

**Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
der Philipps-Universität Marburg**

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller

**durchgeführt in Zusammenarbeit mit
dem Institut für Virologie**

der Technischen Universität München

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Volker Erfle

Interferenz in Signaltransduktionswege als therapeutischer Ansatz bei Prionkrankheiten

INAUGURAL DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Alexa Ertmer

aus Ludwigshafen

Marburg 2005

**Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
der Philipps-Universität Marburg**

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller

**durchgeführt in Zusammenarbeit mit
dem Institut für Virologie**

der Technischen Universität München

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Volker Erfle

Interferenz in Signaltