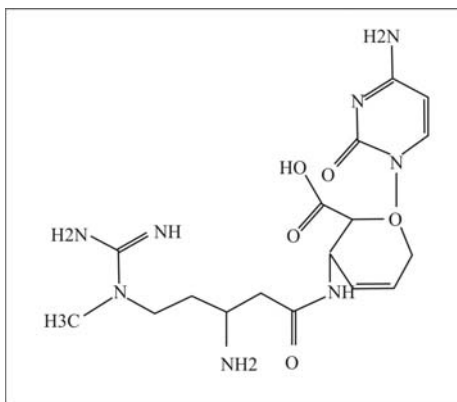


Abb. 30 Strukturformel des Blasticidins

Blasticidin erwies sich als ein guter Selektionsmarker, da man sehr schnell mit geringen Antibiotikakonzentrationen selektieren konnte. In der Abb. 31 sind die Resistenzen der nicht transfizierten Zelllinien gegenüber Blasticidin dargestellt.

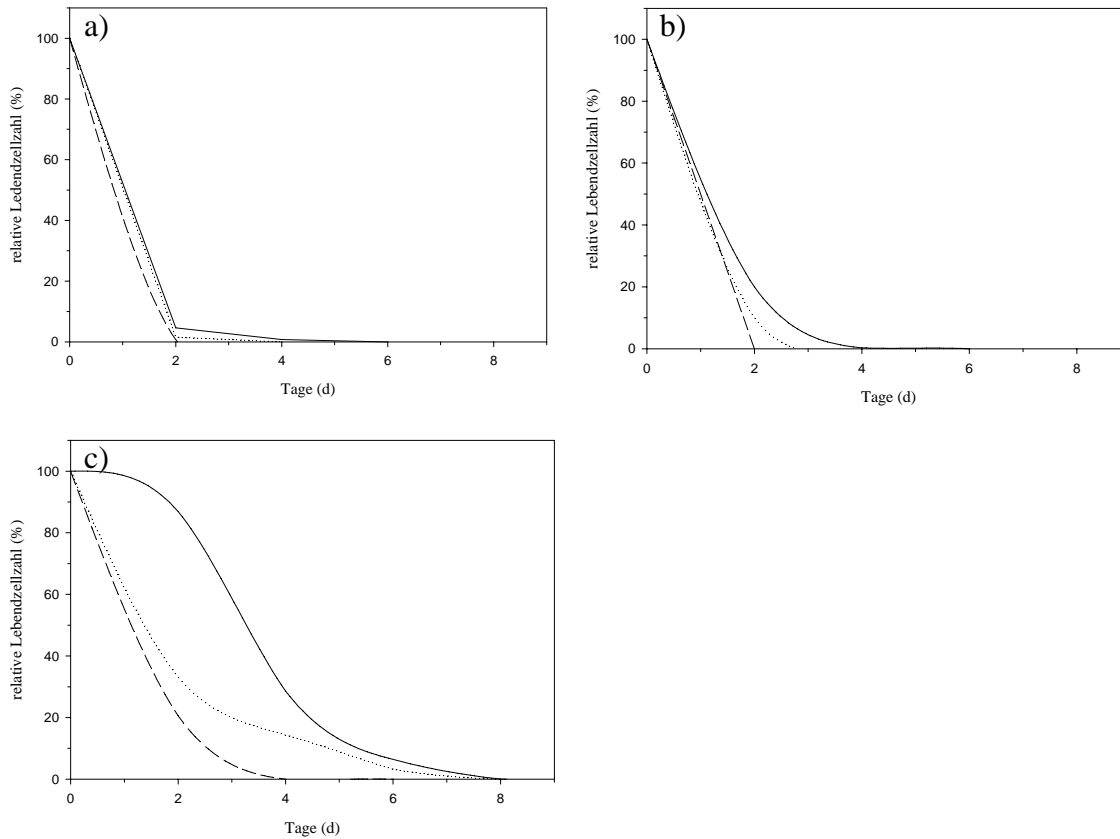


Abb. 31 Blasticidinresistenzkurven der verschiedenen Zelllinien Mit — 2 µg/ml, ... 5 µg/ml und - - - 10 µg/ml. Gezeigt wurde dies bei a) der PrP^{0/0} Zelllinie, b) der 3T3 Zelllinien und c) der N2a Zelllinie.

Aus den Resistenzkurven der verschiedenen Zelllinien ist ersichtlich, dass bei Zugabe von 5 µg/ml Blasticidin über 8 Tage hinweg keine nicht resistenten Zellen überlebten. Deshalb wurde nach der Elektroporation mit dem Transfektionsvektor pCMV/Bsd Tet-Off für die Dauer von 10 Tagen mit 5 µg/ml Blasticidin auf stabile Zellen selektiert. Danach wurden die Zellen mit 1 µg/ml weiter kultiviert damit der Selektionsdruck weiterhin bestand, die Zellen aber schneller wachsen konnten. Anschließend wurden von jeder Zelllinie 10 schnell wachsende Zellklone selektiert und weiter angezogen.

Diese Klone wurden auf ihre Tet-Induzierbarkeit untersucht. Dies geschah durch eine transiente Transfektion mit dem pBI-EGFP Vektor (siehe Abb. 20). Dieser besitzt als Reporter gen ein „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) unter Kontrolle eines TRE-Elementes. Da EGFP ein fluoreszierendes Protein ist, konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und regulierbare Klone selektiert werden. Dabei wurden die Klone mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und bei 530 nm beobachtet. Da die Fluoreszenzmikroskopie mit adherenten Zellen erfolgte, konnten diese Zellen nicht durch Elektroporation transfiziert werden. Sie wurden daher mittels Effectene und SuperFect

transfiziert, da die Zellen dabei nicht von der Zellkulturplatte gelöst werden mussten. Für diese Transfektion war es allerdings notwendig, dass die optimale Konzentration von Plasmid- und Transfektionsreagenz zuvor bestimmt wurde. Die verschiedenen Konzentrationen wurden an PrP^{0/0} Zellen bestimmt und die Resultate auf die anderen Zellen übertragen. Die PrP^{0/0} Zellen wurden mit dem pGL3 Vektor (siehe Abb. 23), mit den in der Tab. 9 aufgelisteten verschiedenen Konzentrationsverhältnissen von DNA und Transfektionsreagenz transient transfiziert. Da der pGL3 Vektor Luziferase exprimiert, kam es zur Lumineszenz nach Zugabe von Luziferin. Dieses emittierte Licht konnte im Luminometer detektiert werden, dargestellt in der Abb. 32.

Tab. 9 Verhältnis der DNA zu den Transfektions-Agenzien

Bezeichnung	Verhältnis	
	DNA : Effectene : Enhancer	DNA : SuperFect
1	1 : 0,5 : 4	1 : 0,5
2	1 : 1 : 4	1 : 1
3	1 : 1,5 : 4	1 : 1,5
4	2 : 1 : 8	2 : 1
5	2 : 2 : 8	2 : 2
6	2 : 3 : 8	2 : 3
7	4 : 2 : 16	4 : 2
8	4 : 4 : 16	4 : 4
9	4 : 6 : 16	4 : 6
10	8 : 4 : 32	8 : 4
11	8 : 8 : 32	8 : 8
12	8 : 0 : 32	8 : 0

Getestet wurden die verschiedenen Verhältnisse in PrP^{0/0} Zellen mit 1 = 1 µl.

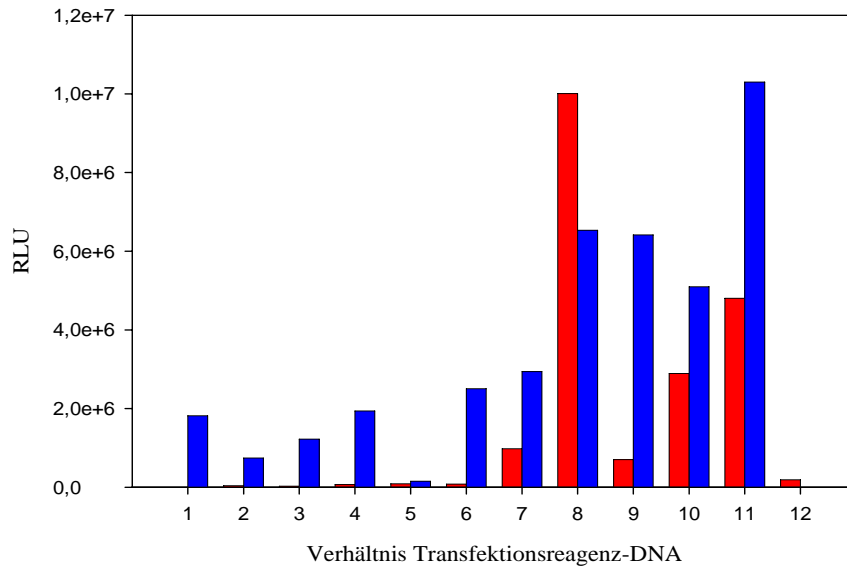


Abb. 32 Optimierung der Transfektionseffizienz Nach 24 h wurde die Luziferaseaktivität in PrP^{0/0} Zellen bestimmt. Diese wurden mit verschiedenen Mengen an pGL3 und Transfektionsagenzien (Effectene (■), SuperFect (■)) transfiziert. Die relativen Mengen DNA und SuperFect bzw. Effectene mit Enhancer sind in der Tab. 9 angegeben.

Aus der Abb. 32 ist erkennbar, dass die Transfektionseffizienz mit SuperFect bei einem Verhältnis von 4 µl DNA zu 4 µl Transfektionsagenz gute Resultate lieferte.

Dieses Verhältnis wurde genutzt, um den pBI-EGFP Vektor in die verschiedenen pCMV/Bsd Tet-Off Zellklone der Zelllinien PrP^{0/0}, N2a und 3T3 transient zu transfizieren. Anschließend wurden die so transfizierten Zellen nach 24 h Inkubation mit und ohne Tet unter dem Fluoreszenzmikroskop angesehen und selektiert. Diese Klone sind in der Abb. 33 dargestellt.

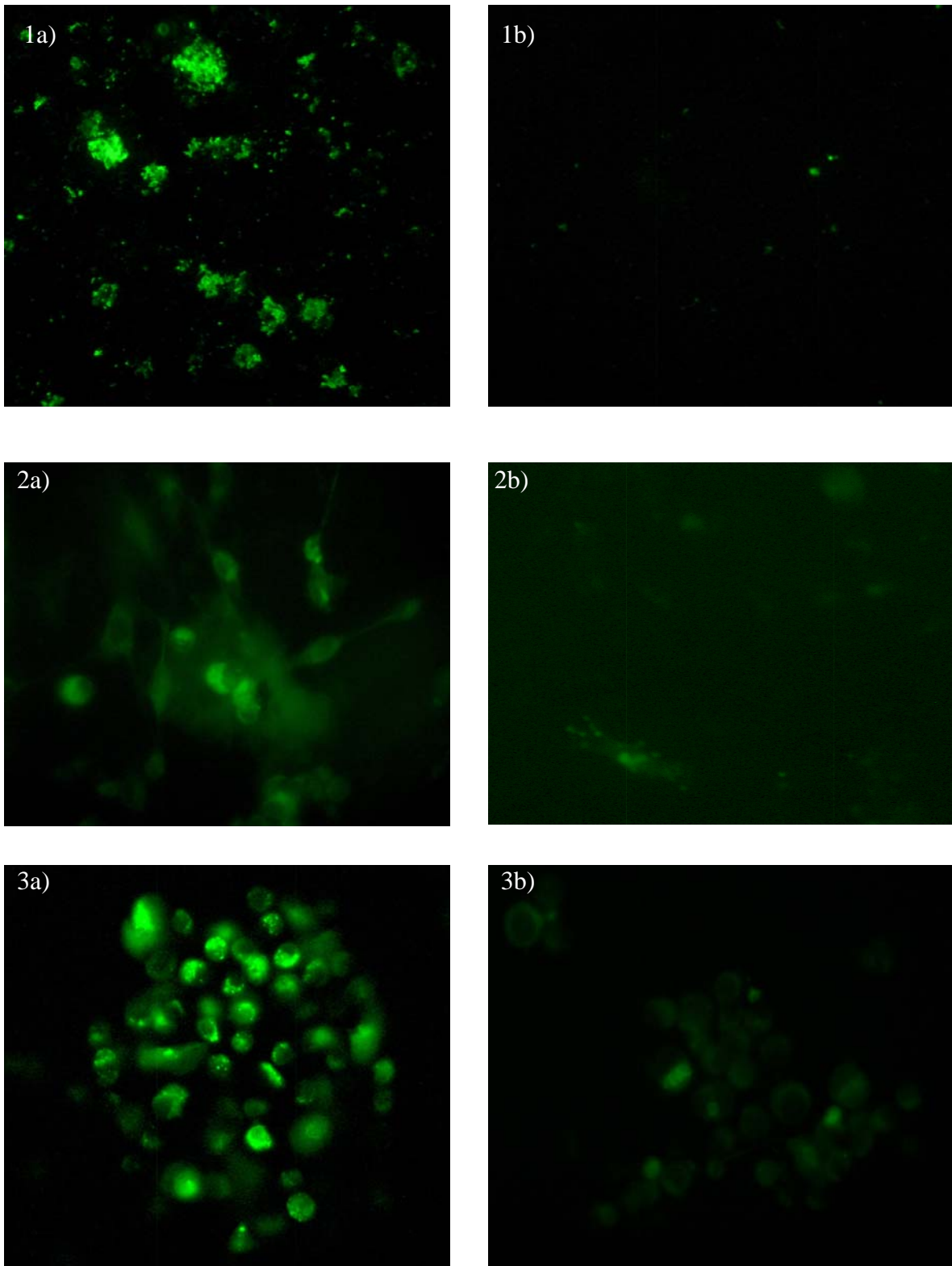


Abb. 33 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Zelllinien Mit 1) PrP^{0/0} Zellen, 2) 3T3 Zellen und 3) N2a Zellen. Die Zellen in a) wurden ohne Tet kultiviert und die Zellen in b) wurden jeweils mit 50 µg/ml Tet kultiviert.

Aus der Abb. 33 ist zu erkennen, dass sich in den verschiedenen Zellklonen, dass durch das TRE-Element regulierte Gen mit Hilfe von Tet an- und abstellen ließ. Eine gute Regulation

war bei den PrP^{0/0} Zellen zu beobachten, diese zeigten nach der Inkubation mit Tet die geringste Basisexpression. Dagegen war bei den anderen beiden Klonen die Basisexpression stärker ausgeprägt. Der jeweils selektierte Zellklon einer Zelllinie wurde als PrP LHABT, N2a LHABT und 3T3 LHABT bezeichnet.

Da Mycoplasmen in der Zellkultur verschiedene Krankheiten auslösen können, wurden die Zelllinien und Zellklone auf diese Kontamination in unregelmäßigen Abständen, aller 5-7 Monate, mit Hilfe der PCR untersucht (siehe 2.1.5d).

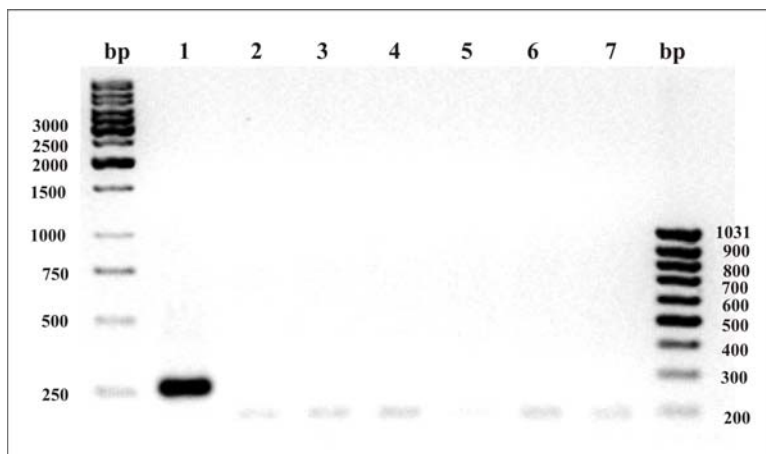


Abb. 34 Mycoplasmentest-PCR Mit 1) Positivkontrolle, 2) Negativkontrolle, 3) N2a Zellkultur, 4) PrP^{0/0} Zellkultur, 5) 3T3 Zellkultur, 6) PrP^{0/0} LHABT und 7) N2a LHABT.

Aus der Abb. 34 geht hervor, dass die Zellkulturen nicht mit Mycoplasmen infiziert waren, da nur die Positivkontrolle eine Reaktion in der PCR zeigte. Im Gegensatz dazu wies die Negativkontrolle und die verschiedenen Zellkulturen keine Reaktion auf.

3.4 Herstellung doppelt stabiler regulierbarer PrP^C exprimierender Zelllinien

Zur Herstellung von regulierbaren PrP^C Expressionszelllinien wurde das *prnp* Gen der verschiedenen Spezies in die verschiedenen LHABT Zellklone transfiziert. Dazu wurde das entsprechende *prnp* Gen aus dem pGEM-T Vektor ausgeschnitten und in verschiedene Vektoren kloniert, da zwei verschiedene Transfektionssysteme und Vektoren verwendet wurden. Zum einen wurden die Zellen mit dem „gene targeting“ Vektor pTRE-FU transfiziert und zum anderen mit dem retroviralen Vektor pRev-TRE, der über eine retrovirale Infektion in die Zellen eingeschleust wurde. Das *prnp* Gen war bei beiden Vektoren an ein TRE-Element gekoppelt, da es durch Tet reguliert an- und abgestellt werden sollte. Beide Vektoren besitzen einen Hygromycinmarker, weshalb nach einer Transfektion mit diesen

beiden Vektoren die doppelt stabilen PrP^C exprimierenden Zellen durch dieses Antibiotikum selektiert werden konnten. Dieses zweite Antibiotikum wurde neben Blasticidin zur Selektion verwendet. Die Strukturformel des Hygromycins ist in der Abb. 35 dargestellt. Um die Hygromycinresistenz der PrP^{0/0}, N2a und 3T3 Zellen zu testen, wurden diese mit unterschiedlichen Antibiotikakonzentrationen kultiviert, dargestellt in der Abb. 36.

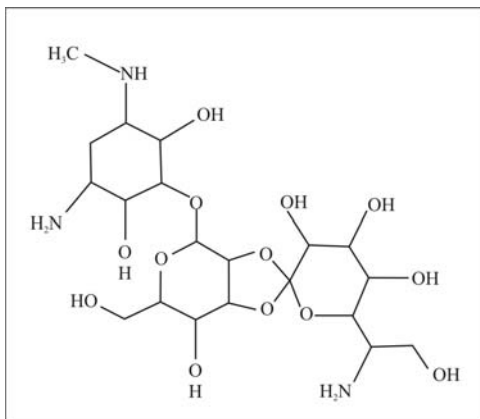


Abb. 35 Strukturformel des Hygromycins

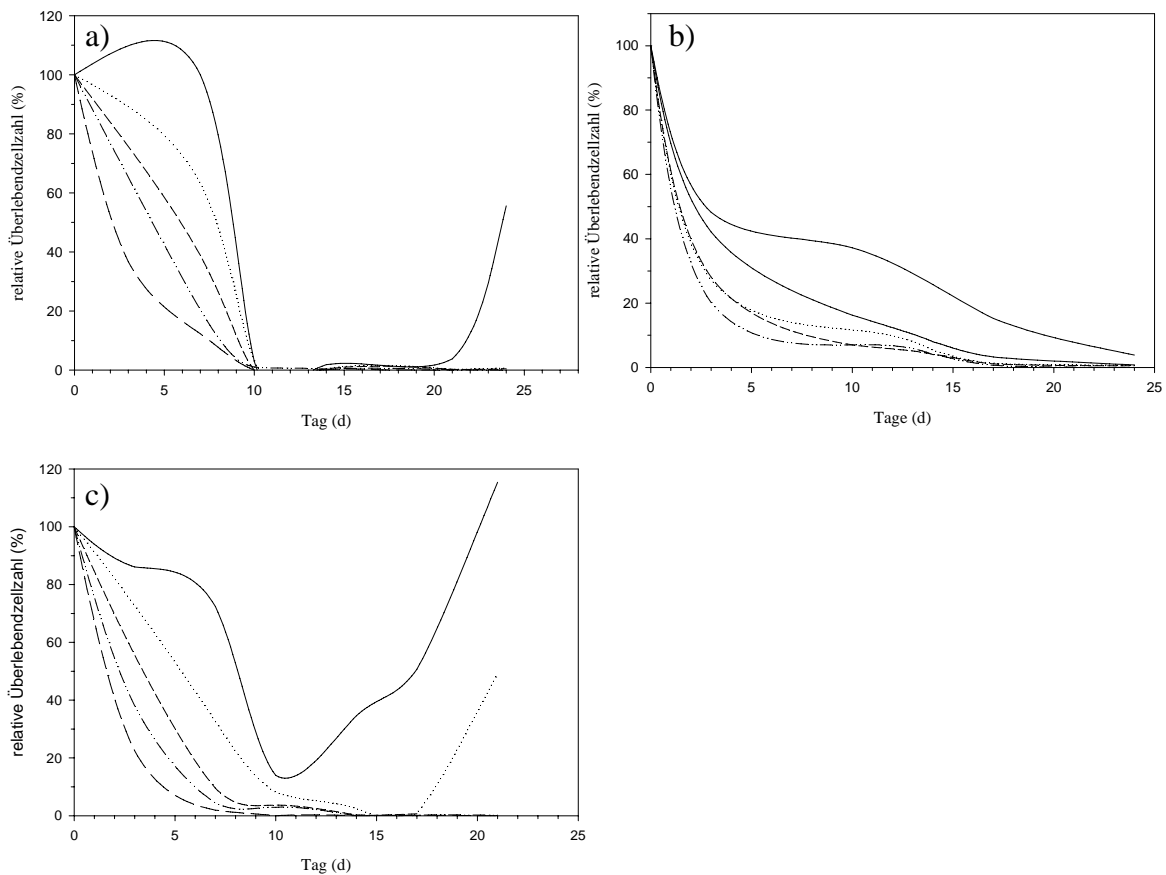


Abb. 36 Hygromycinresistenz der verschiedenen Zellklone Die Zellen wurden jeweils kultiviert mit — 50 µg/ml, ... 100 µg/ml, - - 150 µg/ml, · · - · · 200 µg/ml und — — 300 µg/ml bei a) PrP LHABT b) 3T3 LHABT und c) N2a LHABT.

Aus den Resistenzkurven der einzelnen Zelllinien ist erkennbar, dass die Zellen, gegenüber einer Hygromycinkonzentration größer als 100 µg/ml, nicht resistent waren. Die Absterbephase dauerte bei einer Konzentration von 150 µg/ml bei den PrP LHABT und N2a LHABT jeweils 11 Tage und bei den 3T3 LHABT 18 Tage. Deshalb wurden die transfizierten PrP LHABT und N2a LHABT Zellen mit 200 µg/ml für 15 Tage und die 3T3 LHABT für 22 Tage selektiert. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µg/ml kultiviert, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten und trotzdem ein schnelles Zellwachstum zu ermöglichen. Mit dieser Antibiotikakonzentration und Kultivierungszeit wurden die, auf die verschiedenen Arten transfizierten Zellen, selektiert.

3.4.1 Herstellung doppelt stabiler PrP^C exprimierender Zelllinien durch Elektroporation

Für die stabile Transfektion durch Elektroporation wurde der pTRE-FU Vektor verwendet. In diesen wurden die verschiedenen *prnp* Gene aus dem pGEM-T Vektor über eine BamHI Schnittstelle kloniert, dargestellt in der Abb. 37. Dabei wurden die *prnp* Gene vom Rind, Menschen, Elch, Schimpansen und Javaneraffen verwendet. Danach wurde der Vektor linearisiert und 500 µg in 5×10^6 Zellen elektroporiert mit 0,25 kV und 975 µF. Die Zellen PrP LHABT, 3T3 LHABT und N2a LHABT wurden mit dem Vektor pTRE-FU und dem entsprechenden *prnp* Gen transfiziert und anschließend durch Hygromycin auf stabile Zellen selektiert, dargestellt in der Abb. 38.

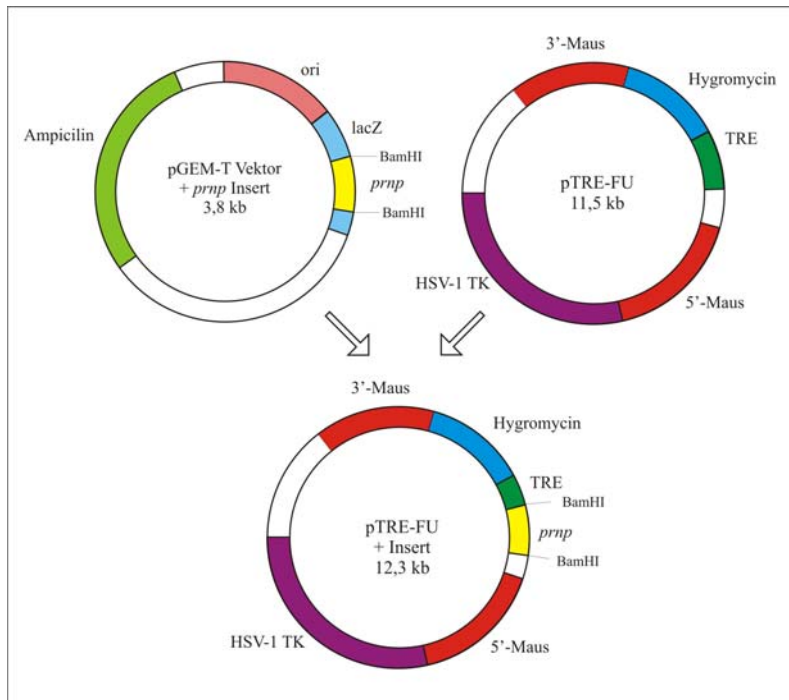


Abb. 37 Klonierung des pTRE-FU Vektors mit Insert Das *prnp* Gen wurde über eine BamHI Schnittstelle in den „gene targeting“ Vektor pTRE-FU kloniert. Da das Gen an ein TRE-Element gekoppelt war, konnte es reguliert an- und abgestellt werden. Die Selektion auf stabil transfizierte eukaryontische Zellen erfolgte anschließend über die Hygromycinresistenz.

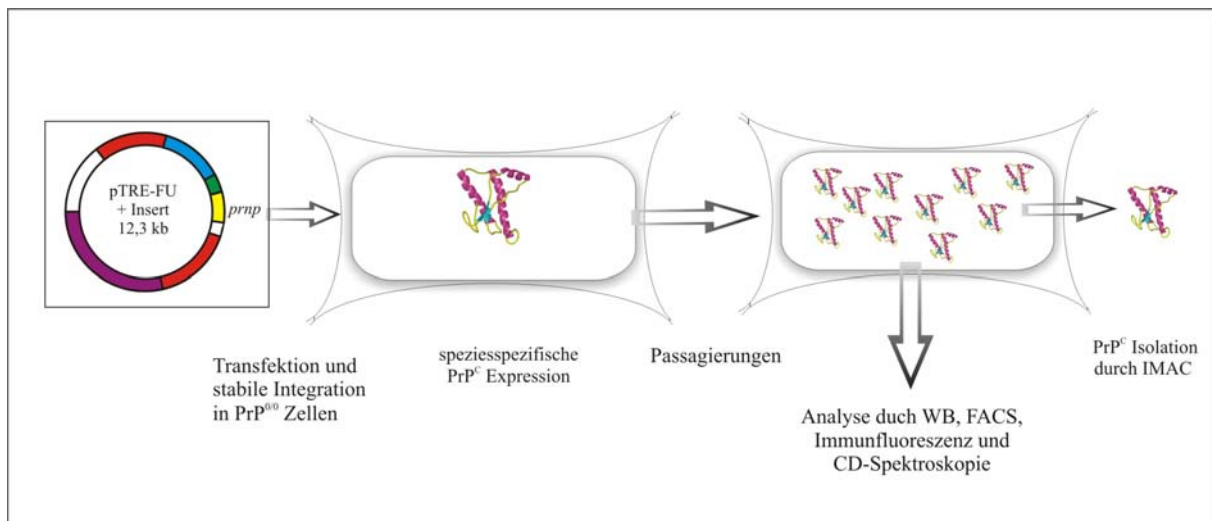


Abb. 38 Stabile Transfektion durch Elektroporation Nach der Transfektion in die eukaryontischen Zellen und deren Selektion, wurde das PrP^C in den verschiedenen Zellen exprimiert, auf verschiedenen Wegen nachgewiesen und isoliert.

3.4.2 Retrovirale Herstellung doppelt stabiler PrP^C exprimierender Zellklone

Für die stabile Transfektion durch Retroviren wurde der pRev-TRE Vektor verwendet. In diesen wurde das *prnp* Gen aus dem pGEM-T Vektor kloniert, dargestellt in Abb. 39. Dabei wurden die *prnp* Gene vom Rind, Menschen, Maus und Javaneraffen verwendet. Danach erfolgte eine Linearisierung des Vektors durch das Enzym SspI und anschließende Elektroporation in die PT67 Zelllinie. Diese produzierte die Virushüllproteine, verpackte den Vektor in einen Retrovirus und gab ihn über die Zellmembran an das Medium ab, ohne die Zellen zu zerstören. Mit diesem infektiösen Zellmedium wurden anschließend die verschiedenen LHABT Zellklone infiziert (siehe 2.3.5). Der MOI dieser Zellen betrug 1,2 cfu. Dadurch konnten die Zellen gut transfiziert und durch Hygromycin selektiert werden, dargestellt in der Abb. 40.

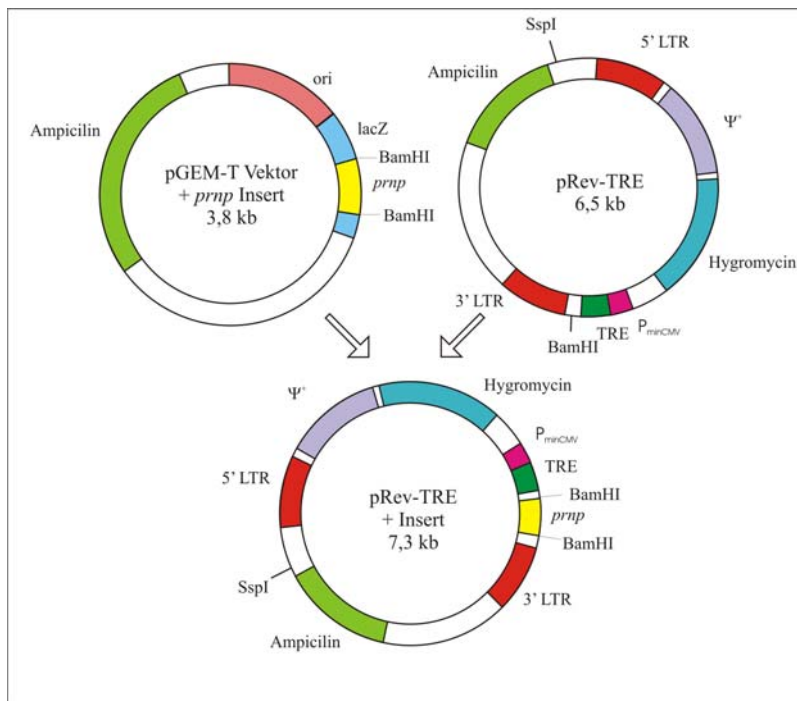


Abb. 39 Klonierung des retroviralen Expressionsvektors Der zur Transfektion benutzte retrovirale Vektor besitzt ein *prnp* Gen, welches über eine BamHI Schnittstelle kloniert wurde. Durch die LTR-Regionen ist die Frequenz der Transfektion sehr effizient. Da das *prnp* Gen an ein TRE-Element gekoppelt war, konnte es reguliert an- und abgestellt werden. Die Selektion auf stabil transfizierte eukaryontische Zellen erfolgte anschließend über eine Hygromycinresistenz.

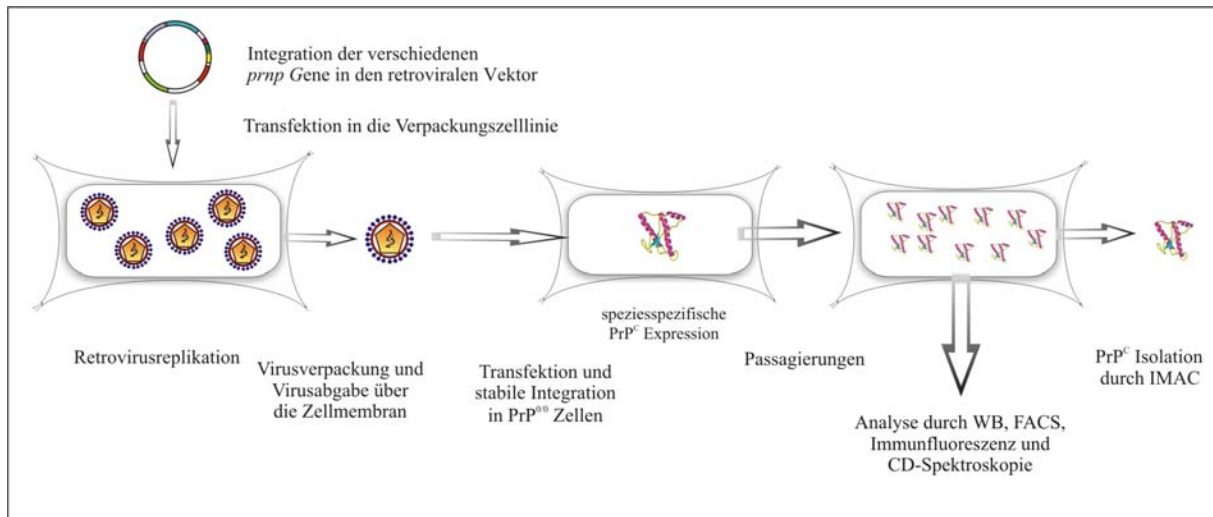


Abb. 40 Stabile Transfektion durch Retroviren Nach der Transfektion des retroviralen Vektors mit dem *prnp* Gen in die Verpackungszelllinie wurde ein Retrovirus produziert und an das Medium abgegeben. Mit diesem Medium wurden die Zielzellen kultiviert und anschließend selektiert mit Hilfe von Hygromycin. Das PrP^C in den verschiedenen Zellen konnte exprimiert und auf verschiedenen Wegen nachgewiesen und isoliert werden.

Da bei der Transfektion durch Elektroporation mit dem pTRE-FU Vektor und anschließender Selektion bei einigen Spezies die Anzahl an positiven Klonen null war, wurden die Zellen mit Hilfe von Retroviren transfiziert. Bei einer Transfektion mit dem Javaneraffen *prnp* Gen, wurde ein Vergleich der Transfektionsmethoden durchgeführt. Bei der Transfektion durch einen Retrovirus und anschließender Selektion wurden 30-mal mehr Klone selektiert, als nach der Elektroporation mit dem pTRE-FU Vektor. Aus diesem Grund wurden die PrP LHABT, die N2a LHABT und die 3T3 LHABT Zellen mit Hilfe dieses Retrovirusmodells infiziert und anschließend selektiert. Da der PrP LHABT Zellklon von sich aus kein PrP^C exprimiert, lag das Hauptaugenmerk der Transfektion und Selektion auf diesen Zellen.

Trotzdem wurden die anderen beiden Zellklone N2a LHABT und 3T3 LHABT mit *prnp* Genen transfiziert, damit ein Vergleich der verschiedenen Zelllinien vorgenommen werden konnte. Von den transfizierten Zelllinien wurden jeweils 40 Klone abgenommen und angezogen. Die 10 am schnellsten wachsenden Klone von jeder Zelllinie wurden selektiert und nach Erreichen einer Zellzahl von 1×10^6 im Verhältnis 1:2 gesplittet. Ein Teil wurde ohne Tet weiter kultiviert, der andere mit 50 µg/ml Tet. Nach 3 Tagen wurden die Zellen lysiert und das reguliert an- und abgeschaltete exprimierte PrP^C im WB detektiert. Nach erfolgter Transfektion, Selektion und Detektion im WB, waren die in der Tab. 10 dargestellten stabilen regulierbaren PrP^C exprimierenden Zellklone der verschiedenen Spezies in den jeweiligen Zelllinien verfügbar.

Tab. 10 Hergestellte stabile regulierbare PrP^C exprimierende Zellklone

Zelllinie	stabil transfizierte Zellklone durch den pTRE-FU Vektor mit folgenden <i>prnp</i> Gen	stabil transfizierte Zellklone durch den pRev-TRE Vektor mit folgenden <i>prnp</i> Gen
PrP ^{0/0} LHABT	Schimpanse (C1 und C4), Javaneraffe (F1-1), Elch (E13)	Javaneraffe (rF1-2), Mensch (rH1), Rind (rB2), Maus (rM3)
3T3 LHABT	Javaneraffe (F1-11), Rind (B4)	
N2a LHABT	Javaneraffe (F1-8), Mensch (H7)	Rind (rB3)

Aus der Tab. 10 geht hervor, dass 6 verschiedene Spezies reguliert das PrP^C in den PrP LHABT Zellen exprimierten, 3 Spezies in den N2a LHABT Zellen und 2 Spezies in den 3T3 LHABT Zellen. Die durch Tet regulierbaren selektierten Zellklone, dargestellt in der Tab. 10, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit nur noch mit ihren Abkürzungen genannt.

3.5 Western Blot Analyse der PrP^C Expression in den verschiedenen Zelllinien

Das PrP^C in Zellkultur kann auf verschiedenen Wegen nachgewiesen werden. Eine Detektion des PrP^C ohne Zellaufschluss ist durch eine FACS Analyse oder Immunfluoreszenz möglich. Nach einem Zellaufschluss konnte das PrP^C durch den „klassischen“ WB, bei dem 3 Banden zwischen 25 kDa und 37 kDa auf dem SDS-PAGE-Gel zu erkennen waren, durch eine 2D-Gel-Analyse und durch eine CD-Spektroskopie nachgewiesen werden.

Die Zellyse erfolgte dabei durch den E1A-Lysepuffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Igepal, mit je 1 µg/ml RNase, DNase, PMSF und Pepstatin A). Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den lysierten Zellen erfolgte anschließend durch lineare Regression gegen eine BSA-Eichgerade in E1A-Puffer, dargestellt in der Abb. 40 mit folgender Gleichung:

$$y = 0,42x + 0,179 \text{ mit } r^2 = 0,987$$

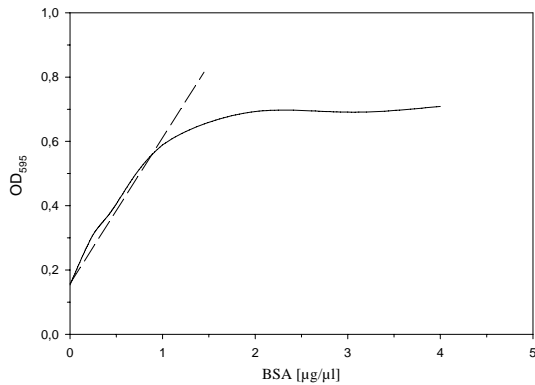


Abb. 41 Proteinbestimmung von BSA im E1A-Lysepuffer Durch die lineare Regression der BSA-Eichgerade wurde eine unbekannte Proteinmenge bestimmt.

Nach der Zelllyse und anschließender Proteinbestimmung der verschiedenen Zellklone wurden jeweils 30 µg Protein pro Geltasche auf ein SDS-PAGE-Gel gegeben und danach im WB detektiert.

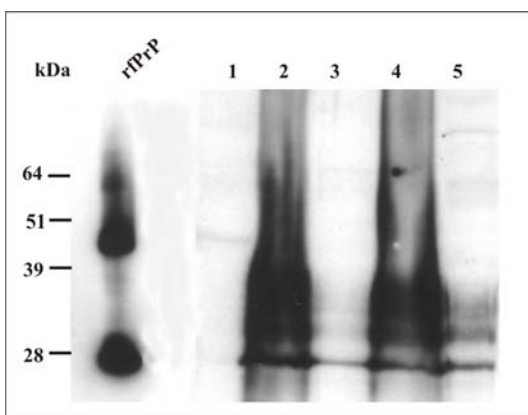


Abb. 42 WB Klonselktion der PrP^{0/0} Zelllinie Im WB sind die verschiedenen PrP^{0/0} Klone mit dem mAk-mix detektiert und gezeigt worden bei 1) PrP LHABT, 2) C1 Tet-, 3) C1 Tet+, 4) C4 Tet- und 5) C4 Tet+.

Da die PrP^{0/0} Zelllinie kein PrP^C exprimiert, wurden Zellklone, die eine Basisexpression nur durch den regulierbaren Promotor, aufwiesen selektiert. Dabei zeigte sich, dass der C1 Klon eine geringere Basisexpression aufwies als der C4 Klon. Aus diesem Grund wurde dieser Klon für alle weiteren Experimente verwendet und alle Experimente wurden stellvertretend an ihm durchgeführt. Dazu gehörte unter anderem die Bestimmung des PrP^C Detektionsminimums, die Abhängigkeit der PrP^C Expression von der Zeit sowie von der Tet-Konzentration.

3.5.1 Detektionsminimum der PrP^C Expression im WB

Zur Bestimmung des PrP^C Detektionsminimums in der Zellkultur wurde der C1 Klon ohne Tet kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und der proteinhaltige Überstand durch den mAk-mix im WB detektiert, dargestellt in der Abb. 43.

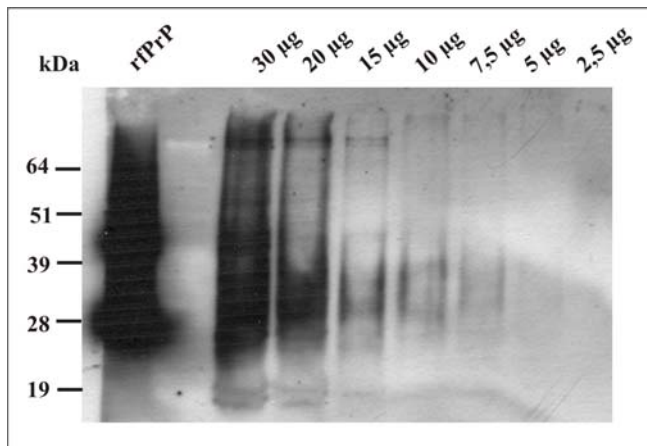


Abb. 43 PrP^C Detektionsminimum des C1 Klons Die PrP^C Detektion durch mAk-mix wird bei 30, 20, 15, 10, 7,5, 5 und 2,5 µg Gesamtproteinmenge im WB gezeigt.

Das PrP^C konnte in dem C1 Klon bis zu einer Detektionsgrenze von 7,5 µg Gesamtproteinmenge nachgewiesen werden. Zwar sind schemenhafte Banden auch bei geringeren Konzentrationen zu erkennen, allerdings sind diese zu schwach ausgeprägt um für eine genaue Detektion verwendet werden zu können. Für weitere Detektionen wurden deshalb jeweils 30 µg Gesamtprotein nach der Lyse mit dem E1A-Puffer pro SDS-PAGE-Geltasche eingesetzt, da bei dieser Konzentration alle drei Glykosylierungsstufen des PrP^C gut zu erkennen waren.

3.5.2 Tet-Abhängigkeit der PrP^C Expression

Da die PrP^C Expression durch einen Tet abhängigen Promotor unterdrückt wird, wurde die dazu notwendige Tet-Konzentration bestimmt. Dazu wurden 1×10^6 Zellen mit verschiedenen Tet-Konzentrationen für 3 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und jeweils 30 µg Gesamtproteinmenge auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und im WB mit dem mAk-mix detektiert, dargestellt in der Abb. 44.

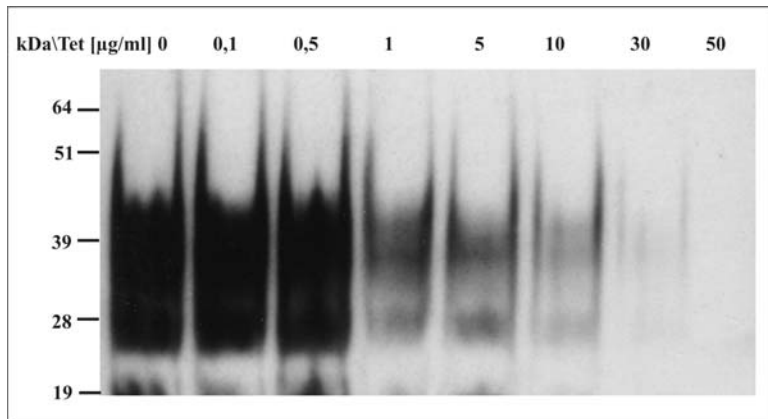


Abb. 44 Tet-Abhängigkeit des C1 Klons Der C1 Klon wurde 3 Tage mit 0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 30 und 50 µg/ml Tet kultiviert und im WB mit dem mAκ-mix detektiert.

Aus der Abb. 44 ist erkennbar, dass bei einer Tet-Konzentration von 1 µg/ml die PrP^C Expression abnahm. Ab einer Konzentration von 30 µg/ml wurde die Expression vollständig unterdrückt. Deshalb wurde für die Suppression der Expression in den weiteren Experimenten eine Konzentration von 30 µg/ml Tet verwendet.

3.5.3 Zeitabhängigkeit der PrP^C Expression

Nach der Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit, wurde die Zeitabhängigkeit der PrP^C Expression nach Tet-Zugabe bestimmt. Dazu wurden Zellkulturflaschen mit 1×10^6 Zellen angeimpft und mit 30 µg/ml Tet kultiviert. Anschließend wurden in Intervallen von 12 h jeweils die Zellen lysiert und durch einen mAκ-mix im WB analysiert. Die Zeitabhängigkeit der PrP^C Expression ist in der Abb. 45 dargestellt.

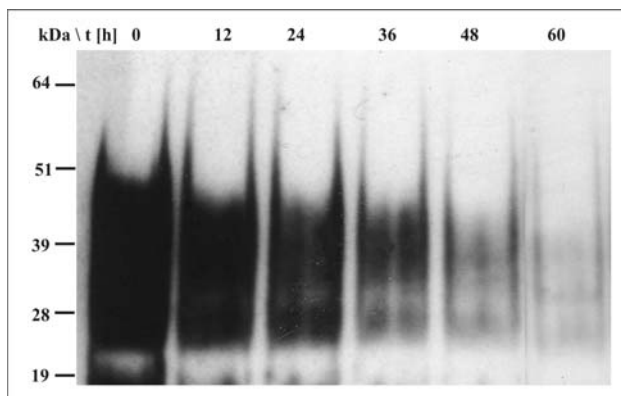


Abb. 45 Zeitabhängige PrP^C Expression des C1 Klons Der C1 Klon wurde mit 30 µg/ml Tet kultiviert und die PrP^C Expression nach 0, 12, 24, 36, 48 und 60 min im WB durch den mAκ-mix detektiert.

Aus der Abb. 45 ist erkennbar, dass die PrP^C Expression nach 24 h abgenommen hatte und nach weiteren 24 h nur noch schwach detektierbar war. Nach einer Kultivierungsdauer von insgesamt 48 h sank die Expressionsintensität nicht mehr. Die restliche Detektion kann durch die Basisexpression des Tet-Promotors erklärt werden, sowie durch das PrP^C, das vor der Tet-Kultivierung gebildet wurde. Durch das weitere Wachstum der Zellen wird danach nur noch das vorhandene PrP^C verdünnt. Dieses kann noch nach weiteren 12 h detektiert werden. Nach der Bestimmung der Zeitabhängigkeit und der Tet-Konzentration der PrP^C Expression am Beispiel des C1 Klon, wurden diese Kultivierungszeiten für die Klone der anderen beiden Zelllinien N2a und 3T3 übernommen.

3.5.4 PrP^C Detektion in Zelllinien mit endogener PrP^C Expression

Die Klone der Zelllinien N2a und 3T3 besitzen jeweils ein endogenes PrP^C, welches nach der Transfektion mit dem PrP^C exprimierenden Vektor ebenfalls detektiert wurde. Zum besseren Vergleich der Zellen miteinander wurden die N2a und 3T3 Zellklone mit denselben Bedingungen wie die PrP^{0/0} Zellen kultiviert. Die Zellklone wurden mit 30 µg/ml Tet für 2 Tage kultiviert und anschließend lysiert. 30 µg des Proteingemisches wurden jeweils in eine Geltasche des SDS-PAGE-Gel gegeben und die PrP^C Expression im WB durch einen mAk-mix detektiert, dargestellt in der Abb. 46 und Abb. 47.

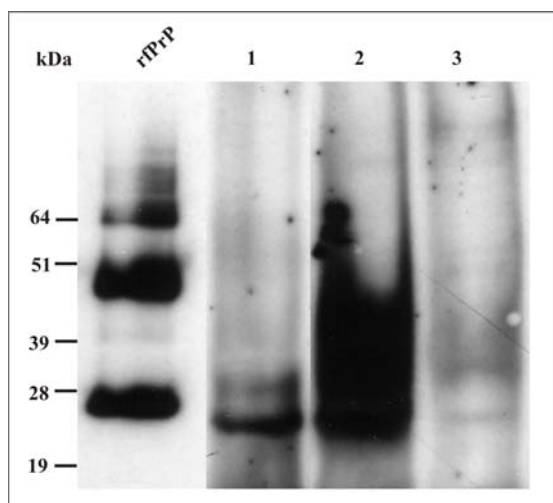


Abb. 46 WB des selektierten Klon der 3T3 Zelllinie Mit 1) 3T3 LHABT, 2) B4 Tet- und 3) B4 Tet+.

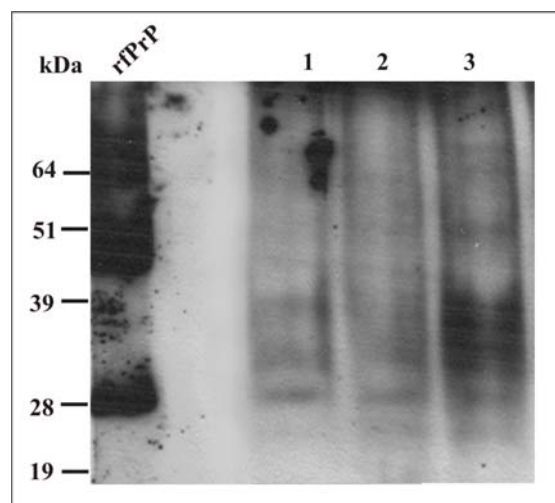


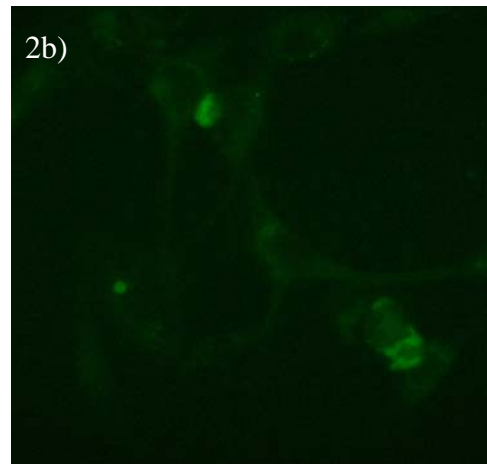
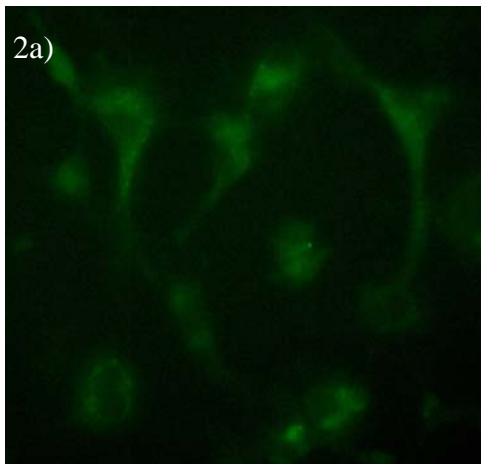
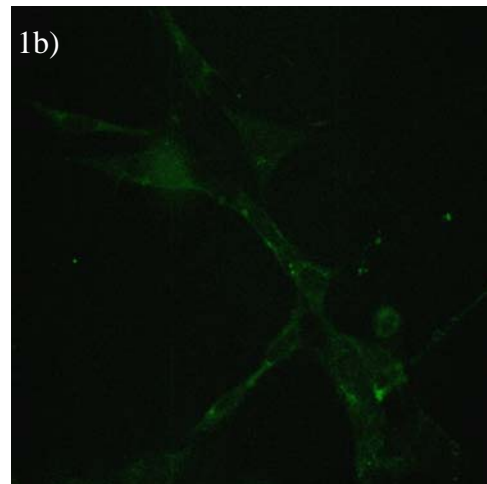
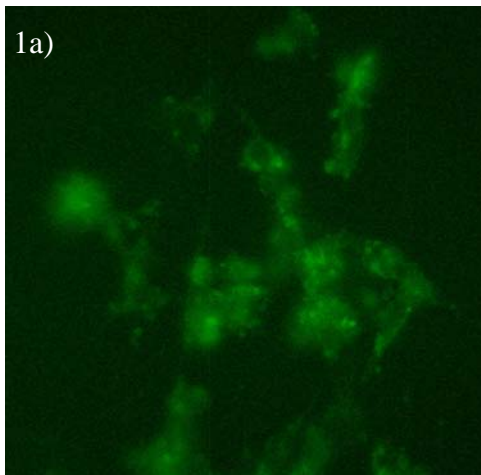
Abb. 47 WB des selektierten Klon der N2a Zelllinie Mit 1) N2a LHABT, 2) H7 Tet+ und 3) H7 Tet-.

Bei den hier gezeigten Klonen exprimiert die N2a Zelllinie das humane PrP^C und die 3T3 Zelllinie das bovine PrP^C neben dem zelleigenen PrP^C. Beide Expressionen konnten durch Tet

gesenkt werden. Das restliche detektierte PrP^C, ist durch die Basisexpression des Tet-Promotors und durch das wirtseigene PrP^C zu erklären. Welches PrP^C detektiert wurde, konnte allerdings nicht bestimmt werden, da die eingesetzten anti-PrP Ak nicht speziesspezifisch sind und Kreuzreaktionen mit dem PrP^C von Mensch, Rind und Maus durchführten.

3.6 Immunfluoreszenzanalyse der PrP^C Expression

Nach der Detektion des PrP^C im WB wurde ein Klon von jeder Zelllinie mit und ohne Tet auf einem Deckgläschen in einer Zellkulturschale für 2 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für eine Immunfluoreszenzmikroskopie aufgearbeitet (siehe 2.4.19). Die Aufnahmen dieser Mikroskopie sind in der Abb. 48 dargestellt. Alle untersuchten Zellklone besaßen eine Eigenfluoreszenz. Diese war nicht von der Immunfluoreszenz der jeweiligen Zellklone nach der Tet-Kultivierung zu unterscheiden und wurde deshalb hier nicht dargestellt. Die Immunfluoreszenz konnte bei den Zellklonen nur im Zytoplasma detektiert werden, da auf der Membranoberfläche keine Ak gebunden hatten.



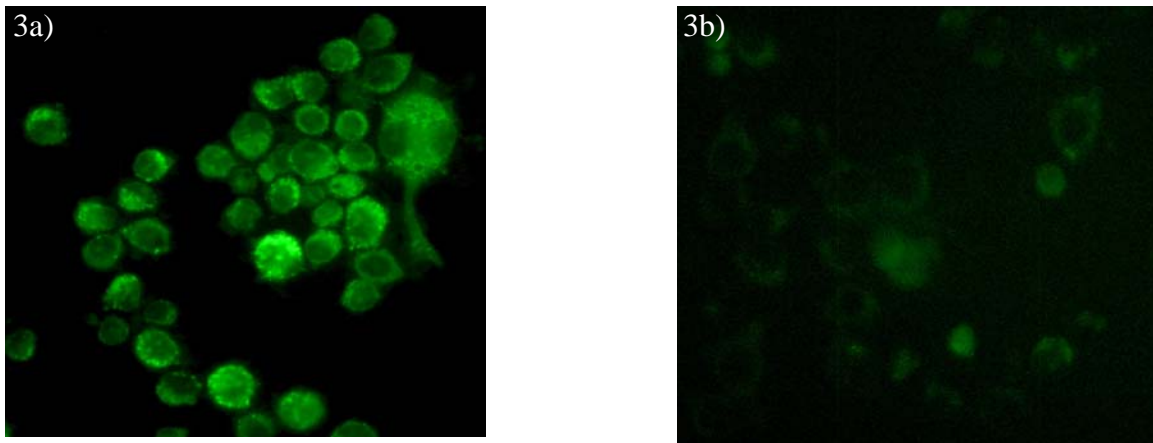


Abb. 48 Immunfluoreszenzmikroskopie der verschiedenen PrP^C exprimierenden Zellklone
Dargestellt ist die zytoplasmatische Detektion eines FITC gekoppelten Ziege anti-Maus Ak, der mit dem mAk-mix reagierte. Nach einer Anregung mit 488 nm wurde eine Emission bei 530 nm beobachtet bei 1) C1, 2) B4 und 3) H7. Die Zellen in a) wurden ohne Tet kultiviert und die Zellen in b) wurden jeweils mit 30 µg/ml Tet kultiviert.

Aus den Aufnahmen der Immunfluoreszenzmikroskopie ist erkennbar, dass bei allen Zellen eine Fluoreszenzreaktion stattgefunden hatte und das PrP^C in jeder Zelle detektiert werden konnte. Der eingesetzte Primärantikörpermix in der Immunfluoreszenzmikroskopie band sich an das PrP^C und ein FITC gekoppelter Sekundärantikörper reagierte mit diesem. Nach einer Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm kam es zu einer Emission bei 530 nm.

Diese Fluoreszenz wurde jeweils bei den Zellklonen mit und ohne Tet-Inkubation beobachtet. Bei den Zellklonen ohne Tet war eine deutliche Fluoreszenz als Reaktion auf die Anregung zu erkennen. Die Kultivierung mit Tet zeigte zwar eine Fluoreszenzreaktion, diese war aber wesentlich schwächer. Diese Fluoreszenz war auf die Eigenfluoreszenz der Zelle, die nicht unterdrückte Basisexpression des PrP^C und durch unspezifische Bindungen des Primärantikörpers an andere Proteine in der Zelle, zurückzuführen. Trotz dieser Fluoreszenz konnte die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet werden, um die PrP^C Expression in den Zellen zu beobachten, da sie geringer im Vergleich zur nicht unterdrückten Expression ist. Die deutlichste Unterscheidung der Regulation in der PrP^C Expression in der Zelle wurde beim PrP^{0/0}- und beim N2a Zellklon beobachtet. Bei dem 3T3 Zellklon dagegen war eine Unterscheidung wesentlich schwerer, da die Unterschiede mit und ohne Tet nur gering waren.

3.7 FACS Analyse der PrP^C Expression

Da eine Immunfluoreszenzmikroskopie von allen Zellklonen möglich war, konnte die Expression des PrP^C auch durch die FACS Analyse bestimmt werden. Dazu wurden jeweils 1×10^6 Zellen aufgearbeitet (siehe 2.4.21). Zur Detektion der Fluoreszenz im FACS (LSR II) wurden die gleichen Ak wie bei der Immunfluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Untersucht wurden dabei sowohl die jeweiligen PrP^C exprimierenden Zellklone mit und ohne Tet als auch die Zellklone aus denen diese doppelt stabilen Zellen hervorgegangen waren. In der Abb. 49 sind die Ergebnisse der FACS Analyse dargestellt.

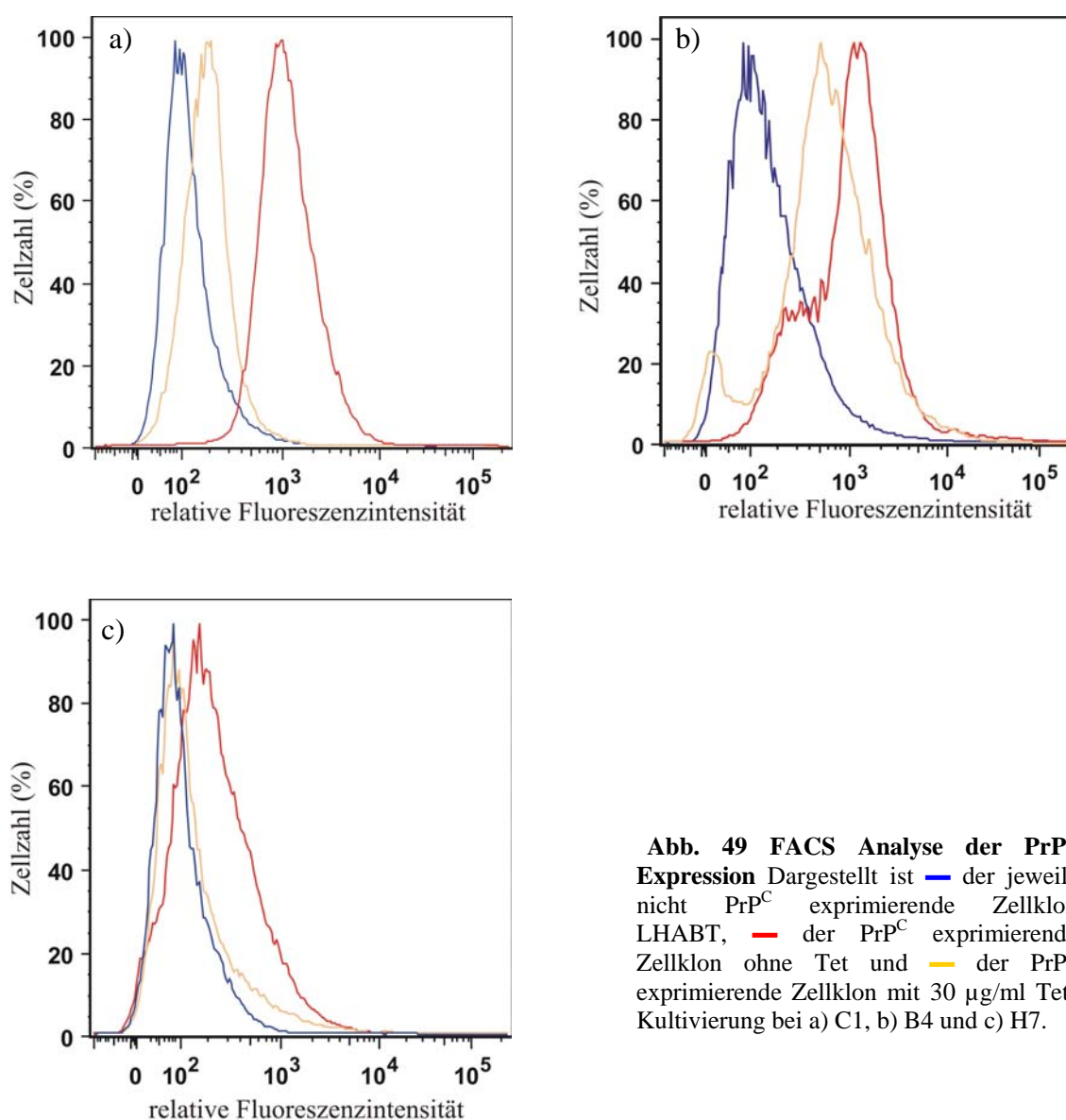


Abb. 49 FACS Analyse der PrP^C Expression Dargestellt ist — der jeweils nicht PrP^C exprimierende Zellklon LHABT, — der PrP^C exprimierende Zellklon ohne Tet und — der PrP^C exprimierende Zellklon mit 30 µg/ml Tet-Kultivierung bei a) C1, b) B4 und c) H7.

Aus den FACS Messungen ist erkennbar, dass sich das PrP^C in den verschiedenen Zelllinien nachweisen ließ. Ebenso, dass sich bei allen drei Zelllinien die PrP^C Expression im jeweiligen

Zellklon an- und abstellen ließ. Die dabei auftretenden Unterschiede zwischen den Zellklonen mit und ohne exprimiertem PrP^C waren immer signifikant. Der Unterschied der doppelt stabilen regulierbaren PrP^C exprimierenden Zellen zu dem Zellklon aus dem diese hervorgegangen waren, ist ebenfalls gut zu sehen.

Besonders deutlich war die Regulation der Expression durch Tet in dem PrP^{0/0} Zellklon zu erkennen. Bei diesem war der deutlichste Fluoreszenzunterschied zwischen den Zellen mit und ohne Tet-Kultivierung zu sehen. Hierbei wurde eine Differenz von einer Zehnerpotenz detektiert. Wurde dieser Zellklon mit Tet kultiviert, war die Fluoreszenzintensität fast gleich dem nicht PrP^C exprimierenden PrP LHABT Zellklon. Die gezeigte Fluoreszenz war nur leicht erhöht, verursacht wurde dies durch die Basisexpression des Tet-Promotors.

Bei den 3T3 Zellen war eine Unterscheidung des PrP^C exprimierenden Klons mit und ohne Tet-Kultivierung zum nicht exprimierenden Klon möglich. Die Fluoreszenzintensität unterschied sich zwischen der PrP^C Expression und dem Klon ohne diese Expression wieder um eine Zehnerpotenz. Bei der Kultivierung mit Tet war eine wesentlich höhere Basisexpression festzustellen. Trotzdem war eine Differenzierung zur Kultivierung ohne Tet gut möglich, da diese beiden Zustände des Zellklons sich deutlich voneinander abhoben.

Bei dem N2a Zellklon war die Unterscheidung schwieriger, es zeigte sich hier nur eine 2 bis 3-fach höhere Fluoreszenz bei dem PrP^C exprimierenden Zellen ohne Tet im Verhältnis zu den Ursprungszellen. Wurden die PrP^C exprimierenden Zellen mit Tet kultiviert, waren keine Unterschiede zu den N2a LHABT Zellen zu sehen. Aufgrund der hier gezeigten Intensitätsunterschiede war eine Differenzierung der Zellen möglich, aber wesentlich schwieriger als bei den anderen beiden Zelllinien.

Durch die verschiedenen Fluoreszenzen konnten alle PrP^C exprimierenden Zellklone ohne Tet-Kultivierung von ihren ursprünglichen Zellen abgegrenzt werden. Auch konnten die Unterschiede mit und ohne Tet-Inkubation bei allen Zellen gezeigt werden. Aus diesem Grund ist die FACS Analyse bei der weniger Zellen benötigt wurden als beim WB, besser geeignet zur schnellen Differenzierung und Selektion transfizierter gegenüber nicht transfizierter Zellen.

3.8 Sekundärstrukturanalyse durch die CD-Spektroskopie

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie kann die Sekundärstruktur von Proteinen untersucht werden. Da es bei TSE-Erkrankungen zu einer Konformationsänderung des Prion Proteins kommt, ist es möglich, das PrP^C und PrP^{Sc} anhand der Sekundärstruktur zu differenzieren. Weil sich beide Isoformen in der Fähigkeit Kupfer zu binden unterscheiden, konnte eine IMAC

durchgeführt werden um diese zu trennen. In den IMAC-Fractionen waren neben dem PrP^C oder PrP^{Sc} noch weitere Proteine enthalten. Daher wurden diese Fractionen zunächst bei der PrP^{0/0} Zelllinie und dem C1 Zellklon untersucht, um zu prüfen, ob eine Unterscheidung der Sekundärstruktur prinzipiell möglich war. Da lediglich die PrP^{0/0} Zellen kein endogenes PrP aufwiesen, wurden nur die Proteinextrakte dieser Zelllinie und deren transfizierte Klone mittels CD-Spektroskopie untersucht, weil bei dieser Zelllinie sichergestellt war, dass nur das transfizierte PrP^C detektiert wurde.

Für diese Analyse wurden die Zellen mit dem E1A-Puffer lysiert. Anschließend wurde der Proteinüberstand solubilisiert (siehe 2.4.17) und durch eine IMAC in verschiedene Fractionen aufgetrennt (siehe 2.4.16). Nach der Konzentrationsbestimmung der verschiedenen IMAC-Fractionen wurden jeweils 30 µg auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen, geblottet und mit dem ECL-System detektiert, dargestellt in der Abb. 50. Da die Kupferionen in der Elutionsfraction die CD-Spektroskopie störten, wurden diese durch eine anschließende Dialyse entfernt (siehe 2.1.11). Die jeweiligen Vergleichsfractionen zwischen dem C1 Zellklon und dem PrP LHABT Zellklon wurden anschließend mittels CD-Spektroskopie untersucht. Hierbei wurde der PrP LHABT Zellklon statt der PrP^{0/0} Zelllinie verwendet, da er ebenfalls das tTA-Element besitzt und dem C1 Klon somit ähnlicher ist.

Für die CD-Spektroskopie wurde jeweils 1 mg der jeweiligen Proteinfraction verwendet. Die Proteine wurden in CD-Puffer (10 mM Tris, 100 mM KCl, 320 mM Saccharose, 10 % Glycerin, 0,01 % (v/v) NP40, pH 7,5) resuspendiert und in einer 1 mm Küvette gemessen. Die Resultate sind in der Abb. 51 dargestellt.

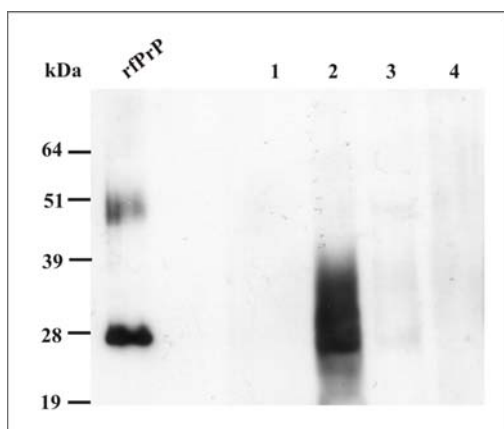
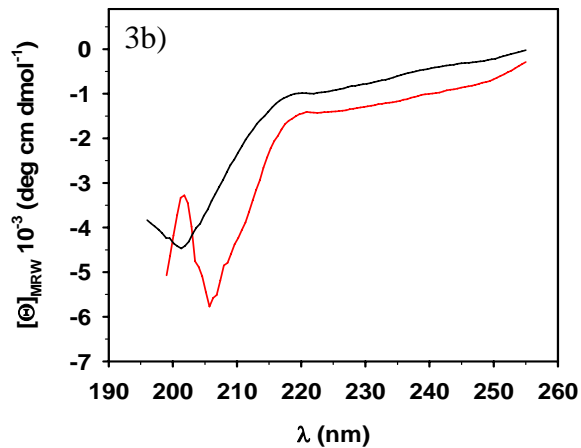
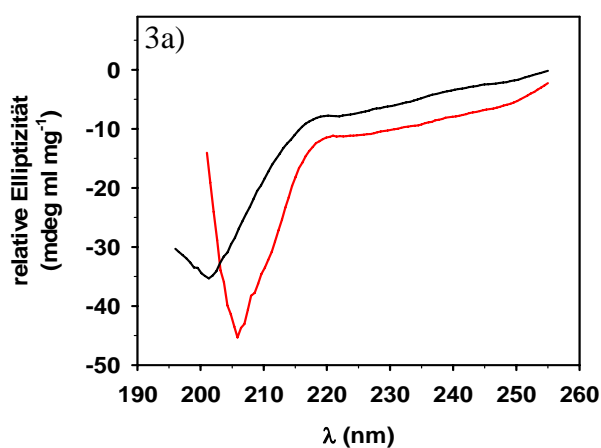
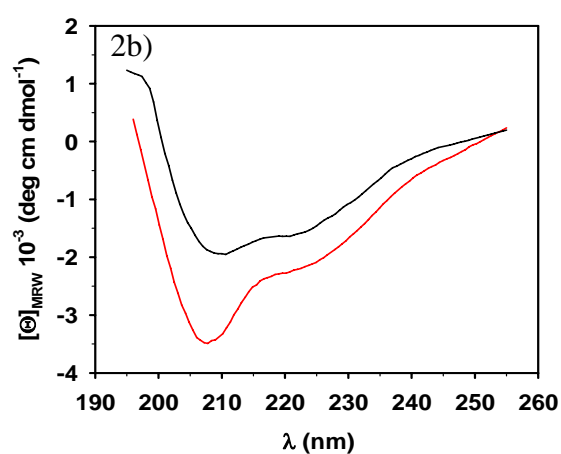
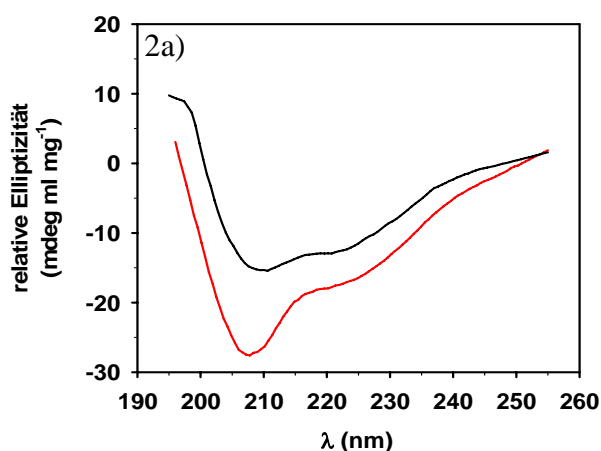
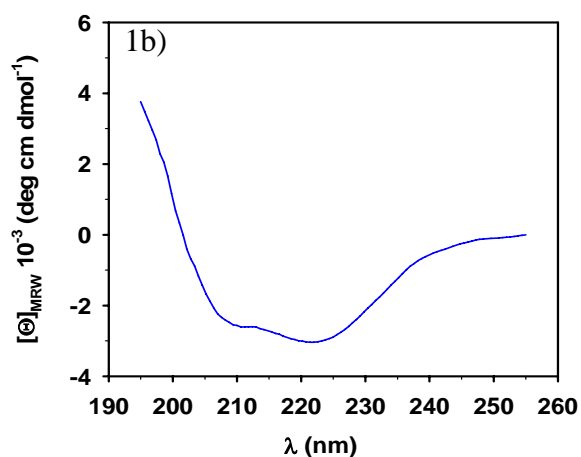
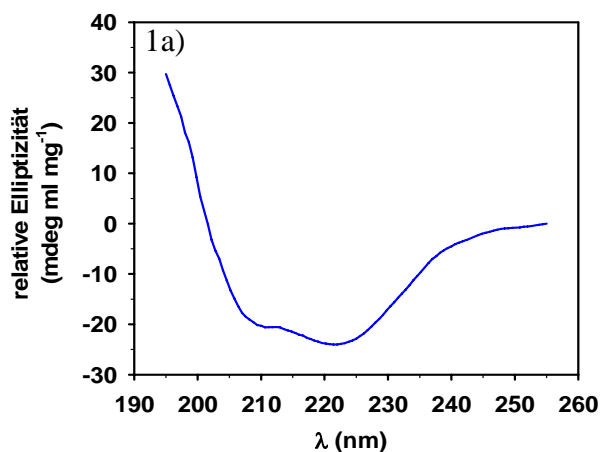


Abb. 50 WB der IMAC des nicht infizierten C1 Klons Dargestellt ist 1) der Durchlauf, 2) die Elutionsfraction 1, 3) die Elutionsfraction 2 und 4) die Waschfraction.

Aus den IMAC-Fractionen war zu erkennen, dass im Durchlauf kein detektierbares PrP gefunden wurde. Dieses wurde nur in der Elutionsfraction 1 in großen und in der Elutionsfraction 2 in kleineren Mengen gefunden.

Bei der Waschfraktion war keine definierte Bande zu erkennen, sondern nur ein Proteinschmier. Die verschiedenen Fraktionen wurden anschließend dialysiert und danach lyophilisiert. Ein Milligramm dieser Proteinlyophilisate wurde für die anschließende CD-Spektroskopie eingesetzt. Da die Proteinprobe neben dem PrP^C auch andere Proteine enthält, wurde neben der herkömmlichen Darstellung von $[\Theta]_{MRW}$ („*mean residue weight*“) auch eine Auswertung in Bezug auf die Gesamtproteinkonzentration in mg/ml durchgeführt.



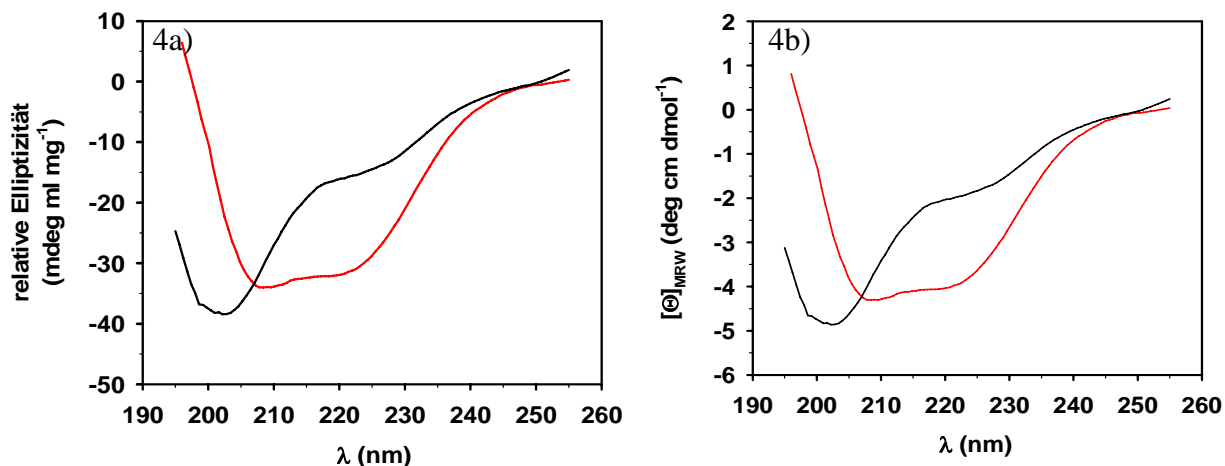


Abb. 51 CD-Spektren der IMAC-Proben Dargestellt ist bei 1) das rfPrP, 2) die Elutionsfraktion 1, 3) die Elutionsfraktion 2 und 4) der Waschfraktion jeweils bezogen auf (a) die relative Elliptizität des Protein-gemischs und (b) den $[\Theta]_{MRW}$ Wert, bezogen auf das Prion Protein, dies ist sowohl bei dem — C1, bei dem — PrP LHABT Zellklon und dem — rfPrP dargestellt.

Aus der Abb. 51 ist ersichtlich, dass das rfPrP eine deutlich helikale Struktur aufwies, die als Vergleichswert für die anderen Proteinproben verwendet werden konnte. In der Elutionsfraktion 1 zeigte der C1 Klon ein deutliches Helix-Signal im Vergleich zum PrP LHABT Zellklon. Das ist darauf zurückzuführen, dass in der C1 Probe neben den anderen Proteinen das helikale PrP^C gemessen wurde. Da PrP^C nicht im PrP LHABT Zellklon exprimiert wurde, wies dessen Proteinsignal auch wesentlich weniger helikale Strukturen auf (Abb. 51.2a und b). In der Elutionsfraktion 2 war der Unterschied zwischen den beiden Signalen schon nicht mehr so stark ausgeprägt (Abb. 51.3a und b). Dies kann mit dem in dieser Fraktion deutlich erhöhten Anteil denaturierten Proteins, erkennbar an dem starken negativen Signal bei ca. 200 nm, erklärt werden.

In der IMAC-Waschfraktion zeigen sich ähnliche Sekundärstrukturanteile in den beiden Proben, das deutete darauf hin, dass kein helikales PrP^C in dieser Fraktion vorhanden war. Das wurde auch durch den WB der IMAC-Fraktion bestätigt. Also mussten die CD-spektroskopisch gefundenen Unterschiede auf den Signalen anderer Proteine beruhen.

Die CD-Spektren der verschiedenen IMAC-Fractionen zeigten, dass es möglich war, die verschiedenen Klone mit und ohne PrP^C Expression voneinander zu unterscheiden. Somit sollte es auch möglich sein, eine Konformationsänderung des PrP^C nach einer TSE-Infektion in der Zellkultur mit dieser Methode zu unterscheiden.

3.9 Ko- und Überexpression von Proteinen in einem reguliert PrP^C exprimierenden PrP^{0/0} Zellklon

Zur Analyse von neben dem PrP^C ko- oder überexprimierten Proteinen wurde eine 2D-Analyse vom C1 Zellklon und dem PrP^{0/0} LHABT Zellklon durchgeführt. Dazu wurden 1×10^6 Zellen lysiert und zentrifugiert. Der Überstand des Zelllysats wurde für diese Untersuchungen verwendet. Er enthielt durch den Lysepuffer zu viele Salze, die durch eine Dialyse entfernt werden mussten (siehe 2.1.11), da sie die Proteinauftrennung in der ersten Dimension störten. Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden 200 µg des gereinigten Zellüberstandes verwendet (siehe 2.4.22). Nachdem die Gele die zweite Dimension durchlaufen hatten, wurden sie durch Coomassie-Blau angefärbt. Die Gele wurden miteinander verglichen, die Spots die stärker ausgeprägt und neu dazugekommen waren, wurden ausgestochen und in einer MS Analyse identifiziert durch Dr. Olaf Jahn am MPI für experimentelle Medizin in Göttingen. Zur eindeutigen Identifizierung der Proteine wurden jeweils 5 Strips von jedem Zelllysats für die IEF aufbereitet und anschließend auf 2D-Gelen analysiert. Ein Beispiel für die Koexpression von Proteinen neben der PrP^C Expression ist in der Abb. 52 durch die 2D-Bilder des C1 und PrP LHABT Klons dargestellt. Die durch die Massenspektrometrie identifizierten potenziellen Proteine für die Ko- oder Überexpression, wurden zusammengefasst in der Tab. 11 dargestellt.

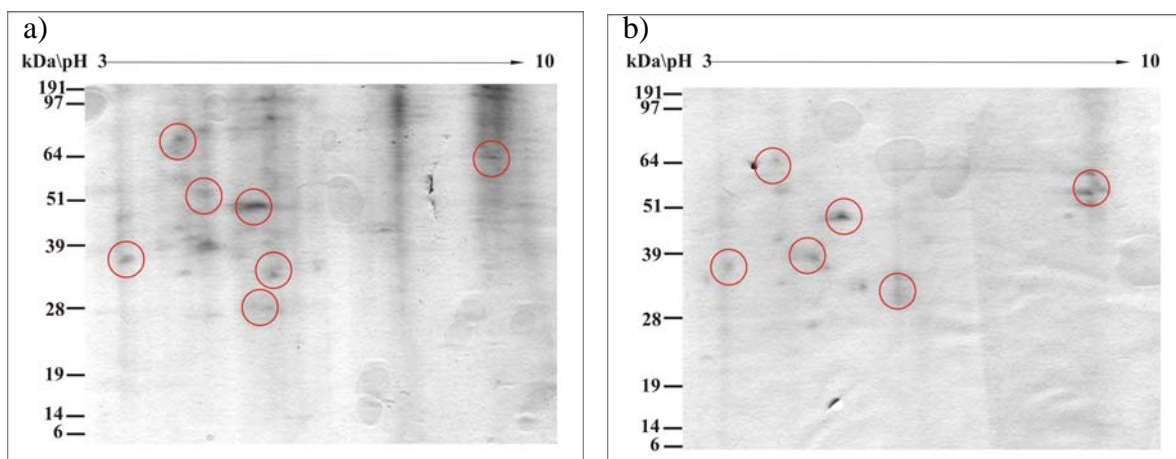


Abb. 52 2D-Gel der PrP^{0/0} Zellklone Beispiel für die zwei Zustände der Zellen bei a) C1 Zellklon mit PrP^C Expression und b) PrP LHABT Zellklon ohne PrP^C Expression.

Tab. 11 Zusammenfassung der identifizierten potenziellen Proteine aus der MS

Protein	Entrezeintrag am NCBI	Analysemethode	Wahrscheinlichkeit der Identifizierung
Coffin	gi 37194891	MS/MS	sehr hoch
Cu/Zn Superoxiddismutase	gi 226471	MS/MS	sehr hoch
Stathmin 1	gi 14625464	MS/MS	sehr hoch
Putative Nukleotid-Zucker- Dehydrogenase	gi 19747796	MS/MS	gering
Lectin	gi 6678682	MS/MS	sehr hoch
Cholesteroxidase	gi 24216708	MS/MS	gering
Calcyclin	gi 14789726	MS/MS	gering
Glykoprotein B	gi 4456251	MS/MS	gering
eingehülltes Glykoprotein	gi 6469561	MS/MS	gering
Enolase 1	gi 54673814	Fingerprint	sehr hoch
Aldolase 1	gi 27695278	MS/MS	sehr hoch
Zwei-Komponentenregulatorprotein	gi 17742346	MS/MS	hoch
Peroxiredoxin 6	gi 6671549	MS/MS	sehr hoch
Tropomyosin 4	gi 47682809	MS/MS	sehr hoch
Cc2d1a Protein	gi 20988947	MS/MS	gering
Acyl-Coenzym A Dehydrogenase	gi 16740777	Fingerprint	gering
Morc4 Protein	gi 68534224	MS/MS	gering
Stress-induziertes Phosphoprotein 1	gi 14389431	MS/MS	sehr hoch
Profilin 1	gi 56206029	MS/MS	hoch
mKIAA0357 Protein	gi 28972169	MS/MS	hoch
Hspd-1 Protein	gi 76779273	MS/MS	sehr hoch
Voltabhängiges selektives Anionkanalprotein 1	gi 10720404	MS/MS	sehr hoch

Bei der Identifizierung wurden auch Proteine mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit detektiert, das lag daran, dass unter den identifizierten Proteinen noch weitere Proteine vorhanden waren. Besonders häufig waren dies die Hitzeschockproteine.

3.10 Infektion der stabil PrP^C exprimierenden Zelllinien

Die Infektion der Zelllinien und Zellklone erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll von S. Lehmann, 2005. Alle Zellen wurden dazu im S2 Bereich angezogen und gegebenenfalls mit Tet präkultiviert. Die Infektion und weitere Anzucht sowie die Analyse der Zellen erfolgte dann im S3 Bereich, da aufgrund der biologischen Sicherheitseinstufung von S3** nur dort mit TSE-Material gearbeitet werden durfte.

Das Schema der Infektion von Zellen mit TSE-Material ist in der Abb. 53 dargestellt. Die Zellen wurden dazu mit und ohne 30 µg/ml Tet kultiviert. Nach 2 Tagen wurden diese Zellen mit 1% igem (w/v) infektiösem Rinderhirnhomogenat infiziert (siehe 2.4.15). Nach 2 weiteren Tagen wurden die Zellen für die jeweilige Analysemethode aufgearbeitet.

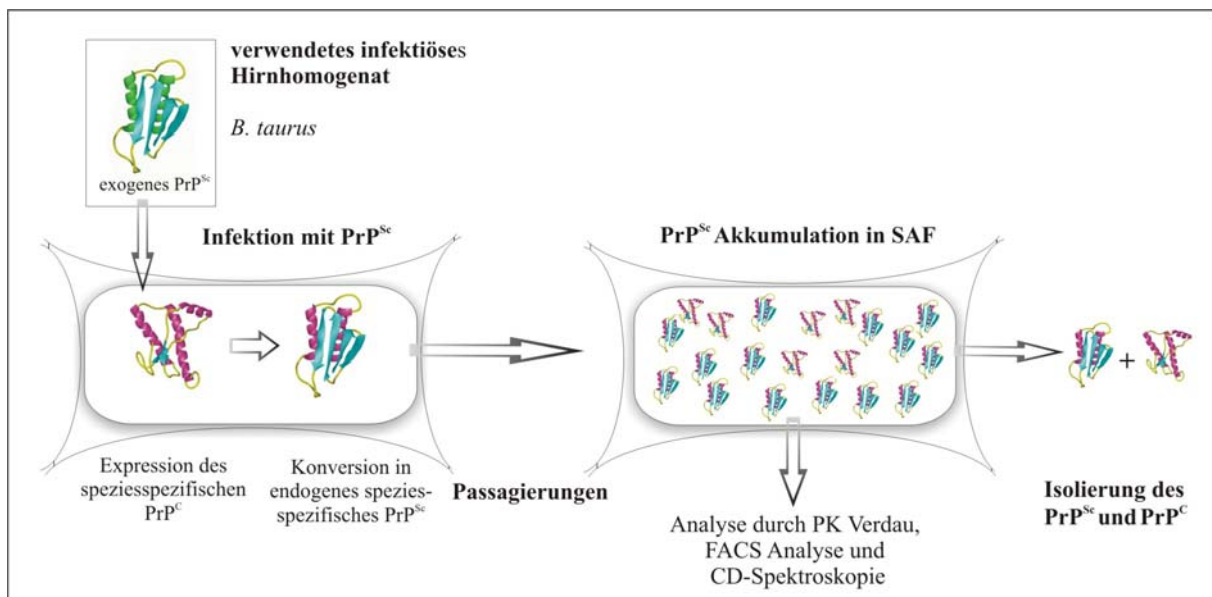


Abb. 53 Infektion einer Zelllinie mit TSE Eine PrP^C exprimierende Zelllinie wurde mit PrP^{Sc} vom Rind infiziert. Dies führte zu einer Konversion des PrP^C in PrP^{Sc} und zu dessen Replikation. Das entstandene PrP^{Sc} konnte vom PrP^C isoliert werden. Es konnte durch den PK Verdau auf dem WB und eine FACS Analyse detektiert werden. Ebenso besteht die Möglichkeit einer Unterscheidung in der CD-Spektroskopie.

3.11 Etablierung des PK Verdaus

Nach einem PK Verdau der beiden PrP Isoformen konnte nur noch die degradierte Form des PrP^{Sc}, das PrP^{res}, detektiert werden. Hierzu, musste aber zuvor die Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der PK-Konzentration bestimmt werden. Diese wurde anhand des infektiösen Rinderhirnhomogenats bestimmt. Die verwendeten Rinderhirnhomogenate

wurden von infizierten Rindern aus England gewonnen und hatten die Referenznummern 1823 und 1990.

3.11.1 PK-Konzentrationsabhängigkeit des PK Verdaus

Zur Bestimmung der optimalen PK-Konzentration zum Nachweis von PrP^{res} wurde die Konzentration von 0 bis 500 µg/ml variiert. Dazu wurden 50 µg 10%iges (w/v) infektiöses Rinderhirnhomogenat mit jeweils 0, 10, 20, 100, 200 und 500 µg/ml PK für 60 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 M PMSF in Isopropanol abgestoppt. Anschließend wurde der Ansatz in LDS-Puffer aufgenommen und auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Die Detektion erfolgte dann im WB, dargestellt in der Abb. 54.

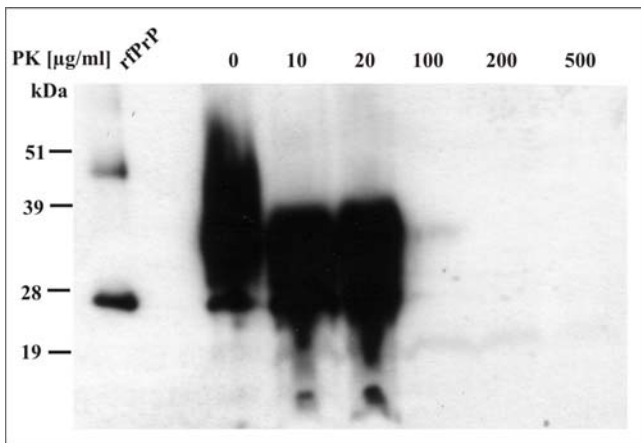


Abb. 54 Detektion von PrP^{res} im PK abhängigen Verdaus
Jeweils 50 µg eines 10%igem (w/v) infektiösen Rinderhirnhomogenates wurden mit 0, 10, 20, 100, 200 und 500 µg/ml PK für 30 min inkubiert, danach wurde die Reaktion abgestoppt und PrP^{res} im WB mit dem mAk-mix detektiert.

Aus der Abb. 54 ist erkennbar, dass bei einer Konzentration von 10 µg/ml und 20 µg/ml eine Degradation von PrP^{Sc} zu PrP^{res} stattgefunden hatte. Es war deutlich zu sehen, dass eine Verschiebung zwischen dem unverdauten PrP^{Sc} und dem verdauten PrP^{Sc}, bei dem nur noch das PrP^{res} zu erkennen war, auftrat. Dieses besitzt zwar ebenfalls drei Banden, allerdings hatten diese eine Größe von 19 kDa bis 32 kDa und nicht wie das PrP^{Sc} oder PrP^C eine Größe von 25 kDa bis 37 kDa. Diese Verschiebung wird als „*shift*“ bezeichnet. Bei einer Konzentration von 100 µg/ml hatte dieser Abbau ebenfalls stattgefunden, allerdings war dieser weiter fortgeschritten, so dass kaum noch PrP^{res} zu detektieren war. Bei höheren Konzentrationen war nur noch eine schwache Bande bei 19 kDa zu erkennen. Diese war wahrscheinlich die unglykosylierte Form des PrP^{res}, die anderen beiden glykosylierten

Formen wurden schon zuvor durch die PK abgebaut. Da nach 30 min nur noch eine schwache Bande bei einer PK-Konzentration von 100 µg/ml zu detektieren war, wurde diese Konzentration zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit des PK Verdaus verwendet.

3.11.2 Zeitabhängigkeit des PK Verdaus

Zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit des PK Verdaus wurden 50 µg 10%iges (w/v) infektiöses Rinderhirnhomogenat mit 100 µg/ml PK inkubiert. Diese Reaktion wurde nach verschiedenen Zeitintervallen gestoppt und auf einem WB durch das ECL-System detektiert, dargestellt in der Abb. 55.

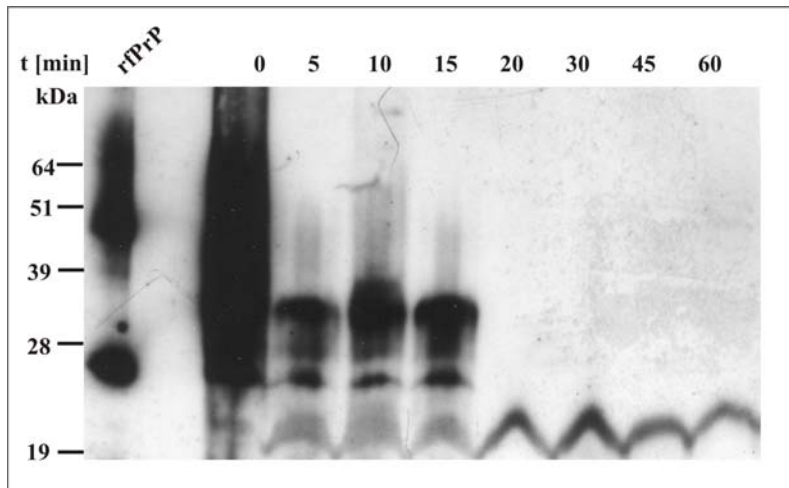


Abb. 55 Detektion von PrP^{res} im zeitabhängigen PK Verdaus Jeweils 50 µg eines 10%igem (w/v) infektiösem Rinderhirnhomogenat wurden mit 100 µg/ml verdaut und nach 5, 10, 15, 20, 30, 45 und 60 min abgestoppt. Detektiert wurde das PrP^{res} mit dem mAk-mix im WB.

Aus der Abb. 55 ist erkennbar, dass schon nach 5 min das PrP^{Sc} zu PrP^{res} abgebaut wurde. Die gleiche Degradation war auch nach 10 min und 15 min festzustellen. Dagegen war nach 20 min und längerer Inkubation nur noch eine schwache Bande bei 19 kDa zu sehen. Obwohl mit derselben Konzentration schon die Konzentrationsabhängigkeit bestimmt wurde, deutete dies daraufhin, dass der PK Verdaus auch noch von anderen unbekanntem Faktoren abhängig war.

Da aber vergleichbare Werte für den PK Verdaus benötigt wurden, wurde jeder weitere PK Verdaus für 10 min mit einer Konzentration von 100 µg/ml durchgeführt und danach gestoppt.

3.11.3 Detektion von PrP^{Sc} in infizierten Zellkulturen

Von den PrP^{0/0}, N2a und 3T3 Zelllinien wurde jeweils ein nicht transfizierter LHABT Klon und ein PrP^C exprimierender Klon, mit und ohne Tet wie beschrieben, inkubiert und mit 1%igem (w/v) infektiösen Rinderhirnhomogenat infiziert (siehe 2.4.15). Nach 2 Tagen wurden diese Zellen lysiert und für einen WB aufgearbeitet. Anschließend wurde ein PK Verdau mit diesen Klonen, wenn sie die gleiche regulierbare Expression aufwiesen wie bisher beschrieben, durchgeführt, dargestellt in der Abb. 56.

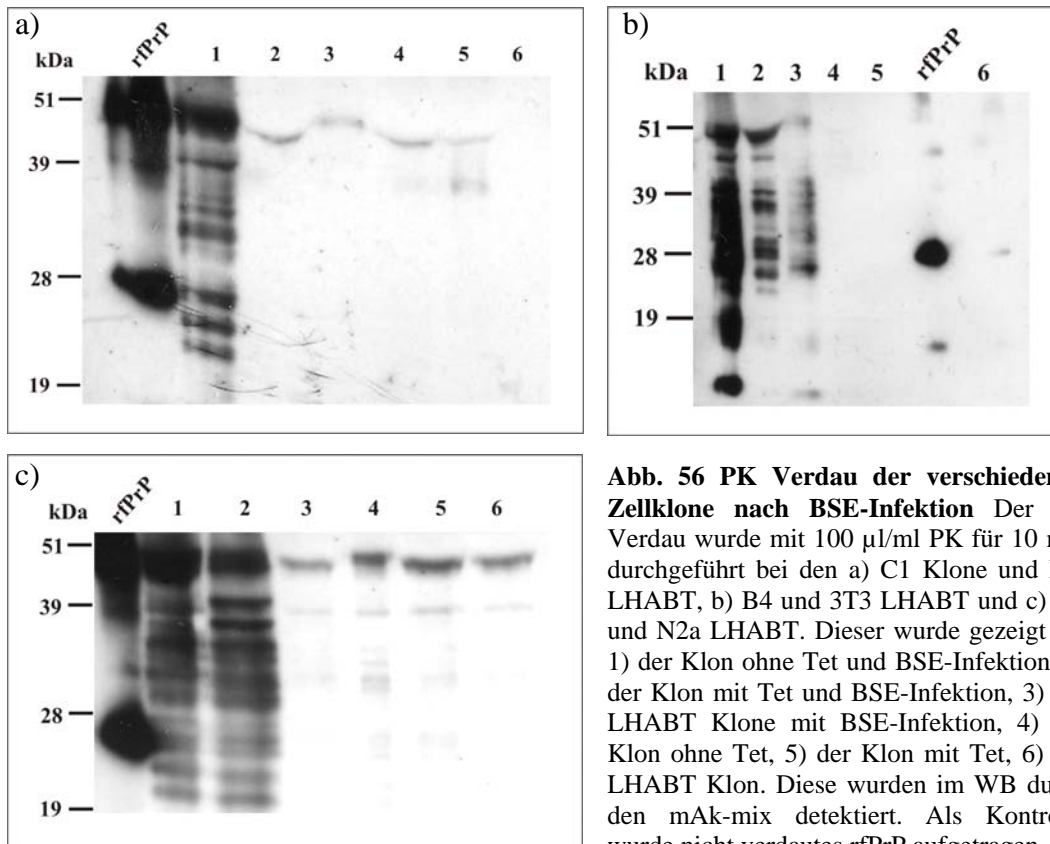


Abb. 56 PK Verdau der verschiedenen Zellklone nach BSE-Infektion Der PK Verdau wurde mit 100 μ l/ml PK für 10 min durchgeführt bei den a) C1 Klone und PrP LHABT, b) B4 und 3T3 LHABT und c) H7 und N2a LHABT. Dieser wurde gezeigt bei 1) der Klon ohne Tet und BSE-Infektion, 2) der Klon mit Tet und BSE-Infektion, 3) der LHABT Klone mit BSE-Infektion, 4) der Klon ohne Tet, 5) der Klon mit Tet, 6) der LHABT Klon. Diese wurden im WB durch den mAk-mix detektiert. Als Kontrolle wurde nicht verdautes rfPrP aufgetragen.

Aus der Abb. 55 geht hervor, dass nach einem PK Verdau der PrP^{0/0} Zellen nur bei dem C1 Klon ohne Tet-Kultivierung PrP^{res} nach einer BSE-Infektion zu finden war. Bei den anderen Zellen waren keine Banden zu detektieren.

Bei den beiden Zelllinien, 3T3 und N2a, war neben der Infektion und Inkubation ohne Tet auch bei der Inkubation mit Tet die Detektion von PrP^{res} nach dem PK Verdau möglich. Bei den 3T3 Zellen war zusätzlich eine Detektion von PrP^{res} beim nicht transfizierten Zellklon zu erkennen. Die dabei detektierte Menge war allerdings wesentlich geringer als bei dem PrP^C überexprimierten Zellklon. Ebenfalls war bei den N2a und 3T3 Zellklonen ohne BSE noch eine schwache Bande, durch einen unvollständigen Verdau der Proteine, zu erkennen.

3.12 FACS Analyse der infizierten Zellklone

Die infizierten Zellklone wurden ebenfalls für eine Immunfluoreszenzmikroskopie aufgearbeitet. Hierbei konnten aber keine wahrnehmbaren Unterschiede zwischen den mit BSE infizierten und den uninfizierten PrP^C überexprimierenden Zellklonen beobachtet werden. Da sie aber auf die Anregung eine starke Fluoreszenz zeigten, wurden diese Klone mit einer FACS Analyse genauer untersucht. Dazu wurden die 1×10^6 Zellen vom C1, B4 und H7 Klon mit und ohne 30 $\mu\text{g/ml}$ Tet sowie ein LHABT Klon von jeder Zelllinie für 2 Tage kultiviert. Danach wurden die Zellen mit 1%igem (w/v) infektiösem Rinderhirnhomogenat infiziert (siehe 2.4.15). Nach einem Tag wurde das Medium gewechselt und nach einem Weiteren wurden die Zellen für die FACS Analyse aufgearbeitet und im S3 Labor des Paul-Ehrlich Instituts in Langen untersucht.

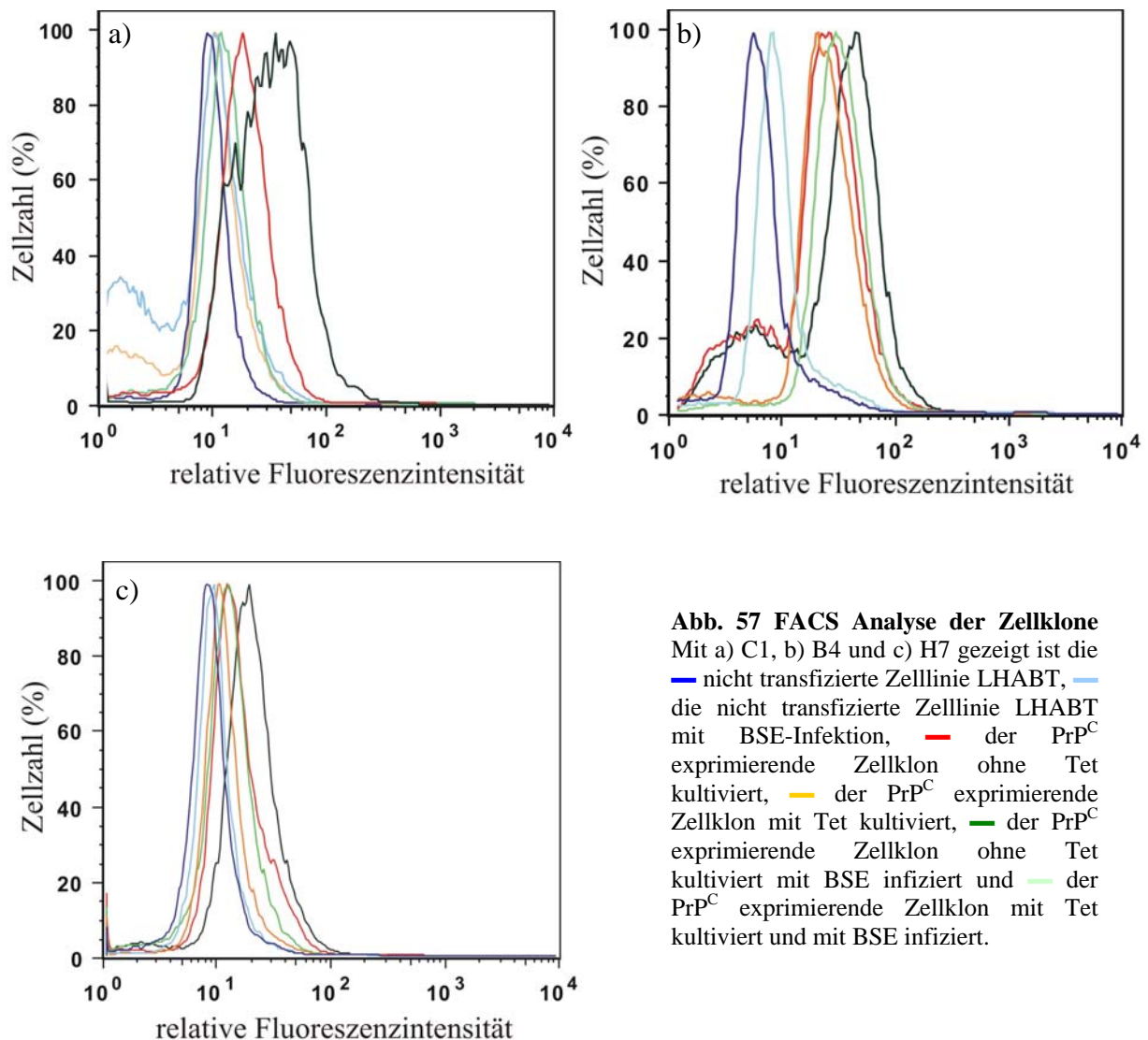


Abb. 57 FACS Analyse der Zellklone
 Mit a) C1, b) B4 und c) H7 gezeigt ist die
 — nicht transfizierte Zelllinie LHABT, —
 die nicht transfizierte Zelllinie LHABT
 mit BSE-Infektion, — der PrP^C
 exprimierende Zellklon ohne Tet
 kultiviert, — der PrP^C exprimierende
 Zellklon mit Tet kultiviert, — der PrP^C
 exprimierende Zellklon ohne Tet
 kultiviert mit BSE infiziert und —
 der PrP^C exprimierende Zellklon mit Tet
 kultiviert und mit BSE infiziert.

In der Abb. 57 ist anhand der Fluoreszenzintensitäten zu erkennen, dass sich die PrP^C Expression in den Zellklonen C1, B4 und H7 durch Tet reguliert an- und abstellen ließ. Diese Resultate waren mit den in der Abb. 48 dargestellten vergleichbar. Bei den nur die Regulation nicht aber die Infektion mit BSE untersucht wurde. Die hier gezeigten Zellen hatten untereinander die gleichen Eigenschaften in Bezug auf die Basisexpression und das Regulationsvermögen der PrP^C Expression. Die dargestellten Fluoreszenzintensitäten waren aber geringer als bei den in der Abb. 48 gezeigten Zellen. Dies lag daran, dass ein anderes FACS Gerät benutzt wurde und die Grundeinstellung bei den Messungen höher war, so dass die erhaltene Fluoreszenzintensität geringer ausfiel. Deshalb war ein direkter Vergleich der Intensitäten nicht möglich. Wohl aber die Verhältnisse derselben. Dies konnte auch deshalb durchgeführt werden, da die Messungen öfters am Paul-Ehrlich Institut wiederholt wurden. Dabei zeigte sich, dass die Verhältnisse die Gleichen bei den 3T3 und N2a Zellen waren. Bei den PrP^{0/0} Zellen dagegen, waren diese zwischen dem C1 Klon mit PrP^C Expression und dem LHABT Klon geringer. Trotzdem waren die Unterschiede immer signifikant.

Nach einer BSE-Infektion wurde bei fast allen Zellen eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität beobachtet, nur bei den PrP^{0/0} Zellen war diese gleich geblieben. Bei dem C1 Klon mit Tet-Kultivierung gab es nur eine sehr geringe kaum zu detektierende Erhöhung, im Gegenansatz dazu war die Fluoreszenzstärke ohne Tet nach einer BSE-Infektion bei dem gleichen Klon wesentlich stärker ausgeprägt. Sie erhöhte sich dabei um fast das 9-fache, weshalb sie sich deutlich von den anderen unterschied.

Bei den anderen beiden Zelllinien, N2a und 3T3, war ebenfalls eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität nach der BSE-Infektion zu messen. Dies war allerdings bei allen mit BSE infizierten Zellen der Fall. Sie erhöhte sich dabei jeweils um das 3-fache. Diese Erhöhung wurde sowohl bei einer Kultivierung mit Tet als auch bei dem LHABT Zellklon dieser beiden Zelllinien detektiert. Trotzdem waren diese Fluoreszenzen immer noch geringer als die des Zellklons ohne Tet nach einer BSE-Infektion.

4 Diskussion

Das Prion Protein ist ein ubiquitär vorkommendes Protein. Es kann eine Erkrankung auslösen wenn es seine natürliche Konformation verändert und in eine falsch gefaltete pathogene Konformation überführt wird. Neben dieser pathogenen gibt es auch apathogene Fehlfaltungen (Abid *et al.*, 2006). Diese werden durch Proteasen abgebaut und können nicht detektiert werden. Sie sind nur durch verschiedene Intermediate gezeigt worden. Die pathogene Isoform neigt zur Aggregation und kann durch einen PK Verdau als degradierte Form, das PrP^{res}, nachgewiesen werden. Dieser Unterschied zwischen den beiden Isoformen ist im WB zu erkennen.

Da die pathogene Isoform die gleiche Primärstruktur wie die apathogene besitzt, aber einen wesentlich höheren β -Faltblattanteil hat, können diese Isoformen anhand ihrer Sekundärstruktur unterschieden werden. Diese Konformationsänderung wurde bisher nur in Organismen beobachtet, deshalb wurden nur Bioassays zur Klärung der Fehlfaltung des Proteins und deren Auswirkungen angewandt.

Erst vor kurzem ist eine „*in vitro*“ Replikation des PrP^{Sc} gelungen (Kocisko *et al.*, 1995; Bossers *et al.*, 2003; Breydo *et al.*, 2005), allerdings ist nicht abzuschätzen, ob diese künstliche Form andere Organismen infizieren und in wie weit diese übertragen werden können. Aus diesem Grund wurde die Übertragung einer TSE-Infektion im Zellkulturmodell untersucht.

4.1 Expression und Detektion des rPrP in *E. coli*

Es war gelungen, das *prnp* Gen aus verschiedenen Spezies zu amplifizieren. Diese Gene wurden in einen Bakterienexpressionsvektor kloniert und konnten in *E. coli* translatiert und überexprimiert werden (Mehlhorn *et al.*, 1996). Anschließend konnten die rPrP über IB gereinigt werden (Alvarez-Martinez *et al.*, 2003). Die gereinigten Proteine lagen alle in ihrer unglykosylierten Form vor. Dies lag daran, dass *E. coli* nicht in der Lage war, die Proteine durch Glykosylierungen zu modifizieren (Legname *et al.*, 2004). Trotzdem besitzen sie die gleichen Eigenschaften wie das PrP^C (Lopez Garcia *et al.*, 2000; Zahn *et al.*, 2000; Hornemann *et al.*, 2004). Allerdings kam es durch eine Aggregation von PrP Monomeren zur Bildung eines PrP Dimers (Warwicker, 2000; Sekijima *et al.*, 2003). Diese wurde schon in anderen Organismen beschrieben (Bellinger-Kawahara *et al.*, 1988; Priola *et al.*, 1995).

Diese Form kommt ebenfalls in Eukaryonten vor, dort wurde sie jedoch meistens wie entstandene Fehlfaltungen durch Proteasen abgebaut.

Da der mAk-mix bestimmte Epitope des PrP bindet, konnte eine Bande auf dem WB detektiert werden. Durch die Dimerisierung wurden aber vermutlich die Epitope des PrP blockiert, deshalb war eine Detektion des Dimers über diese Ak schlecht möglich. Da es bei einigen Prion Proteinen trotzdem im WB detektiert wurde (Meier *et al.*, 2003), zeigte dies, dass die Epitope für den Ak nicht vollständig blockiert waren. Besonders deutlich war dieser Effekt beim Menschen, Schimpansen, Javaneraffen und Rind zu sehen, nachdem die Prion Proteine dieser Spezies aus IB gereinigt wurden.

Durch eine Ponceau-Rotfärbung konnte das Dimer allerdings bei allen Spezies detektiert werden, da diese Färbemethode eine unspezifische Interaktion eines Farbstoffes mit einem Protein ist.

4.2 Herstellung stabiler Zelllinien

4.2.1 Herstellung stabil tTA exprimierender Zelllinien

In dieser Arbeit konnten die PrP^{0/0}, die N2a und die 3T3 Zellen stabil mit einem tTA-Element transfiziert werden. Durch eine Selektion mit Blasticidin wurden verschiedene stabile Klone selektiert. Anschließend wurden diese Klone mit einem pBI-EGFP Vektor, der EGFP durch ein TRE-Element reguliert exprimiert (Garni *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2006), transient transfiziert. Die Klone, bei denen sich die Expression durch Tet steuern ließ, wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop selektiert.

Die so hergestellten und ausgesuchten Zellklone wurden als PrP LHABT, N2a LHABT und 3T3 LHABT bezeichnet und dienten als Grundlage für die Herstellung PrP^C exprimierender Zellen.

Bei den hergestellten Zellklonen konnte zudem die systembedingte Basisexpression der Proteine gezeigt werden. Diese konnte auch nicht durch erhöhte Antibiotikazugabe von Tet oder Dox abgestellt werden (Robertson *et al.*, 2002). Es führte eher dazu, dass die Zellen schneller abstarben.

4.2.2 Herstellung doppelt stabiler PrP^C exprimierender Zellen

Die mit dem tTA stabil transfizierten Zelllinien wurden mit verschiedenen spezies-spezifischen *prnp* Genen transfiziert (Nakamura *et al.*, 2003; Hirata *et al.*, 2004). Dies geschah einerseits mit einem für ein „*gene targeting*“ konstruierten Vektor und andererseits durch eine retrovirale Infektion. Für die Herstellung der stabilen PrP^C exprimierenden Zellen erwies sich dabei die Transfektion mittels Retroviren als die Bessere, da wesentlich mehr Klone für eine anschließende Selektion zur Verfügung standen (Menendez *et al.*, 2006; Cenciarelli *et al.*, 2006; Geraerts *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006). So konnte eine Auswahl aus einem größeren Reservoir entsprechender PrP^C exprimierender Zellen getroffen werden. Bei einem Vergleich der Transfektionseffizienz der Methoden mit dem Javaneraffen *prnp* wurde festgestellt, dass die Effizienz des „*gene targeting*“ Vektor um das 30-fache geringer war. Allerdings hatte die Art der Transfektion keinen Einfluss auf die Expressionsintensität des PrP^C.

4.3 PrP^C Expressionsanalysen

Die Detektion der PrP^C Expression konnte mit den in der Abb. 58 dargestellten Methoden durchgeführt werden.

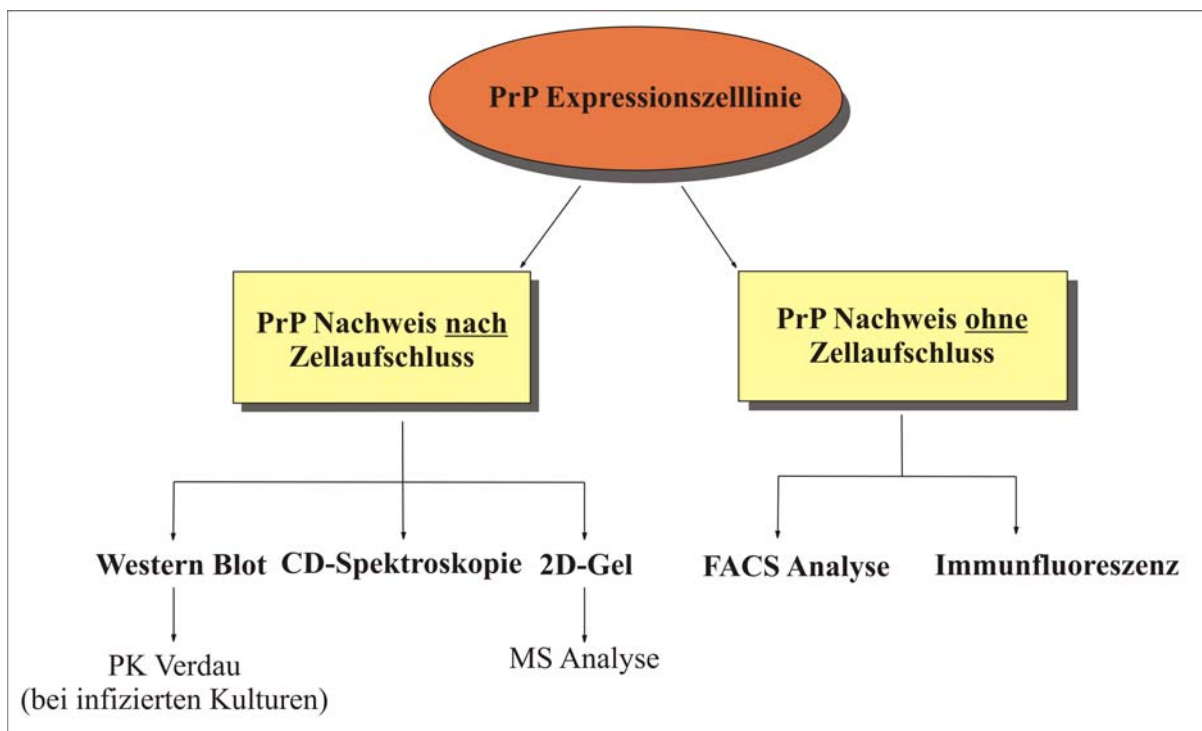


Abb. 58 Detektionsmöglichkeiten des Prion Proteins

Die PrP^C Expressionstärke variierte bei den verschiedenen Zelllinien und konnte sowohl im WB als auch mit der FACS Analyse gezeigt werden. Durch eine FACS Analyse wurde die Menge an neu gebildetem PrP^C in der Zelle genau bestimmt und die Regulation durch Tet gezeigt.

Bei den transfizierten PrP „*knock-out*“ Zellen war die Expression am deutlichsten zu sehen, da diese Zellen zuvor kein PrP^C exprimierten. Bei den transfizierten 3T3 Zellen war die Expression ca. 20-fach höher als bei den untransfizierten. Dagegen war die Expression bei transfizierten N2a Zellen nur um das 2 bis 3-fache höher. Die Expression des PrP^C konnte ebenfalls in der Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt werden. Auch war es möglich mit Hilfe der CD-Spektroskopie, die Sekundärstrukturunterschiede eines PrP^C exprimierenden transfizierten PrP^{0/0} Zellklons gegenüber der nicht transfizierten Zelllinie, nach einer Aufreinigung durch eine IMAC, zu zeigen.

4.3.1 PrP^C Expressionsanalyse durch den WB

Die Expression konnte durch den „klassischen“ WB bei allen drei Zelllinien nachgewiesen werden. Dabei waren alle drei Banden des PrP^C zu erkennen (Minor *et al.*, 2004; Stack *et al.*, 2006; Safar *et al.*, 2006). Es konnte sowohl die Überexpression als auch die Regulation durch Tet gezeigt werden. Bei den PrP^{0/0} Zellen wurde zudem die systembedingte Basisexpression des Tet-Systems gezeigt, die aufgrund des endogenen PrP^C bei den 3T3 und N2a Zellen nicht dargestellt werden konnte.

Die detektierten Expressionsstärken der hergestellten 3T3 Zellklone korrelierten dabei mit dem am DPZ bereits etablierten 3T3 Tet-Off hFFI Zellklon (Stuke *et al.*, 2005). Dieser exprimierte das humane FFI und wurde als interner Vergleich mitbetrachtet. Dabei zeigte sich, dass nicht nur die Expressionsstärke sondern auch die Regulation der Expression vergleichbar war.

Bei der Etablierung neuer Zelllinien wurde mehr Wert auf die PrP „*knock-out*“ Zellklone gelegt, da bei ihnen nur das transfizierte PrP^C detektiert und für weitere Experimente zur Verfügung stand (Weissmann *et al.*, 1994; Sailer *et al.*, 1994; Weissmann *et al.*, 2003). Dadurch waren die Ergebnisse eindeutiger und ließen weniger Fehlinterpretationen zu.

4.3.2 Immunfluoreszenzmikroskopie zur Detektion der PrP^C Expression

Durch die Immunfluoreszenzmikroskopie konnte die Expression des PrP^C durch Ak detektiert und im Mikroskop nachgewiesen werden (Starke *et al.*, 2005; Dabaghian *et al.*, 2006). Durch die Inkubation mit Tet konnte ebenfalls die systembedingte Basisexpression gezeigt werden. Dies war aber nur bei den PrP^{0/0} Zellklonen möglich, da die anderen Zelllinien jeweils ein eigenes PrP^C exprimierten und dieses ebenfalls mit den Ak reagierten. Die Intensität der Immunfluoreszenz korrelierte mit den Ergebnissen aus dem WB, das zeigte, dass die Resultate miteinander vergleichbar waren und die Immunfluoreszenzmikroskopie als Methode zur optischen Detektion von PrP^C genutzt werden konnte. Allerdings mussten die betrachteten Zellklone immer zum selben Zeitpunkt und mit denselben Einstellungen untersucht werden, da durch Abnutzungserscheinungen der Fluoreszenzlampe und geringfügige Änderungen der Fluoreszenzdetektion im Detektionsprotokoll die Ergebnisse durch das Auswerteprogramm nicht immer 100%ig übereinstimmten.

4.3.3 PrP^C Expressionsanalyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Aus den FACS Messungen war erkennbar, dass die verschiedenen Zellklone, die PrP^C unter Tet reguliert exprimierten, sich von ihren nicht transfizierten Zellen deutlich unterschieden. Durch eine Kultivierung mit Tet wurde die Expression in den Klonen abgeschaltet. Dies konnte ebenfalls durch eine FACS Analyse gezeigt werden.

Die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten zeigten, dass sich das PrP^C in diesen Zellen reguliert an- und abschalten ließ. In den PrP^{0/0} Zellen konnte außerdem die systembedingte Basisexpression bei den Zellklonen dieser Zelllinie beobachtet werden. Bei den 3T3 und N2a Zellen konnte diese Expression ebenfalls gezeigt werden, allerdings war diese wesentlich höher, da zu dieser Fluoreszenzintensität auch noch die Fluoreszenz durch das wirtseigene PrP^C der Zellen addiert wurde. Besonders deutlich war dies bei den transfizierten 3T3 Zellen durch die hohe PrP^C Expressionsrate zu sehen. Bei den N2a Zellen dagegen war diese Unterscheidung schwieriger, da die Expression des transfizierten PrP^C im Vergleich nur geringfügig höher war. Trotzdem konnte bei diesen Zellklonen eine Unterscheidung zwischen den nicht transfizierten Zellen und den transfizierten Zellen mit und ohne Tet-Kultivierung festgestellt werden.

Aus diesem Grund kann die FACS Analyse genutzt werden, um verschiedene transfizierte Klone gegenüber ihren Ausgangszelllinien abzugrenzen (Paltrinieri *et al.*, 2004; Trieschmann

et al., 2005). Auch kann diese Methode genutzt werden, um die Regulation der Expression zu zeigen. Das bei den stark überexprimierten Zellen, wie z. B. den PrP^{0/0} Zellen, einfacher war als bei geringeren Expressionsraten. Somit kann die FACS Analyse zur schnellen und einfachen Selektion von Klonen verwendet werden.

Durch die mitgeführten Negativkontrollen bei der FACS Messung wurde festgestellt, dass sich der FITC konjugierte sekundär Ak nur geringfügig an andere Isotypen und Proteine gebunden hatte. Der anti-PrP Ak dagegen hatte sich unspezifisch an andere Proteine gebunden. Das führte unter anderem zur Fluoreszenz der Zellen. Durch spezifischere Ak oder Verwendung anderer Isotypen könnte dieser Effekt verringert oder sogar verhindert werden. Da die anti-PrP Ak starke Kreuzreaktionen ausführen (Zou *et al.*, 2004; Gregoire *et al.*, 2005), sollte versucht werden, diese durch Inkubation in Seren, aus denen diese Ak gewonnen wurden, zu verringern.

4.3.4 Sekundärstrukturanalyse mit Hilfe der CD-Spektroskopie

Die Sekundärstruktur wurde nur an PrP^{0/0} Zellen gezeigt, da sie nur das gewünschte PrP^C nach einer Transfektion exprimieren. Dies sollte dazu genutzt werden, um eine Konformationsänderung des PrP^C nach einer Infektion mit PrP^{Sc} nachzuweisen und um neben dem PK Verdau eine weitere Methode zum Nachweis von PrP^{Sc} zu etablieren. Möglich ist diese Analyse, da das PrP^C und PrP^{Sc} zwar die gleiche Primärstruktur aber eine unterschiedliche Sekundär- und Tertiärstruktur besitzen (Stahl *et al.*, 1993; Cohen *et al.*, 1994).

Durch eine CD-Analyse der IMAC-Elutions- und Waschfraktion beim Vergleich des PrP^C exprimierenden PrP^{0/0} Zellkon C1 und den PrP^{0/0} Zellen konnte eine deutliche Unterscheidung der einzelnen Fraktionen getroffen werden, aufgrund des erhöhten α -Helixanteils in den Elutionsfraktionen der PrP^C exprimierenden Zellen. Die Elutionsfraktionen des C1 Zellklons enthielten dabei einen deutlichen helikalen Anteil. Dieser war bei der ersten Elutionsfraktion sehr deutlich zu erkennen wogegen er bei der Zweiten geringer war, was auf einen geringeren Anteil an α -Helices hindeutete. Der helikale Anteil ist auf das PrP^C zurückzuführen, da es drei Helices besitzt (Granata *et al.*, 2006). In der Waschfraktion waren die Signale der beiden untersuchten Klone wieder ähnlich, das zeigte, dass sich kein PrP^C mehr in dieser Fraktion befand. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich durch den WB der IMAC-Fraktionen unterstützt. In ihnen konnte gezeigt werden, dass sich in der Elutionsfraktion 1 viel PrP^C und weniger in der Fraktion 2 befand, nicht aber in der Waschfraktion.

Durch die IMAC können die bekannten Isoformen des PrP aufgrund ihrer Affinität gegenüber Kupfer (Hornshaw *et al.*, 1995) getrennt werden. Da das PrP^{Sc} pathogen ist und mit ihm nur im S3** Labor gearbeitet werden durfte, konnten bisher keine CD-Analysen mit dieser Isoform durchgeführt werden. Gegenwärtig laufen aber Verhandlungen mit der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf über eine mögliche Kooperation, um diese Form analysieren zu können. Sollte dies möglich sein, müsste eine IMAC mit infizierten Zellkulturen durchgeführt werden. Das PrP^{Sc} müsste sich dann im Durchlauf befinden, da es kein Kupfer binden kann (Wong *et al.*, 2003; Brown 2004; Todorova-Balvay *et al.*, 2005; Leliveld *et al.*, 2006). Somit wäre eine Auftrennung der Isoformen möglich. In der Elution müsste sich das PrP^C und im Durchlauf das PrP^{Sc} befinden. Durch den erhöhten β -Faltblattanteil des PrP^{Sc} müsste es sich von der Vergleichsfraktion deutlich unterscheiden lassen (Pan *et al.*, 1993). Anschließend würden diese beiden Proteine einem PK Verdau unterzogen, da nur das PrP^{Sc} resistent ist, sollten nur in dieser IMAC-Fraktion Banden auf dem WB zu erkennen sein (Caughey *et al.*, 1997). Anschließend sollten die nicht verdauten und PK verdauten Fraktionen in der CD-Spektroskopie untersucht und in Bezug auf ihre Sekundärstruktur miteinander verglichen werden. Dabei sollte sich ein deutlicher Unterschied in der Sekundärstruktur der einzelnen Fraktionen finden lassen.

4.4 Ko- und Überexpression von Proteinen während der PrP^C Expression

Durch die massenspektrometrische Analyse der 2D-Gele der PrP^{0/0} Zelllinie und eines transfizierten PrP^C exprimierenden Zellklons der gleichen Zelllinie wurden verschiedene exprimierte Proteine detektiert. Dargestellt wurden diese in der Tab. 11.

Die dabei beschriebenen Proteine wurden teilweise schon in Zusammenhang mit TSE-Erkrankungen gebracht. Diese Proteine waren die Cu/Zn Superoxiddismutase (Dupuis *et al.*, 2002; Freixes *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 1998), das Lectin (Dragatsis *et al.*, 1998; Herrmann *et al.*, 2006; Mazzoni *et al.*, 2005), das Calcyclin (Xiang *et al.*, 2004; Volkel *et al.*, 2001), das Glykoprotein B (Halliday *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003; Moroncini *et al.*, 2004), die Enolase 1 (Poser *et al.*, 2000; Race *et al.*, 1995; Kropp *et al.*, 1999), die Aldolase 1 (Strom *et al.*, 2006) und das Stress induzierte Phosphorprotein 1 (Lopes *et al.*, 2005).

Das Lectin (Endharti *et al.*, 2005) und das Profilin 1 (Grumet *et al.*, 1980) sind an der Immunabwehr beteiligt, ebenso ist das Lectin (Lasserre *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 1999) für den Nerven Aufbau wichtig. Weitere Proteine, die detektiert wurden, befinden sich im Gehirn, diese waren die Cholesteroxidase (Lange *et al.*, 1985; Raggatt *et al.*, 1966), das Cc2d1a

Protein (Basel-Vanagaite *et al.*, 2005) und das voltabhängige selektive Anionkanalprotein 1 (Bres *et al.*, 2000; Sakudo *et al.*; 2005; Zanata *et al.*, 2002). Durch die verstärkte oder verringerte Expression dieser Proteine kann es zu den typischen Verhaltensmustern bei TSE-Erkrankungen kommen. Durch weitere Analysen und Benutzung von verschiedenen „*knock-out*“ Modellen könnte die Regulation der Expression dieser Proteine durch das PrP genauer untersucht werden.

Andere Proteine, wie die putative Nukleotid-Zucker-Dehydrogenase (Karkonen *et al.*, 2005; Jagielski *et al.*, 2005), sind mit verantwortlich für die Glykosierungen, den Stressabbau wie das Peroxiredoxin 6 (Strey *et al.*, 2004) oder sind beteiligt am Membranaufbau, wie das Glykoprotein B (Kupzig *et al.*, 2003). Eine Regulation dieser Proteine wirkt sich auf die molekularen Eigenschaften des PrP^C aus. Durch eine Erhöhung oder Verringerung der Expression dieser Proteine könnte festgestellt werden, ob das PrP^C seine Eigenschaften beibehält oder verliert.

Durch Proteine wie das Stathmin 1 (Kouzu *et al.*, 2006), das Peroxiredoxin 6 (Brown *et al.*, 2006) und Tropomyosin 4 (Lo *et al.*, 2006; Hayashi *et al.*, 2005) wird die Tumorbildung beeinflusst. Da das Prion Protein ebenfalls in dem Apoptosezyklus durch die Regulation des Bcl2 beteiligt ist, spielt es in diesem Zusammenhang wahrscheinlich eine Rolle in der Krebsentstehung und kann auf die Zellproliferation Einfluss nehmen.

Andere Proteine die detektiert wurden, wie das Zwei-Komponentenregulatorprotein sind durch die Transfektion in die Zelle eingebracht worden. Diese wurden für die Regulation der Expression des PrP^C gebraucht und sollten, da sie von einem anderen Organismus stammten, nicht für eine mögliche Funktion des PrP^C betrachtet werden.

Die hier detektierten Proteine spielen, wenn sie nicht mit dem *prnp* Gen in die Zelle transfiziert wurden, entweder eine Rolle im Gehirn, in der Immunabwehr, bei den Nerven oder sind an der Zellproliferation beteiligt. Wie stark dieser Einfluss der jeweiligen Proteine ist, sollte genauer untersucht werden. Dazu sollte der pH-Bereich weiter eingengt und die Laufstrecke erhöht werden, um eventuell übereinander liegende Proteine besser auftrennen zu können. Es sollte ebenfalls ein PrP^C exprimierender Klon mit Tet-Kultivierung untersucht werden, um zu bestimmen, wie stark die Überexpression einzelner Proteine ist. Die dabei identifizierten Proteine sollten durch eine zweite Methode, wie z. B. den ELISA, bestimmt und auf ihr Vorhandensein geprüft werden.

Dadurch wäre eine genauere Kenntnis über die Funktion des PrP^C und seiner Signalwege möglich. Auch würden so wahrscheinlich Proteine identifiziert, die bisher nicht mit dem PrP^C

in Verbindung gebracht wurden. Dies könnte neue Aufschlüsse über die Funktion des PrP liefern.

4.5 Infektion von reguliert PrP^C exprimierenden Zellklonen

Nachdem die regulierte Expression der verschiedenen Klone untersucht worden war, wurden diese mit 1%igem (w/v) infektiösen Rinderhirnhomogenat infiziert. Durch verschiedene Methoden konnte diese Infektion durch die Replikation des PrP^{Sc} in den verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden.

4.5.1 PrP^{res} Nachweis durch den Western Blot

Das PrP^{res} ist die degradierte Form des pathogenen PrP^{Sc} (Pan *et al.*, 1993), deshalb musste ein PK Verdau an infektiösem Material zum Nachweis durchgeführt werden. Das PrP^C ist nicht PK resistent und war nach diesem Verdau nicht mehr detektierbar (Jendroska *et al.*, 1991). Dieser musste, da er ein unspezifischer Verdau ist, auf jedes Material neu abgestimmt werden. Diese Abstimmung erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit infiziertem Rinderhirnhomogenat und wurde anschließend auf die verschiedenen infizierten Zelllinien übertragen. Dabei zeigte sich, dass nach dem PK Verdau der mit BSE infizierten und PrP^C exprimierenden Zellen, PrP^{res} nachzuweisen war. Dies konnte bei allen Zellen die PrP^C exprimierten, gezeigt werden. Bei den 3T3 und N2a Zellen war dies auch bei einer Inkubation mit Tet zu erkennen. Bei den 3T3 Zellen konnte PrP^{res} auch an den nicht transfizierten Zellen gezeigt werden. Erklärt werden konnte dies durch das endogene wirtseigene PrP^C, das mit dem PrP^{Sc} interagiert. Dadurch kam es zu einer Konformationsänderung des PrP^C. Das entstandene PrP^{Sc} reicherte sich an und konnte als PrP^{res} im WB nach einem PK Verdau nachgewiesen werden. Neben dieser degradierten Form waren auf denselben Bahnen im WB auch noch die nicht degradierten Formen zu erkennen. Ob es sich dabei um PrP^{Sc} oder PrP^C handelte, konnte nicht festgestellt werden. Vermutlich handelt es sich dabei um noch nicht degradiertes PrP^{Sc}, da nach einem PK Verdau der nicht infizierten Zellen keine erkennbaren Banden auf dem WB zu detektieren waren. Detektiert werden konnten diese Formen da der Verdau unvollständig war. Wurde der PK Verdau allerdings länger durchgeführt, waren auch die detektierten Banden des PrP^{res} nicht mehr zu erkennen, was sich auch in der Etablierung des PK Verdau an dem infektiösen Rinderhirn zeigte. Nur durch den Einsatz spezifischer anti-PrP^{Sc} Ak könnte das PrP^{Sc} nachgewiesen werden, ohne das ein PK Verdau an infiziertem

Material durchgeführt werden müsste. Da die vorhandenen Ak diese Bedingung nicht erfüllten, musste der PK Verdau jedes Mal durchgeführt werden. Die PK ist allerdings eine Proteinase, die unspezifisch verschiedene Proteine verdaut. Auch schneidet sie diese an unterschiedlichen Stellen, so dass der Verdau unter gleichen Bedingungen trotzdem verschiedene Resultate liefern kann. Dies zeigt sich auch in den verschiedenen Protokollen zum Nachweis von PrP^{res} (Yakovleva *et al.*, 2004; Salguero *et al.*, 2006).

In der Literatur sind spezifische anti-PrP^{Sc} Ak beschrieben (Korth *et al.*, 1997; Paramithiotis *et al.*, 2003; Curin Serbec *et al.*, 2003), die allerdings nicht vorlagen und die zudem nur mit dem PrP^{Sc} von Mäusen und CJD untersucht wurden. Andere Daten besagen, dass nicht speziell für das PrP selektierte Ak, dieses trotzdem detektieren können (Morel *et al.*, 2004). Aus diesen Gründen sollte der WB infizierter Proben mit Ak vor und nach dem PK Verdau nur als ein Mittel nicht aber als Einziges zur Detektion von PrP^{Sc} angesehen werden.

4.5.2 PrP^{Sc} Nachweis mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Infizierte Kulturen wurden auch mit Hilfe der FACS Analyse untersucht. Dabei wurden die reguliert exprimierenden Kulturen mit und ohne Tet kultiviert und mit nicht transfizierten Zellen vor und nach einer Infektion mit BSE verglichen (Ratzka *et al.*, 2001; Simak *et al.*, 2002; Falanga *et al.*, 2005). Dabei wurde festgestellt, dass bei allen infizierten Klonen die Fluoreszenzintensität erhöht war. Diese detektierte Fluoreszenzintensität war eine Mischung aus der Detektion des sich ständig gebildeten PrP^{Sc} durch die Konversion des PrP^C und des neu gebildeten PrP^C in der Zelle. Es konnte nur eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals detektiert, nicht aber eine Unterscheidung getroffen werden.

Bei allen PrP^C exprimierenden Klonen ohne Tet-Kultivierung und mit BSE-Infektion war diese Intensität am größten. Bei den 3T3 und N2a Klonen mit Tet-Kultivierung war diese schwächer, aber nicht gleich der Intensität der Ursprungszellen. Das ist durch die Basisexpression des Tet-Systems zu erklären, die sich zur Intensität der endogenen PrP^C Expression dieser Zellen addiert. Bei den untransfizierten Zellen war diese Expression noch geringer. Dagegen gut beobachtet werden konnten diese Signale bei den 3T3 Zellen und deren Klone. Bei den N2a Zellen war der Effekt, aufgrund der geringeren Überexpression, weniger deutlich ausgeprägt. Bei den PrP^{0/0} Zellen und den Klonen mit Tet-Kultivierung war dies ebenfalls zu sehen, nur dass die Intensität der Basisexpression des Tet-Systems fast gleich der Fluoreszenz der PrP^{0/0} Zellen war. Zu erklären ist das dadurch, dass diese Zellen kein endogenes PrP^C exprimierten und deshalb die Ak auch kaum ein detektierbares Signal

abgaben. Die abgegebenen Signale sind nur durch unspezifische Bindungen der Ak zu erklären.

In dieser Arbeit wurden nur zytoplasmatische FACS Untersuchungen dargestellt, weil eine Detektion der Proteine auf der Oberfläche nicht möglich war. Dies könnte auf die Art der Ablösung der Zellen von der Zellkulturflasche zurückzuführen sein. Durch das Abtrypsinieren wurden wahrscheinlich die Proteine oder die Epitope der Proteine auf der Oberfläche zerstört und konnten keine Bindung mehr mit den anti-PrP Ak eingehen.

Es wurde zwar versucht, neben der zytoplasmatischen Detektion des PrP auch das PrP in den Zellkernen zu detektieren, da aber die Fluoreszenzunterschiede zu gering waren, konnten keine signifikanten Signale detektiert werden. Würden die Zellkerne von der Membran und dem Zytoplasma getrennt, könnten Unterschiede in den einzelnen Fraktionen zu erkennen sein. Dies sollte sowohl vor als auch nach einer Infektion mit TSE-Material geschehen. Daraus könnte sich ein besseres Verständnis der PrP^C Expression und der Konformationsänderung des PrP^C ergeben.

Durch die Infektion mit BSE-Material konnte zudem gezeigt werden, dass das Schimpansen PrP^C in den PrP^{0/0} Zellen zu PrP^{Sc} umgewandelt wurde und dass es zu einer Anreicherung von PrP^{Sc} kam. Dies konnte sowohl mit dem PK Verdau im WB als auch durch die FACS Analyse gezeigt werden. Diese Anreicherung war nur bei den transfizierten Zellen ohne Tet zu beobachten. Wurden die Zellen mit Tet kultiviert, konnte kein PrP^{Sc} im WB als PrP^{res} detektiert werden. Auch waren die Signale bei diesem Klon in der FACS Analyse zu gering, um behaupten zu können, dass es zu einer Anreicherung von PrP^{Sc} kam, trotz einer gewissen Basisexpression. Das zeigt, dass eine gewisse PrP^C Konzentration vorhanden sein muss, um eine Infektion auslösen und detektieren zu können.

Die Infektiosität konnte auch beim humanen PrP in den N2a Zellen und beim bovinen PrP in 3T3 Zellen gezeigt werden. Da diese Zellen allerdings ein endogenes PrP^C besaßen, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass dieses mit dem infektiösen Agens reagiert hatte. Allerdings war zu sehen, dass bei den transfizierten Zellklonen der PrP^{res} Nachweis deutlicher ausfiel als bei den nicht transfizierten Zellen. Auch war nach einer Infektion mit BSE bei den Zellen ohne Tet die Detektion deutlicher ausgefallen als bei der Kultivierung mit Tet.

Das deutet darauf hin, dass das überexprimierte PrP^C mit dem PrP^{Sc} interagiert und umgefaltet wurde. Es zeigt ebenfalls an, dass durch das Zusammenspiel des transfizierten PrP^C mit dem endogenen PrP^C eine Konzentration überschritten war, bei der es zu einer Umfaltung des PrP^C zum PrP^{Sc} kommen kann.

Da das PrP^C von verschiedenen Spezies exprimiert wurde, deutet alles darauf hin, dass es unerheblich ist, von welcher Spezies das PrP^C stammt. Das würde bedeuten, dass nur die PrP^C Konzentration und nicht die Spezies des PrP^C für die Initiierung der Konformationsänderung verantwortlich ist.

Somit konnte gezeigt werden, dass BSE in der Lage ist, über die Speziesbarriere hinweg, verschiedene Arten zu infizieren. Dieser Fakt wurde zwar schon in Tiermodellen nachgewiesen (Bruce *et al.*, 1994; Gale *et al.*, 1998), ist aber in PrP^{0/0} Zellen dieser Form zum ersten Mal gezeigt worden. Dies zeigt, dass BSE ein hohes Infektionsrisiko über die Speziesbarriere hinweg besitzt.

4.6 Mögliche Erweiterung des neu geschaffenen Systems

Durch die Verwendung einer weiteren oder einer nicht resistenten Zelllinie gegenüber Hygromycin oder Blasticidin kann das bisher etablierte Zellkulturmodell um eine Stufe erweitert werden. Dieses Modell kann zur Klärung von Zell-Zell-Interaktionen während einer TSE-Infektion dienen.

Dazu muss eine Zelllinie mit einem TRE-Element, wie z. B. die 3T3 Tet-Off, mit dem in dieser Arbeit verwendeten Retrovirus infiziert werden. So kann das eingeschleuste PrP^C überexprimiert und mit den bekannten Methoden identifiziert werden. Durch eine anschließende Infektion mit TSE-Material kann sich das PrP^C in PrP^{Sc} umfalten.

Werden diese Zellen dann gemeinsam mit anderen PrP^C exprimierenden Zellen kultiviert, wie z. B. dem C1 Klon, können durch Zugabe eines Antibiotikums z. B. Blasticidin die alten Zellen zum Absterben gebracht werden. Sollte sich dann aber immer noch PrP^{Sc} in den Zellen nachweisen lassen, kann eine Zell-Zell-Interaktion nicht ausgeschlossen werden. Ein Schema dieses Zellkulturmodells ist in der Abb. 59 dargestellt. Durch dieses Modell können die Zell-Zell-Interaktionen genauer detektiert werden als bisher im Tiermodell.

Auch wäre so, durch den Einsatz verschiedener infektiöser TSE-Materialien, Übertragungsstudien von BSE auf andere PrP^C Spezies als die hier beschriebenen möglich. Dadurch könnte nicht nur für BSE sondern auch für andere TSE-Agenzien, wie z. B. CWD oder Scrapie, eine Risikoabschätzung getroffen werden.

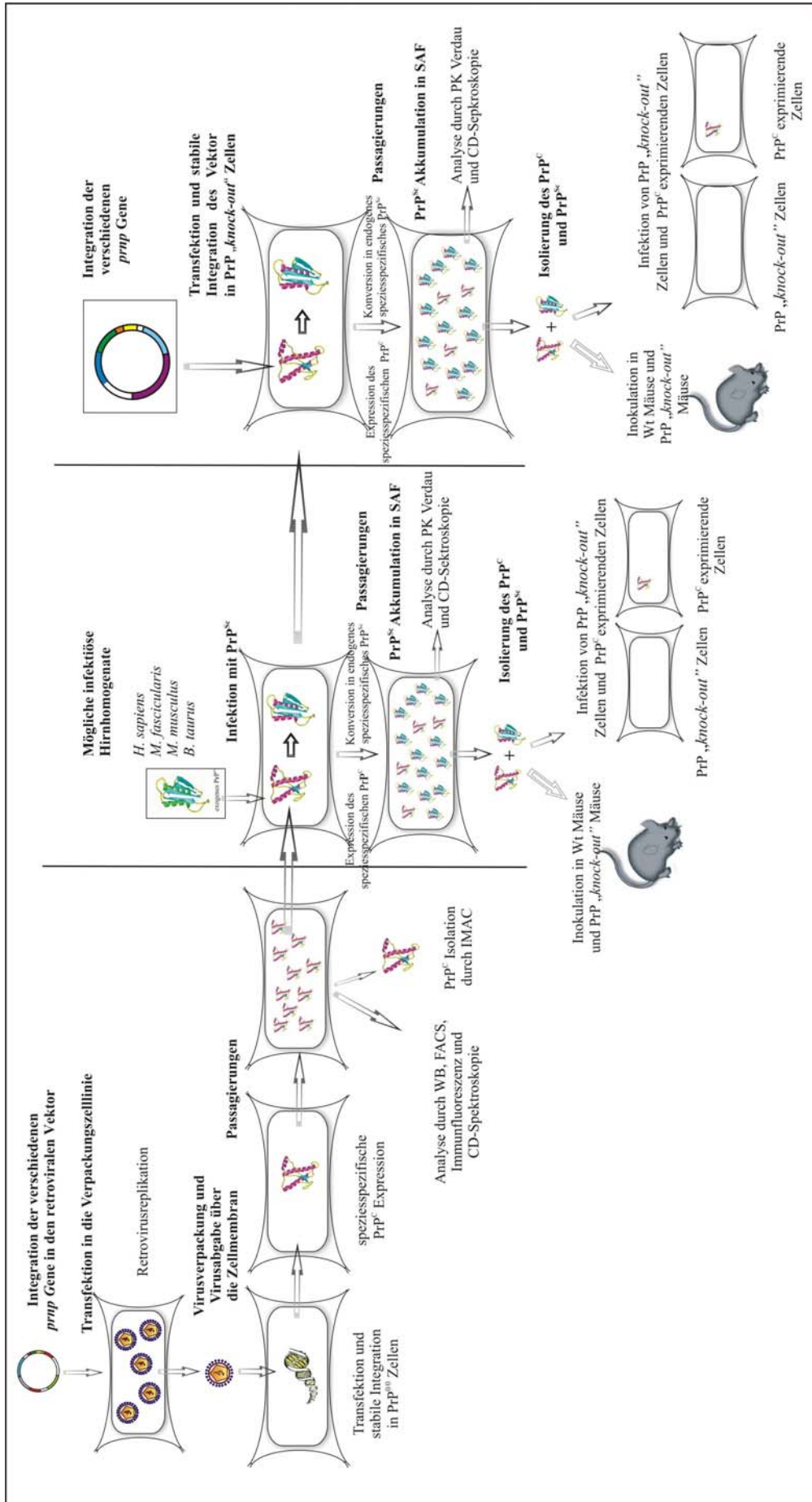


Abb. 59 Schema der Erweiterung des bisher etablierten Zellmodells Nach einer retroviralen Transfektion mit dem *prnp* Gen wird dieses in die Zelle eingebaut und exprimiert. Das PrP^C kann dann auf verschiedene Weisen detektiert und isoliert werden. Anschließend können diese Zellen mit TSE-Material infiziert werden. Dabei kommt es zur Bildung von PrP^{Sc}. Dieses kann ebenfalls nachgewiesen und isoliert werden. Werden kurz darauf andere Zellen mit einem Selektionsmarker koinokuliert, kann der Zelltod in den alten Zellen durch Antibiotikazugabe hervorgerufen werden. Sollte jetzt immer noch eine Detektion von PrP^{Sc} möglich sein. Würde es über eine Zell-Zell-Interaktion übertragen. Durch Verwendung verschiedener „*knock-out*“ Modelle kann dieser Infektionsweg dann nachvollzogen werden.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollten verschiedene *prnp* Gene stabil in eine eukaryontische Zelllinie transfiziert und das zelluläre Prion Protein überexprimiert werden. Die Expression dieses Proteins sollte dabei reguliert an- und abgeschaltet werden. Nach erfolgter stabiler und regulierbarer Expression des Proteins sollte versucht werden, eine Replikation des pathogenen Prion Proteins zu erreichen.

Deshalb wurden *prnp* Gene von verschiedenen Spezies amplifiziert. Zur Überprüfung ihrer Sequenz wurden diese in einen Bakterienexpressionsvektor kloniert und in *E. coli* exprimiert. Anschließend wurden die Sequenzen mit der Entrezdatenbank am NCBI verglichen. In *E. coli* konnte das PrP außerdem überexprimiert und aus IB gereinigt werden. Diese rekombinanten PrP wurden als interne Kontrollen weiterverwendet und anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt.

Zur regulierten Expression des PrP^C in Eukaryonten wurde das Tet-System verwendet. Dazu wurden 3T3, N2a und PrP^{0/0} Zellen mit einem Teil des Zwei-Komponenten-Systems stabil transfiziert. Die Regulation dieses Promotors wurde durch eine Fluoreszenzmikroskopie bestätigt. Anschließend wurden diese Zelllinien mit den verschiedenen *prnp* Genen stabil transfiziert. In diesen neu hergestellten Zelllinien konnte das PrP^C durch Tet reguliert an- und abgestellt werden. Zudem konnte die systembedingte Basisexpression des Tet-Systems und die Expression des PrP^C im WB, der Immunfluoreszenz und durch die FACS Analyse gezeigt werden.

Durch die Ausnutzung der PrP^{0/0} Zelllinie und deren Klone konnten außerdem in der CD-Spektroskopie die Sekundärstrukturunterschiede gezeigt werden, bedingt durch die deutlich helikale Struktur des exprimierten PrP^C. Außerdem wurden in 2D-Gelen neue potenzielle Interaktionspartner des Prion Proteins gezeigt, welche bei den transfizierten und nicht transfizierten PrP^{0/0} Zellen detektiert wurden. Die dabei identifizierten Proteine spielen neben der Interaktion mit dem Prion Protein ebenfalls eine Rolle bei Krebserkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen. Das deutet vermutlich auf eine Verknüpfung in der Signalkaskade der Aktivierung dieser Krankheiten hin.

Die reguliert PrP^C exprimierenden Zellen wurden mit BSE infiziert. Dabei kam es zu einer Konversion des PrP^C in PrP^{Sc} und dessen Anreicherung. Eine direkte Anreicherung des PrP^{Sc} konnte als eine deutliche Erhöhung des Fluoreszenzsignals in der FACS Analyse gezeigt werden. Durch einen Proteinase K Verdau wurde das PrP^{Sc} als degradierte Form, das PrP^{res}, detektiert. Durch die Möglichkeit der Regulation der verschiedenen PrP^C exprimierenden

Klone wurde gezeigt, dass das PrP^{res} nur in den PrP^C exprimierenden Zellen zu detektieren war. Besonders deutlich war dies bei den PrP^{0/0} Zellen zu sehen, da diese kein endogenes PrP^C besaßen. In den anderen beiden Zelllinien, N2a und 3T3, die ein wirtseigenes endogenes nicht regulierbares PrP^C besaßen, war dieser Effekt weniger deutlich ausgeprägt, da das endogene PrP^C immer mit dem PrP^{Sc} interagieren konnte.

Durch die Ausnutzung der verschiedenen PrP^C exprimierenden Zellklone konnte gezeigt werden, dass mit BSE nicht nur Rinder sondern auch andere Spezies infiziert werden können. Somit ist BSE in der Lage, die Speziesbarriere zu überwinden.

Diese neu geschaffenen Zelllinien können als Werkzeug einer genaueren Aufklärung der Prionenerkrankungen und der Funktionen des Prion Proteins dienen. Durch die Verwendung der PrP^{0/0} Zelllinie und deren Klone für Infektionsstudien können diese teilweise gegen die bisher genutzten Bioassays ausgetauscht werden. Dadurch sind konkretere und effektivere Studien des Prion Proteins, seiner Infektionswege, Signalkaskaden sowie die Zusammenhänge mit anderen Erkrankungen möglich geworden.

6 Literatur

Abid K. und Soto C. (2006). *The intriguing prion disorders*. Cell. Mol. Life Sci., Epublished

Aguzzi A. (2006). *Prion diseases of humans and farm animals: epidemiology, genetics, and pathogenesis*. J. Neurochem., 97: 1726-39

Akowitz A., Sklaviadis T. und Manuelidis L. (1994). *Endogenous viral complexes with long P-NA cosediment with the agent of Creutzfeldt-Jakob disease*. Nucleic Acid Res., 22: 1101-07

Alvarez-Martinez M. T., Torrent J., Lange R., Verdier J. M., Balny C. und Liautard J. P. (2003). *Optimized overproduction, purification, characterization and high-pressure sensitivity of the prion protein in the native (PrP(C)-like) or amyloid (PrP(Sc)-like) conformation*. Biochim. Biophys. Acta, 1645: 228-40

Baker H. F., Ridley R. M., Wells G. A. und Ironside J. W. (1998). *Prion protein immunohistochemical staining in the brains of monkeys with transmissible spongiform encephalopathy*. Neuropathol. Appl. Neurobiol., 24: 476-86

Basel-Vanagaite L., Attia R., Yahav M., Ferland R. J., Anteki L., Walsh C. A., Olender T., Straussberg R., Magal N., Taub E., Drasinover V., Alkelai A., Bercovich D., Rechavi G., Simon A. J. und Shohat M. (2005). *The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation*. J. Med. Genet., 43: 203-10

Basler K., Oesch B., Scott M., Westaway D., Walchli M., Groth D. F., McKinley M. P., Prusiner S. B. und Weissmann C. (1986). *Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene*. Cell, 46: 417-28

Belay E. D., Maddox R. A., Williams E. S., Miller M. W., Gambetti P. und Schonberger L. B. (2004). *Chronic wasting disease and potential transmission to humans*. Emerg. Infect. Dis., 10: 977-84

Bellinger-Kawahara C., Cleaver J. E., Diener T. O. und Prusiner S. B. (1987). *Purified scrapie prions resist inactivation by UV irradiation*. J. Virol., 61: 159-66

Bellinger-Kawahara C. G., Kempner E., Groth D., Gabizon R. und Prusiner S. B. (1988). *Scrapie prion liposomes and rods exhibit target sizes of 55,000 Da*. Virology, 164: 537-41

Bennett T. P. (1967). *Membrane filtration for determining protein in the presence of interfering substances*. Nature, 213: 1131-2

Bertram L. und Tanzi R. E. (2005). *The genetic epidemiology of neurodegenerative disease*. J. Clin. Invest., 115: 1449-57

Biasimi E., Massignan T., Fioriti L., Rossi V., Dossena S., Salmons M., Forloni G., Sonetto V. und Chiesa R. (2006). *Analysis of the cerebellar proteome in a transgenic mouse model of inherited prion disease reveals preclinical alteration of calcineurin activity*. Proteomics, 6: 2823-34

Birkettl C. R., Hennion R. H., Bembridgel D. A., Clarkel M. C., Chree A., Bruce M. E. und Bostock C. J. (2001). *Scrapie strains maintain biological phenotypes on propagation in a cell line in culture*. EMBO, 20: 3351-58

Blattler T., Brandner S., Raeber A. J., Klein M. A., Voigtlander T., Weissmann C. und Aguzzi A. (1997). *PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain*. Nature, 389: 69-73

Bolton D. C., Meyer R. K. und Prusiner S. B. (1985). *Scrapie Prp 27-30 is a Sialoglycoprotein*. J. Virol., 53: 596-606

Bonifati D. M. und Kishore U. (2006). *Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation*. Mol. Immunol., 12: Epublished

Bosque P. J. und Prusiner S. B. (2000). *Cultured Cell Sublines Highly Susceptible to Prion Infection*. J. Virology, 74: 4377-86

Bossers A., Rigter A., de Vries R. und Smits M. A. (2003). *In vitro conversion of normal prion protein into pathologic isoforms*. Clin. Lab. Med., 23: 227-47

Bradford M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding*. Anal. Biochem., 72: 248-54

Bradley R. und Marchant B. (eds) (1993). *Transmissible Spongiform Encephalopathies. A Consultation on BSE with the Scientific Veterinary Committee of the Commission of the European Communities held in Brussels, 14-15 September 1993*. Document VI/4131/94EN. European Commission, Agriculture, Brüssel, 145-159

Brandner S., Isenmann S., Raeber A., Fischer M., Sailer A., Kobayashi Y., Marino S., Weissmann C. und Aguzzi A. (1996). *Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity*. Nature, 379: 339-43

Breydo L., Bocharova O. V., Makarava N., Salnikov V. V., Anderson M. und Baskakov I. V. (2005). *Methionine oxidation interferes with conversion of the prion protein into the fibrillar proteinase K-resistant conformation*. Biochemistry, 44: 15534-43

Bres V., Hurbin A., Duvoid A., Orcel H., Moos F. C., Rabie A. und Hussy N. (2000). *Pharmacological characterization of volume-sensitive, taurine permeable anion channels in rat supraoptic glial cells*. Br. J. Pharmacol., 130: 1976-82

Britton T. C., Al-Sarraj S., Shaw C., Campbell T. und Collinge J. (1995). *Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 16-year old in the UK*. Lancet, 146: 1155

Brown D. R., Schmidt B., Groschup M. H. und Kretzschmar H. A. (1998). *Prion protein expression in muscle cells and toxicity of a prion protein fragment*. Eur. J. Cell Biol., 75: 29-37

Brown D. R. (2004). *Metallic prions*. Biochem. Soc. Symp., 71: 193-202

Brown D. R. und Kozlowski H. (2004). *Biological inorganic and bioinorganic chemistry of neurodegeneration based on prion and Alzheimer diseases*. Dalton Trans., 13: 1907-17

Brown L. M., Helmke S. M., Hunsucker S. W., Netea-Maier R. T., Chiang S. A., Heinz D. E., Shroyer K. R., Duncan M. W. und Haugen B. R. (2006). *Quantitative and qualitative differences in protein expression between papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue*. Mol. Carcinog., 45: 613-26

Brown P., Rau E. H., Johnson B. K., Bacote A. E., Gibbs Jr. C. J. und Gaidusek D. C. (2000). *New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent: threshold survival after ashing at 600 degrees C suggests an inorganic template of replication*. PNAS, 97: 3418-21

Browning S. R., Mason G. L., Seward T., Green M., Eliason G. A., Mathiason C., Miller M. W., Williams E. S., Hoover E. und Telling G. C. (2004). *Transmission of prions from mule deer and elk with chronic wasting disease to transgenic mice expressing cervid PrP*. J. Virol., 78: 13345-50

Bruce M., Chree A., McConnell I., Foster J., Pearson G. und Fraser H. (1994). *Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 343: 405-11

Bueler H., Fischer M., Lang Y., Bluethmann H., Lipp H. P., DeArmond S. J., Prusiner S. B., Aguet M. und Weissmann C. (1992). *Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein*. Nature, 356: 577-82

Burns C. S., Aronoff-Spencer E., Legname G., Prusiner S. B., Antholine W. E., Gerfen G. J., Peisach J. und Millhauser G. L. (2003). *Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein*. Biochemistry, 42: 6794-803

Buschmann T., Yin Z., Bhoumik A. und Ronai Z. (2000). *Amino-terminal-derived JNK fragment alters expression and activity of c-Jun, ATF2, and p53 and increases H2O2-induced cell death*. J. Biol. Chem., 275: 16590-96

Caughey B., Race R. E., Ernst D., Buchmeier M. J. und Chesebro B. (1989). *Prion Protein Biosynthesis in Scrapie-Infected and Uninfected Neuroblastoma Cells*. J. Virol., 63: 175-81

Caughey B., Raymond G. J., Kocisko D. A. und Lansbury Jr. P. T. (1997). *Scrapie Infectivity Correlates with Converting Activity, Protease Resistance, and Aggregation of Scrapie-Associated Prion Protein in Guanidine Denaturation Studies*. J. Virol., 71: 4107–10

Cenciarelli C., Budoni M., Mercanti D., Fernandez E., Pallini R., Aloe L., Cimino V., Maira G. und Casalbore P. (2006). *In vitro analysis of mouse neural stem cells genetically modified to stably express human NGF by a novel multigenic viral expression system*. Neurol. Res., 28: 505-12

Curin Serbec V., Bresjanac M., Popovic M., Pretnar Hartman K., Galvani V., Ruprecht R., Cernilec M., Vranac T., Hafner I. und Jerala R. (2004). *Monoclonal antibody against a peptide of human prion protein discriminates between Creutzfeldt-Jacob's disease-affected and normal brain tissue*. J. Biol. Chem., 279: 3694-8

Chandler R. L. (1961). *Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material*. Lancet, 1: 1378-79

Chesebro B., Race R., Wehrly K., Nishio J., Bloom M., Lechner D., Bergstrom S., Robbins K., Mayer L., Keith J. M. *et al.* (1985). *Identification of Scrapie Prion Protein-Specific mRNA in Scrapie-Infected and Uninfected Brain*. Nature, 315: 331-333

Choi C. J., Kanthasamy A., Anantharam V. und Kanthasamy A. G. (2006). *Interaction of metals with prion protein: Possible role of divalent cations in the pathogenesis of prion diseases*. Neurotoxicology, 27: 777-87

Coffin J. M., Hughes S. H. und Varmus H. E. (1997). *Retrovirus*. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Come J. H., Fraser P. E. und Lansbury Jr. P. T. (1993). *A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: Importance of seeding*. PNAS, 90: 5959-63

Cotto E., Andre M., Fogue J., Fleury H. J. und Babin P. J. (2005). *Molecular characterization, phylogenetic relationships, and developmental expression patterns of prion genes in zebrafish (Danio rerio)*. FEBS, 272: 500-13

Cohen F. E. Principal Investigator, <http://www.cmpharm.ucsf.edu/cohen>

Cohen F. E., Pan K. M., Huang Z., Baldwin M., Fletterick R. J. und Prusiner S. B. (1994). *Structural clues to prion replication*. Science, 264: 530-31

Creutzfeldt H. G. (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. Z. Ges. Neurol. Psychiat., 57: 1-20

Cronier S., Laude H. und Peyrin J. M. (2004). *Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death*. PNAS, 101: 12271-76

Cuillé J. und Chelle P. L. (1936). *La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable?* Compte rendu de l'Académie des Sciences, 203: 1552-54

CWD Alliance, <http://www.cwd-info.org>

Cunningham A. A., Wells G. A. H., Scott A. C., Kirkwood J. K. und Barnett J. E. F. (1993). *Transmissible spongiform encephalopathy in greater kudu (Tragelaphus strepsiceros)*. Vet. Rec., 132: 68

Dabaghian R. H., Barnard G., McConnell I. und Clewley J. P. (2006). *An immunoassay for the pathological form of the prion protein based on denaturation and time resolved fluorometry*. J. Virol. Methods., 132: 85-91

Davis H. E., Morgan J. R. und Yarmush M. L. (2002). *Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes*. Biophys. Chem., 97: 159-72

Dawson M., Wells G. A. H., Parker B. N. J. und Scott A. C. (1990). *Primary parenteral transmission of bovine spongiform encephalopathy to the pig*. Vet. Rec., 127: 338-339

Dawson M., Wells G. A. H., Parker B. N. J. und Scott A. C. (1991). *Transmission studies of BSE in cattle, hamsters, pigs and domestic fowl*. In: R Bradiey, M Savey, B Marchant (eds): *Subacute Spongiform Encephalopathies*. Commission of the European Communities. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 25-32

DeMarco M. L. und Daggett V. (2005). *Local environmental effects on the structure of the prion protein*. *Comptes Rendus Biologies*, 328: 847-62

Deslys J. P. und Picot A. (2001). *Mad Cow Disease: The Risks to Humans*. Dominos Flammarion Verlag

Diringer H., Braig H. R. und Czub M. (1988). *Scrapie: a virus-induced amyloidosis of the brain*. *Ciba Found. Symp.*, 135: 135-45

Dragatsis I., Efstratiadis A. und Zeitlin S. (1998). *Mouse mutant embryos lacking huntingtin are rescued from lethality by wild-type extraembryonic tissues*. *Development*, 125: 1529-39

Dupuis L., Mbebi C., Gonzalez de Aguilar J. L., Rene F., Muller A., de Tapia M. und Loeffler J. P. (2002). *Loss of prion protein in a transgenic model of amyotrophic lateral sclerosis*. *Mol. Cell Neurosci.*, 19: 216-24

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

Enari M., Flechsig E. und Weissmann C. (2001). *Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody*. *PNAS*, 98: 9295-99

Endo T., Groth D. und Prusiner S. B. (1989). *Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein*. *Biochemistry*, 28: 8380-88

Falanga P. B., Blom-Potar M. C., Bittoun P., Goldberg M. E. und Hontebeyrie M. (2005). *Selection of ovine PrP high-producer subclones from a transfected epithelial cell line*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 340: 309-17

Fasman G. D. (1996). *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. New York, Plenum Press

Flechsigg E., Hegyi I., Leimeroth R., Zuniga A., Rossi D., Cozzio A., Schwarz P., Rulicke T., Gotz J., Aguzzi A. und Weissmann C. (2003). *Expression of truncated PrP targeted to Purkinje cells of PrP knockout mice causes Purkinje cell death and ataxia*. EMBO, 22: 3095-101

Ford M. J., Burton L. J., Morris R. J. und Hall S. M. (2002). *Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse*. Neuroscience, 113: 177-92

Foster J. D., Hope J. und Fraser H. (1993). *Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats*. Vet. Rec., 133: 339-41

Foster J. D., Hope J., McConnell I., Bruce M. und Fraser H. (1994). *Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep, goats, and mice*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 724: 300-3

Foster J. D., Parnham D. W., Hunter N. und Bruce M. (2001). *Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission*. J. Gen. Virol., 82: 2319-26

Freixes M., Rodriguez A., Dalfo E. und Ferrer I. (2005). *Oxidation, glycooxidation, lipoxidation, nitration, and responses to oxidative stress in the cerebral cortex in Creutzfeldt-Jakob disease*. Neurobiol. Aging., 23: Epublished

Gabriel J. M., Oesch B., Kretzmar H., Scott M. und Prusiner S. B. (1992). *Molekular cloning of a candidate chicken prion protein*. PNAS, 89: 9097-101

Gabus C., Derrington E., Leblanc P., Chnaiderman J., Dormont D., Swietnicki W., Morillas M., Surewicz W. K., Marci D., Nandii P. und Darlix J.-L. (2001). *The Prion Protein Has RNA Binding and Chaperoning Properties Characteristic of Nucleocapsid Protein NCp7 of HIV-1**. J. Bio. Chem., 276: 19301-09

Gajdusek D. C. und Zigas V. (1957). *Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea*. N. Engl. J. Med., 257: 974-78

Gajdusek D. C., Gibbs Jr. C. J. und Alpers M. (1966). *Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees*. Nature, 209: 794-96

Gajdusek D. C. (1977). *Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru*. Science, 197: 943-60

Gale P., Young C., Stanfield G. und Oakes D. (1998). *Development of a risk assessment for BSE in the aquatic environment*. J. Appl. Microbiol., 84: 467-77

Gari E., Piedrafita L., Aldea M. und Herrero E. (1997). *A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 13: 837-48.

Geraerts M., Eggermont K., Hernandez-Acosta P., Garcia-Verdugo J. M., Baekelandt V. und Debyser Z. (2006). *Lentiviral vectors mediate efficient and stable gene transfer in adult neural stem cells in vivo*. Hum. Gene Ther., 17: 635-50

Gerstmann J. (1928). *Über ein noch nicht beschriebenes Reflexphänomen bei einer Erkrankung des zerebellären Systems*. W. Med. Wschr., 78: 906-08

Gibbs Jr. C. J., Gajdusek D. C., Asher D. M., Alpers M. P., Beck E., Daniel P. M. und Matthews W. B. (1968). *Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee*. Science, 161: 388-89

Gibbs Jr. C. J., Gajdusek D. C. und Latarjet R. (1978). *Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie*. PNAS, 75: 6268-70

Gossen M. und Bujard H. (1992). *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline responsive promoters*. PNAS, 89: 5547-51

Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Muller G., Hillen W. und Bujard H. (1995). *Transcriptional activation by tetracycline in mammalian cells*. Science, 268: 1766-69

Granata V., Palladino P., Tizzano B., Negro A., Berisio R. und Zagari A. (2006). *The Effect of the Osmolyte Trimethylamine N-Oxide on the Stability of the Prion Protein at Low pH*. Biopolymers, 82: 234-40

Gregoire S., Bergot A. S., Feraudet C., Carnaud C., Aucouturier P. und Rosset M. B. (2005). *The murine B cell repertoire is severely selected against endogenous cellular prion protein*. J. Immunol., 175: 6443-9

Grumet M. und Lin S. (1980). *Reversal of profilin inhibition of actin polymerization in vitro by erythrocyte cytochalasin-binding complexes and cross-linked actin nuclei*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 92: 1327-34

Hadlow W. J. (1959). *Scrapie and kuru*. Lancet, 2: 289-90

Hadlow W. J., Kennedy R. C., Race R. E. und Eklund C. M. (1980). *Virologic and neurohistologic findings in dairy goats affected with natural scrapie*. Vet. Pathol., 17: 187-99

Hadlow W. J., Kennedy R. C. und Race R. E. (1982). *Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus*. J. Infect. Dis., 146: 657-64

Halliday S., Houston F. und Hunter N. (2005). *Expression of PrPC on cellular components of sheep blood*. J. Gen. Virol., 86: 1571-9

Hartsough G. R. und Burger D. (1965). *Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observation*. J. Infect. Dis., 115: 387-92

Hayashi E., Kuramitsu Y., Okada F., Fujimoto M., Zhang X., Kobayashi M., Iizuka N., Ueyama Y. und Nakamura K. (2005). *Proteomic profiling for cancer progression: Differential display analysis for the expression of intracellular proteins between regressive and progressive cancer cell lines*. Proteomics, 5: 1024-32

Heppner F. L. und Aguzzi A. (2004). *Recent developments in prion immunotherapy*. Curr. Opin. Immunol., 16: 594-98

Herrmann L. M., Baszler T. V., O'Rourke K. I., Suarez C. E., Bakko M., Alverson J. und Knowles D. P. (2006). *Fewer PrPc myeloid-based cells in sheep with the prion-resistant genotype*. Neuroreport., 17: 125-9

Hirata R. K., Xu C., Dong R., Miller D.G., Ferguson S. und Russell D. W. (2004). *Efficient PRNP gene targeting in bovine fibroblasts by adeno-associated virus vectors*. Cloning Stem Cells, 6: 31-6

Hornemann S., Schorn C. und Wuthrich K. (2004). *Nmr Structure of the Bovine Prion Protein Isolated from Healthy Calf Brains*. EMBO, 5: 1159-64

Hornshaw M. P., McDermott J. R. und Candy J. M. (1995). *Copper Binding to the NTerminal Tandem Repeat Regions of Mammalian and Avian Prion Protein*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 207: 621-29

Horwitz J. P., Chua J., Curby R. J., Tomson A. J., DaRooge M. A., Fisher B. E., Muaricio J. und Klundt I. (1964). *Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. Some substituted 3-indoyl- β -D-glycopyranosides*. J. Med. Chem., 53: 574-5

Jagielski A. K., Podszywalow-Bartnicka P., Derlacz R. A. und Bryla J. (2005). *The role of intracellular cAMP in renal gluconeogenesis in view of differential action of various cAMP analogues*. Arch. Biochem. Biophys., 434: 282-8

Jahn O., Hesse D., Reinelt M. und Kratzin H. D. (2006). *Technical innovations for the automated identification of gel-separated proteins by MALDI-TOF mass spectrometry*. Anal. Bioanal. Chem., 386: 92–103

Jakob A. (1921). *Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunden*. Z. Ges. Neurol. Psychiatr., 64: 147-228

Jarrett J. T. und Lansbury Jr. P. T. (1993). *Seeding 'one-dimensional crystallization' of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?* Cell, 74: 1055-58

Jendroska K., Heinzl F. P., Torchia M., Stowring L., Kretzschmar H. A., Kon A., Stern A., Prusiner S. B. und DeArmond S. J. (1991). *Proteinase-resistant prion protein accumulation in Syrian hamster brain correlates with regional pathology and scrapie infectivity.* Neurology, 41: 1482-90

Kaneko K., Zulianello L., Scott M., Cooper C. M., Wallace A. C., James T. L., Cohen F. E. und Prusiner S. B. (1997). *Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation.* PNAS, 94: 10069-74

Kanu N., Imokawa Y., Drechsel D. N., Williamson R. A., Birkett C. R., Bostock C. J. und Brockes J. P. (2002). *Transfer of scrapie prion infectivity by cell contact in culture.* Curr. Biol., 12: 523-30

Karkonen A., Murigneux A., Martinant J. P., Pepey E., Tatout C., Dudley B. J. und Fry S. C. (2005). *UDP-glucose dehydrogenases of maize: a role in cell wall pentose biosynthesis.* Biochem. J., 391: 409-15

Kikuchi Y., Kakeya T., Sakai A., Takatori K., Nakamura N., Matsuda H., Yamazaki T., Tanamoto K. und Sawada J. (2004). *Propagation of a protease-resistant form of prion protein in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G.* J. Gen. Virol., 85: 3449-57

Klebe R. J. und Ruddle F. H. (1969). *Neuroblastoma: Cell culture analysis of a differentiating stem cell system.* J. Cell Biol., 43: 69A

Klose J. und Spielmann H. (1975). *Gel isoelectric focusing of mouse lactate dehydrogenase: heterogeneity of the isoenzymes A4 and X4.* Biochem. Genet., 13: 707-20

Korth C. Stierli B., Streit P., Moser M., Schaller H., Fischer R., Schulz-Schaeffer W., Kretzschmar H., Raeber A., Braun U., Ehrensperger F., Hornemann S., Glockshuber R., Riek R., Billeter M. Wuthrich K. und Oesch B. (1997). *Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by y monoclonal antibody.* Nature, 390: 74-77

Kocisko D. A., Come J. H., Priola S. A., Chesebro B., Raymond G. J., Lansbury P. T. und Caughey B. (1995). *Cell-free formation of protease-resistant prion protein*. Nature, 370: 471-4

Kouzu Y., Uzawa K., Koike H., Saito K., Nakashima D., Higo M., Endo Y., Kasamatsu A., Shiiba M., Bukawa H., Yokoe H. und Tanzawa H. (2006). *Overexpression of stathmin in oral squamous-cell carcinoma: correlation with tumour progression and poor prognosis*. Br. J. Cancer, 94: 717-23

Kramer M. L., Kratzin H. D., Schmidt B., Romer A., Windl O., Liemann S., Hornemann S. und Kretzschmar H. (2001). *Prion protein binds copper within the physiological concentration range*. J. Biol. Chem., 276: 16711-19

Krasemann S., Groschup M., Harmeyer S., Hunsmann G. und Bodemer W. (1996). *Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP^{0/0} mice*. Mol. Med., 2: 725-34

Krasemann S., Groschup M., Hunsmann G. und Bodemer W. (1996). *Induction of antibodies against human prion proteins (PrP) by DNA-mediated immunization of PrP^{0/0} mice*. J. Immunol. Methods., 199: 109-18

Kretzschmar H. A., Stowring L. E., Westaway D., Stubblebine W. H., Prusiner S. B. und DeArmond S. J. (1986). *Molecular cloning of a human prion protein CDNA*. DNA, 5: 315-24

Kretzschmar H. A., Giese A., Brown D. R., Herms J., Keller B., Schmidt B. und Groschup M. (1997). *Cell death in prion disease*. J. Neural. Transm. Suppl., 50: 191-210

Kropp S., Zerr I., Schulz-Schaeffer W. J., Riedemann C., Bodemer M., Laske C., Kretzschmar H. A. und Poser S. (1999). *Increase of neuron-specific enolase in patients with Creutzfeldt-Jakob disease*. Neurosci. Lett., 261: 124-6

Kupzig S., Korolchuk V., Rollason R., Sugden A., Wilde A. und Banting G. (2003). *Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology*. Traffic, 10: 694-709

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

Landazuri N. und Le Doux J. M. (2006). *Complexation with chondroitin sulfate C and Polybrene rapidly purifies retrovirus from inhibitors of transduction and substantially enhances gene transfer*. *Biotechnol. Bioeng.*, 93: 146-58

Lange Y. und Steck T. L. (1985). *Cholesterol-rich intracellular membranes: a precursor to the plasma membrane*. *J. Biol. Chem.*, 260: 15592-7

Lasmezas C. I., Comoy E., Hawkins S., Herzog C., Mouthon F., Konold T., Auvre F., Correia E., Lescoutra-Etcheagaray N., Sales N., Wells G., Brown P. und Deslys J. P. (2005). *Risk of oral infection with bovine spongiform encephalopathy agent in primates*. *Lancet*, 365: 781-83

Lasserre C., Colnot C., Brechot C. und Poirier F. (1999). *HIP/PAP gene, encoding a C-type lectin overexpressed in primary liver cancer, is expressed in nervous system as well as in intestine and pancreas of the postimplantation mouse embryo*. *Am. J. Pathol.*, 154: 1601-10

Leblanc P., Baas D. und Darlix J.-L. (2004). *Analysis of the Interactions Between HIV-1 and the Cellular Prion Protein in a Human Cell Line*. *J. Mol. Biol.*, 337: 1035-51

Lee S., Agah R., Xiao M., Frutkin A. D., Kremen M., Shi H. und Dichek D. A. (2006). *In vivo expression of a conditional TGF-beta1 transgene: no evidence for TGF-beta1 transgene expression in SM22alpha-tTA transgenic mice*. *J. Mol Cell. Cardiol.*, 40: 148-56

Lee Y. H., You J. O. und Peng C. A. (2005). *Retroviral transduction of adherent cells in resonant acoustic fields*. *Biotechnol. Prog.*, 21: 372-6

Legname G., Baskakov I. V., Nguyen H. O., Riesner D., Cohen F. E., DeArmond S. J. und Prusiner S. B. (2004). *Synthetic mammalian prions*. *Science*, 305: 673-6

Lehmann S. und Harris D. A. (1997). *Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells*. *J. Biol. Chem.*, 272: 21479-87

Lehmann S. (2005). *Prion propagation in cell culture*. Methods Mol. Biol., 299: 227-34

Leffers K. W., Schell J., Jansen K., Lucassen R., Kaimann T., Nagel-Steger L., Tatzelt J. und Riesner D. (2004). *The structural transition of the prion protein into its pathogenic conformation is induced by unmasking hydrophobic sites*. J. Mol. Biol., 344: 839-53

Leliveld S. R., Dame R. T., Wuite G. J., Stitz L. und Korth C. (2006). *The expanded octarepeat domain selectively binds prions and disrupts homomeric prion protein interactions*. J. Biol. Chem., 281: 3268-75

Li K. *et al.* (1989). *Ferri-dye colloidal iron binding followed by perls' reaction for the staining of proteins transferred from sodium dodecylsulfate gels to nitrocellulose and positively charged nylon membranes*. Anal. Biochem., 153: 18-22

Li K. W., Geraerts W. P., van Elk R. und Joosse J. (1989). *Quantification of proteins in the subnanogram and nanogram range: comparison of the aurodye, ferried and India ink staining methods*. Anal. Biochem., 145: 315-21

Lindl T. (2000). Zell und Gewebekultur. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin.

Lopez Garcia F., Zahn R., Riek R. und Wuthrich K. (2000). *Nmr Structure of the Bovine Prion Protein*. PNAS, 97: 8334-39

Lopes M. H., Hajj G. N., Muras A. G., Mancini G. L., Castro R. M., Ribeiro K. C., Brentani R. R., Linden R. und Martins V. R. (2005). *Interaction of cellular prion and stress-inducibile protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signalling pathways*. J. Neurosci., 25: 11330-39

Endharti A. T., Zhou Y. W., Nakashima I. und Suzuki H. (2005) *Galectin-1 supports survival of naive T cells without promoting cell proliferation*. Eur. J. Immunol., 35: 86-97

Lo W. Y., Tsai M. H., Tsai Y., Hua C. H., Tsai F. J., Huang S. Y., Tsai C. H. und Lai C. C. (2006). *Identification of over-expressed proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients by clinical proteomic analysis*. Clin. Chim. Acta., 30: Epublished

Lu Y. und Lotan R. (1999). *Transcriptional regulation by butyrate of mouse galectin-1 gene in embryonal carcinoma cells*. Biochim. Biophys. Acta, 1444: 85-91

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

Lupi O., Dadalti P., Cruz E. und Sanberg P. R. (2006). *Are prions related to the emergence of early life?* Med. Hypotheses., 28: Epublished

Marcos Z., Bodegas M. E., Sesma M. P. und Guembe L. (2005) *Characterization of PrPc-immunoreactive cells in monkey (Macaca fascicularis) gastrointestinal tract*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1040: 387-90

Marsh R. F., Kincaid A. E., Bessen R. A. und Bartz J. C. (2005). *Interspecies transmission of chronic wasting disease prions to squirrel monkeys (Saimiri sciureus)*. J. Virol., 79: 13794-96

Mazzoni I. E., Ledebur Jr. H. C., Paramithiotis E. und Cashman N. (2005). *Lymphoid signal transduction mechanisms linked to cellular prion protein*. Biochem. Cell Biol., 83: 644-53

McKenzie D., Bartz J. C. und March R. F. (1996). *Transmissible mink encephalopathy*. Seminars in Virology, 7: 201-06

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

Menendez P., Wang L., Cerdan C. und Bhatia M. (2006). *Retroviral transduction of hematopoietic progenitors derived from human embryonic stem cells*. Methods Mol. Biol., 331: 201-20

Mehlhorn I., Groth D., Stockel J., Moffat B., Reilly D., Yansura D., Willett W. S., Baldwin M., Fletterick R., Cohen F. E., Vandlen R., Henner D. und Prusiner S. B. (1996). *High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein*. *Biochemistry*, 35: 5528-37

Meier P., Genoud N., Prinz M., Maissen M., Rulicke T., Zurbriggen A., Raeber A. J. und Aguzzi A. (2003). *Soluble dimeric prion protein binds PrP(Sc) in vivo and antagonizes prion disease*. *Cell*, 113: 49-60

Miller A. D. und Chen F. (1996). *Retrovirus packaging cells based on 10AI murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry*. *J. Virol.*, 70: 5564-71

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

Minor P., Newham J., Jones N., Bergeron C., Gregori L., Asher D., van Engelenburg F., Stroebel T., Vey M., Barnard G. und Head M. (2004). *WHO Working Group on International Reference Materials for the Diagnosis and Study of Transmissible Spongiform Encephalopathies. Standards for the assay of Creutzfeldt-Jakob disease specimens*. *J. Gen. Virol.*, 85: 1777-84

Mitsuiki S., Hui Z., Matsumoto D., Sakai M., Moriyama Y., Furukawa K., Kanouchi H. und Oka T. (2006). *Degradation of PrP(Sc) by keratinolytic protease from Nocardiosis sp. TOA-1*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70: 1246-48

Morel N., Simon S., Frobert Y., Volland H., Mourton-Gilles C., Negro A., Sorgato M. C., Créminon C. und Grassi J., (2004). *Selective and efficient immunoprecipitation of disease-associated form of the prion protein can be mediated by nonspecific interactions between monoclonal antibodies and scrapie-associated fibrils*. *J. Bio. Chem.*, 279: 30143-49

Moroncini G., Kanu N., Solforosi L., Abalos G., Telling G. C., Head M., Ironside J., Brookes J. P., Burton D. R. und Williamson R. A. (2004). *Motif-grafted antibodies containing the replicative interface of cellular PrP are specific for PrPSc*. *PNAS*, 101: 10404-9

Moudjou M., Frobert Y., Grassi J. und La Bonnardiere C. (2001). *Cellular Prion Protein Status in Sheep: Tissue-Specific Biochemical Signatures*. J. Gen. Virol., 82: 2017-24

Mullis K. B. und Faloona F. A. (1987). *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction*. Methods Enzymol., 155: 335-50

Nakamura Y., Sakudo A., Saeki K., Kaneko T., Matsumoto Y., Toniolo A., Itohara S. und Onodera T. (2003). *Transfection of prion protein gene suppresses coxsackievirus B3 replication in prion protein gene-deficient cells*. J. Gen. Virol., 84: 3495-502

Narang H. (1996). *The Nature of the scrapie agent: the virus theory*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 212: 208-24

Neuhoff V. (1985). *Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis*. Electrophoresis, 6: 427-48

Nunziante M., Gilch S. und Schatzl H. M. (2003). *Prion Diseases: From Molecular Biology to Intervention Strategies*. Chembiochem., 4: 1268-84

Oesch B., Westaway D., Walchli M., McKinley M. P., Kent S. B., Aebersold R., Barry R. A., Tempst P., Teplow D. B., Hood L. E. *et al.* (1985). *A Cellular Gene Encodes Scrapie Prp 27-30 Protein*. Cell, 40: 735-46

Oidtmann B., Simon D., Holtkamp N., Hoffmann R. und Baier M. (2003). *Identification of cDNAs from Japanese pufferfish (Fugu rubripes) and Atlantic salmon (Salmo salar) coding for homologues to tetrapod prion proteins*. FEBS, 538: 96-100

Paltrinieri S., Comazzi S., Spagnolo V., Rondena M., Ponti W. und Ceciliani F. (2004). *Bovine Doppel (Dpl) and prion protein (PrP) expression on lymphoid tissue and circulating leukocytes*. J. Histochem. Cytochem., 52: 1639-45

Pan K.-M., Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Huang Z., Flettericks R. J., Cohen F. E. und B. Prusiner S. B. (1993). *Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins*. PNAS, 90: 10962-66

Paramithiotis E., Pinard M., Lawton T., LaBoissiere S., Leathers V. L., Zou W. Q., Estey L.A., Lamontagne J., Lehto M. T., Kondejewski L. H., Francoeur G. P., Papadopoulos M., Haghighat A., Spatz S. J., Head M., Will R., Ironside J., O'Rourke K., Tonelli Q., Ledebur H. C., Chakrabartty A. und Cashman N. R. (2003). *A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation*. Nat. Med., 9: 893-9

Parry H. B. (1983). *Recorded occurrence of scrapie from 1750*. In Oppenheimer Dr. ed. *Scrapie disease in sheep*. London: Academic Press, 31-59

Paquet S., Sabuncu E., Delaunay J. L., Laude H. und Vilette D. (2004). *Prion Infection of Epithelial Rov Cells Is a Polarized Event*. J. Virol., 78: 7148-52

Poser S., Zerr I., Schroeter A., Otto M., Giese A., Steinhoff B. J. und Kretzschmar H. A. (2000). *Clinical and differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease*. Arch. Virol. Suppl., 16: 153-9

Prinz M., Heikenwalder M., Junt T., Schwarz P., Glatzel M., Heppner F. L., Fu Y. X., Lipp M. und Aguzzi A. (2003). *Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion*. Nature, 425: 957-62

Priola S. A., Caughey B., Wehrly K. und Chesebro B. (1995). *A 60-kDa prion protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP*. J. Biol. Chem., 270: 3299-305

Prusiner S. B., Groth D. F., Cochran S. P., Masiarz F. R., McKinley M. P. und Martinez H. M. (1980). *Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent*. Biochemistry, 19: 4883-91

Prusiner S. B. (1982). *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie*. Science, 216: 136-44

Prusiner S. B. (1991). *Molecular biology of prion diseases*. Science, 252: 1515-22

Public Health Agency of Canada, http://www.phac-aspc.gc.ca/cjd-mcj/gfx/bse-vcjd-uk-graph_e.gif

Race R. E., Priola S. A., Bessen R. A., Ernst D., Dockter J., Rall G. F., Mucke L., Chesebro B. und Oldstone M. B. (1995). *Neuron-specific expression of a hamster prion protein minigene in transgenic mice induces susceptibility to hamster scrapie agent*. *Neuron*, 15: 1183-91

Raggatt P. R. und Whitehouse M. W. (1966). *Substrate and inhibitor specificity of the cholesterol oxidase in bovine adrenal cortex*. *Biochem. J.*, 101: 819-30

Ratzka P., Schroter A., Cepek L., Henkel K., Wiltfang J., Kretzschmar H. A., Prange H., Poser S. und Otto M. (2001). *Unaltered apoptotic behaviour of mononuclear cells from patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease*. *J. Neurol.*, 248: 690-4

Riek R., Hornemann S., Wider G., Billeter M., Glockshuber R. und Wuthrich K. (1996). *NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321)*. *Nature*, 6587: 180-82

Robertson A., Perea J., Tolmachova T., Thomas P. K. und Huxley C. (2002). *Effects of mouse strain, position of integration and tetracycline analogue on the tetracycline conditional system in transgenic mice*. *Gene*, 282: 65-74

Rogers M., Yehiely F., Scott M. und Prusiner S. B. (1993). *Conversion of truncated and elongated prion proteins into the scrapie isoform in cultured cells*. *PNAS*, 90: 3182-86

Rosenthal E. (2006). *Inquiries in Britain Uncover Loopholes in Drug Trials*. *The New York Times*, 3. August

Rychlik W., Spencer W. J. und Rhoads R. E. (1990). *Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro*. *Nucl. Acids Res.*, 18: 6409-12

Sabuncu E., Petit S., Le Dur A., Lai T. L., Vilotte J. L., Laude H. und Vilette D. (2003). *PrP Polymorphisms Tightly Control Sheep Prion Replication in Cultured Cells*. *J. Virol.*, 77: 2696-700

Safar J., Ceroni M., Piccardo P., Liberski P. P., Miyazaki M., Gajdusek D. C. und Gibbs C. J. Jr. (1990). *Subcellular Distribution and Physicochemical Properties of Scrapie-Associated Precursor Protein and Relationship with Scrapie Agent*. *Neurology*, 40: 503-08

Safar J. G., Geschwind M. D., Deering C., Didorenko S., Sattavat M., Sanchez H., Serban A., Vey M., Baron H., Giles K., Miller B. L., DeArmond S. J. und Prusiner S. B. (2005). *Diagnosis of human prion disease*. *PNAS*, 102: 3501-06

Safar J. G., Kellings K., Serban A., Groth D., Cleaver J. E., Prusiner S. B. und Riesner D. (2005). *Search for a prion-specific nucleic acid*. *J. Virol.*, 79: 10796-806

Safar J. G., Wille H., Geschwind M. D., Deering C., Latawiec D., Serban A., King D. J., Legname G., Weisgraber K. H., Mahley R. W., Miller B. L., DeArmond S. J. und Prusiner S. B. (2006). *Human prions and plasma lipoproteins*. *PNAS*, 103: 11312-7

Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A. und Arnheim N. (1985). *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. *Science*, 230: 1350-54

Sailer A., Bueler H., Fischer M., Aguzzi A. und Weissmann C. (1994). *No propagation of prions in mice devoid of PrP*. *Cell*, 77: 967-8

Sakaguchi S., Katamine S., Nishida N., Moriuchi R., Shigematsu K., Sugimoto T., Nakatani A., Kataoka Y., Houtani T., Shirabe S., Okada H., Hasegawa S., Miyamoto T. und Noda T. (1996). *Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene*. *Nature*, 380: 528-31

Sakudo A., Lee D. C., Li S., Nakamura T., Matsumoto Y., Saeki K., Itohara S., Ikuta K. und Onodera T. (2005). *PrP cooperates with STII to regulate SOD activity in PrP-deficient neuronal cell line*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328: 14-19

Salguero F. J., Diaz-San S. F., Brun A., Cano M. J. und Torres J. M. (2006). *Comparison of three monoclonal antibodies for use in immunohistochemical detection of bovine spongiform encephalopathy protease-resistant prion protein*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 18: 106-9

Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Sanger F., Nicklen S. und Coulson A. R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. PNAS, 74: 5463-67

Satoh J. und Yamamura T. (2004). *Gene expression profile following stable expression of the cellular prion protein*. Cell Mol. Neurobiol., 24: 793-814

Scharf S. J., Hirn G. T. und Erlich H. A. (1986). *Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences*. Science, 233: 1076-78

Schatzl H. M., Da Costal M., Taylor L., Cohen F. E. und Prusiner S. B. (1995). *Prion Protein Gene Variation Among Primates*. J. Mol. Biol., 245: 362-74

Scheibel T. (2004). *Amyloid formation of a yeast prion determinant*. J. Mol. Neurosci., 23: 13-22

Sekijima M., Motono C., Yamasaki S., Kaneko K. und Akiyama Y. (2003). *Molecular dynamics simulation of dimeric and monomeric forms of human prion protein: insight into dynamics and properties*. Biophys J., 85: 1176-85

Shumyatsky G. P., Malleret G., Shin R. M., Takizawa S., Tully K., Tsvetkov E., Zakharenko S. S., Joseph J., Vronskaya S., Yin D., Schubart U. K., Kandel E. R. und Bolshakov V. Y. (2005). *Stathmin, a gene enriched in the amygdala, controls both learned and innate fear*. Cell, 123: 697-709

Simak J., Holada K., D'Agnillo F., Janota J. und Vostal J. G. (2002). *Cellular prion protein is expressed on endothelial cells and is released during apoptosis on membrane microparticles found in human plasma*. Transfusion, 42: 334-42

Simonic T., Duga S., Strumbo B., Asselta R., Ceciliani F. und Ronchi S. (2000). *CDNA Cloning of Turtle Prion Protein*. FEBS, 469: 33-38

Stack M., Jeffrey M., Gubbins S., Grimmer S., Gonzalez L., Martin S., Chaplin M., Webb P., Simmons M., Spencer Y., Bellerby P., Hope J., Wilesmith J. und Matthews D. (2006). *Monitoring for bovine spongiform encephalopathy in sheep in Great Britain, 1998-2004*. J. Gen. Virol., 87: 2099-107

Stahl N., Borchelt D. R., Hsiao K. und Prusiner S. B. (1987). *Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid*. Cell, 51: 229-40

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

Starke R., Harrison P., Mackie I., Wang G., Erusalimsky J. D., Gale R., Masse J. M., Cramer E., Pizzey A., Biggerstaff J. und Machin S. (2005). *The expression of prion protein (PrP(C)) in the megakaryocyte lineage*. J. Thromb. Haemost., 3: 1266-73

Stewart R. S., Piccardo P., Ghetti B. und Harris D. A. (2005) *Neurodegenerative illness in transgenic mice expressing a transmembrane form of the prion protein*. J. Neurosci., 25: 3469-77

Strey C. W., Spellman D., Stieber A., Gonatas J. O., Wang X., Lambris J. D. und Gonatas N. K. (2004). *Dysregulation of stathmin, a microtubule-destabilizing protein, and up-regulation of Hsp25, Hsp27, and the antioxidant peroxiredoxin 6 in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis*. Am. J. Pathol., 165: 1701-18

Strom A., Diecke S., Hunsmann G. und Stuke A. W. (2006). *Identification of prion protein binding proteins by combined use of far-Western immunoblotting, two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry*. Proteomics, 6: 26-34

Stuke A. W. und Strom A. (2005). *Tetracycline-regulated highly inducible expression of the human prion protein in murine 3T3 cells*. Protein Expression and Purification, 39: 8-17

Ullmann A., Jacob F. und Monod J. (1967). *Charakterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of Escherichia coli*. J. Mol. Biol., 24: 339-43

Takahashi M., Ogino T. und Baba K. (1969). *Estimation of relative molecular length of DNA by electrophoresis in agarose gel*. Biochim. Biophys. Acta, 174: 183-87

Tang M. X., Redemann C. T. und Szoka Jr. F. C. (1996). *In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers*. Bioconjugate Chem., 7: 703-14

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

Telling G. C., Scott M., Mastrianni J., Gabizon R., Torchia M., Cohen F. E., DeArmond S. J. und Prusiner S. B. (1995). *Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein*. Cell, 83: 79-90

Thompsett A. R., Abdelraheim S. R., Daniels M. und Brown D. R. (2005). *High affinity binding between copper and full-length prion protein identified by two different techniques*. J. Biol. Chem., 280: 42750-8

Tobler I., Gaus S. E., Deboer T., Achermann P., Fischer M., Rülicke T., Moser M., Oesch B., McBride P. A. und Manson J. C. (1996). *Altered circadian activity rhythmus and sleep in mice devoid of prion protein*. Nature, 380: 639-42

Todorova-Balvay D., Simon S., Creminon C., Grassi J., Srikrishnan T. und Vijayalakshmi M. A. (2005). *Copper binding to prion octarepeat peptides, a combined metal chelate affinity and immunochemical approaches*. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci., 818: 75-82

Todaro G. J. und Green H. (1963). *Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines*. Cell Biol., 17: 299-313

Trieschmann L., Navarrete Santos A., Kaschig K., Torkler S., Maas E., Schatzl H. und Bohm G. (2005). *Ultra-sensitive detection of prion protein fibrils by flow cytometry in blood from cattle affected with bovine spongiform encephalopathy*. BMC. Biotechnol. 4: 5-26

Vey M., Pilkuhn S., Wille H., Nixon R., DeArmond S. J., Smart E. J., Anderson R. G., Taraboulos A. und Prusiner S. B. (1996). *Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains*. PNAS, 93: 14945-49

Volkel D., Zimmermann K., Zerr I., Lindner T., Bodemer M., Poser S. und Schwarz H. P. (2001). *C-reactive protein and IL-6: new marker proteins for the diagnosis of CJD in plasma?* Transfusion, 41: 1509-14

Xiang W., Windl O., Wunsch G., Dugas M., Kohlmann A., Dierkes N., Westner I. M. und Kretzschmar H. A. (2004). *Identification of differentially expressed genes in scrapie-infected mouse brains by using global gene expression technology*. J. Virol., 78: 11051-60

Warwicker J. (2000). *Modeling a prion protein dimer: predictions for fibril formation*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 278: 646-52

Weissmann C. und Flechsig E. (2003). *PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research*. Br. Med. Bull., 66: 43-60

Weissmann C., Bueler H., Fischer M., Sailer A., Aguzzi A. und Aguet M. (1994). *PrP-deficient mice are resistant to scrapie*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 724: 235-40

Weissmann C., Bueler H., Fischer M., Sauer A. und Aguet M. (1994). *Susceptibility to scrapie in mice is dependent on PrPC*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 343: 431-33

Weiss B., Jacquemine-Sablon T. R., Fareed G. C. und Richardson C. C. (1968). *Further purification and properties of polynucleotid ligase from E. coli infected with bacteriophage T4*. J. Biol. Chem., 243: 4543-55

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

Wells G. A., Dawson M., Hawkins S. A., Green R. B., Dexter I., Francis M. E., Simmons M. M., Austin A. R. und Horigan M. W. (1994). *Infectivity in the ileum of cattle challenged orally with bovine spongiform encephalopathy*. Vet. Rec., 135: 40-41

Wells G. A., Hawkins S. A., Austin A. R., Ryder S. J., Done S. H., Green R. B., Dexter I., Dawson M. und Kimberlin R. H. (2003). *Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs*. J. Gen. Virol., 84: 1021-31

Wells G. A. H., Spiropoulos J., Hawkins S. A. C., Ryder S. J. (2005). *Pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): preclinical infectivity in tonsil and observations on the distribution of lingual tonsil in slaughtered cattle*. Vet. Rec., 156: 401-07

Wilesmith J. W., Wells G. A. H., Cranwell M. P. und Ryan J. M. B. (1988). *Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies*. Vet. Rec., 123: 638-44

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

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

Williams E. S. und Young S. (1982). *Spongiform encephalopathy of rocky mountain elk*. J. Wildl. Dis., 18: 465-71

Windl O., Dempster M., Estibeiro P. und Lathe R. (1995). *A Candidate Marsupial Prp Gene Reveals Two Domains Conserved in Mammalian Prp Proteins*. Gene, 159: 181-86

Wong B. S., Li R., Sassoon J., Kang S. C., Liu T., Pan T., Greenspan N. S., Wisniewski T. und Brown D. R. (2003). *Sy MS. Mapping the antigenicity of copper-treated cellular prion protein with the scrapie isoform*. Cell Mol. Life Sci., 60: 1224-34

Wu C., Pang W. und Zhao D. (2006). *Amino acid sequence of the Amur tiger prion protein*. Virus Res., 121: 93-6

Wyatt J. M., Peardon G. R., Smerdon T. N., Gruffydd-Jones T. J., Wells G. A. H. und Wilesmith J. W. (1991). *Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats*. Vet. Rec., 129: 233-36

Yakovleva O., Janiak A., McKenzie C., McShane L., Brown P. und Cervenakova L. (2004). *Effect of protease treatment on plasma infectivity in variant Creutzfeldt-Jakob disease mice*. Transfusion, 44: 1700-5

Zahn R., Liu A., Luhrs T., Riek R., von Schroetter C., Lopez Garcia F., Billeter M., Calzolari L., Wider G. und Wuthrich K. (2000). *Nmr Solution Structure of the Human Prion Protein*. PNAS, 97: 145-50

Zanata S. M., Lopes M. H., Mercadante A. F., Hajj G. N., Chiarini L. B., Nomizo R., Freitas A. R., Cabral A. L., Lee K. S., Juliano M. A., de Oliveira E., Jachieri S. G., Burlingame A., Huang L., Linden R., Brentani R. R. und Martins V. R. (2002). *Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection*. EMBO, 21: 3307-16

Zeidler M., Stewart G. E., Barraclough C. R., Bateman D. E., Bates B., Burn B. J., Cholchester A. C., Durward W., Fletcher N. A., Hawkins A. C., Mackenzie J. M. und Will R. G. (1997). *New variant Creutzfeldt-Jakob disease: Neurological features and diagnostic tests*. Lancet, 350: 903-07

Ziegler J., Sticht H., Marx U. C., Muller W., Rosch P. und Schwarzinger S. (2003) *CD and NMR studies of prion protein (PrP) helix 1. Novel implications for its role in the PrPC-->PrPSc conversion process*. J. Biol. Chem., 278: 50175-81

Zhang Y., Spiess E., Groschup M. H. und Burkle A. (2003). *Up-regulation of cathepsin B and cathepsin L activities in scrapie-infected mouse Neuro2a cells*. J. Gen. Virol., 84: 2279-83

Zhang X. und Godbey W. T. (2006). *Viral vectors for gene delivery in tissue engineering*. Adv. Drug. Deliv. Rev., 58: 515-34

Zou W. Q., Zheng J., Gray D. M., Gambetti P., Chen S. G. (2004). *Antibody to DNA detectsscrapie but not normal prion protein*. PNAS, 101: 1380-5

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Oliver Einsle vom GZMB, in Göttingen und Frau Prof. Frauke Melchior, Leiterin der Biochemie I der Medizin an der Georg-August Universität Göttingen, für die Übernahme des 1. Referenten und des 2. Referenten.

Ich danke Herrn Prof. Gerhard Hunsmann dafür, dass ich meine Doktorarbeit in der Abteilung Virologie und Immunologie des Deutschen Primatenzentrums, Mitglied der Leibniz Gesellschaft anfertigen durfte.

Herrn Dr. Andreas Stuke und seiner Arbeitsgruppe am Deutschen Primatenzentrums danke ich für die Betreuung während der Anfertigung meiner Doktorarbeit.

Herrn Dr. Olaf Jahn von der Arbeitsgruppe Proteomics in der Abteilung Molekulare Neurobiologie am Max-Planck Institut für experimentelle Medizin, Göttingen, danke ich für die massenspektrometrischen Untersuchungen meiner ausgewählten 2D-Spots.

Herrn Dr. Edgar Holznagel und Frau Dipl. Ing. (FH) Barabara Yutzy, vom Primatenzentrum des Paul-Ehrlich-Instituts, Langen, danke ich für Möglichkeit der Durchführung der Messung von infizierten Proben im FACS Gerät.

Herrn PD. Dr. Sighard Sopper und Herrn Dipl. Biochem. Reiner Schulte aus der Abteilung Virologie und Immunologie des Deutschen Primatenzentrums danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der FACS Analysen.

Dr. Christian Roos, von der Arbeitsgruppe Primatengenetik am Deutschen Primatenzentrum, danke ich für die Beschaffung der DNA verschiedener Spezies, die Sequenzierung der amplifizierten Fragmente und für die Beratung bei der Interpretationen der Sequenzen.

Ich danke meinem ehemaligen Komillitonen Herrn Dipl. Biochem. Knut Kölbel, von der Abteilung Enzymologie der Biochemischen Fakultät der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, für die CD-Spektroskopischen Untersuchungen ausgewählter Proteinproben.

Herrn Dr. Jörg Kahle, von der Abteilung Molekularbiologie am Zentrum für Biochemie und Molekulare Zellbiologie an der Georg-August Universität Göttingen, danke ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Fluoreszenz- und Immunfluoreszenzmikroskopie Untersuchungen.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die Unterstützung während der Zeit die ich in Göttingen verbracht habe, um meine Doktorarbeit anzufertigen.

Lebenslauf:

Name: Lars Heinig
Ausbildung: Dipl. Biochemiker
Geburtsdatum: 29. April 1978
Geburtsort: Karl-Marx-Stadt; jetzt Chemnitz

Bildungshintergrund

04/03 – 09/06 Anfertigung der Doktorarbeit am Deutschen Primatenzentrum in der Abt. Virologie und Immunologie bei Prof. Hunsmann mit Thema: „*Ex vivo*“ Replikation des pathogenen Prion Proteins.

05/06 – 05/06 Wissenschaftliche Hilfskraft am Albrecht von Haller Institut der Georg-August Universität Göttingen bei Prof. R. Tischner

02/03 - 03/03 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Hämatologie am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main bei Prof. Hoelzer mit dem Thema: Modulatoren der Chromatinstruktur als therapeutische Strategie bei soliden Tumoren und hämatologischen Neoplasien.

04/00 – 06/00 Forschungsgruppenpraktikum in am Institut für Physiologische Chemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bei Prof. Braun mit dem Thema: Charakterisierung von Mox2 Mutanten bei Mäuse-embryonen.

07/99 – 09/99 Ferialpraktikant bei Boeringer Ingelheim Wien, Österreich

03/99 – 07/99 Studentische Hilfskraft an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, im Fachbereich Biochemie / Biotechnologie

Studium

10/97 – 11/02 Studium der Biochemie / Biotechnologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Diplomarbeit im Fachbereich Biochemie / Biotechnologie, in der Arbeitsgruppe Biosensoren bei PD Dr. U. Spohn mit dem Thema: Amperometrische Pyruvatsensoren auf der Basis nanoporöser Schichten.

Grundwehrdienst

11/96 – 08/97 Grundwehrdienst in Regensburg

Schule

09/92 – 08/96 Gottfried - Leibniz - Gymnasium, Chemnitz
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

09/84 – 08/92 Georgi - Dimitroff - Oberschule, Chemnitz

Konferenzbeiträge:

- 2003: Heinig L., Strom A. und Stuke A. W. „Cell lines over expressing *prnp* genes of different species to characterise homo- and heterologous prions” Prion diseases: from basic RESEARCH to intervention CONCEPTS, München, Deutschland
- 2004 Heinig L., Motzkus D. und Stuke A. W. “Regulation of PrP expression to characterise prions from several species” Prion 2004 First International Conference of the European Network of Excellence NeuroPrion, Pasteur Institut, Paris, Frankreich
- 2005 Heinig L. und Stuke A. W. “Regulated prion protein expression for prion conversion monitoring” Prion 2005 Between fundamentals and society’s needs Düsseldorf, Deutschland

Kurse:

„Schutz und Vermarktung von Forschungsergebnissen am DPZ“
Ascenion, Göttingen, Deutschland

Glück entsteht oft durch
Aufmerksamkeit in kleinen Dingen.

Unglück oft durch
Vernachlässigung kleiner Dinge.

Chinesische Weisheit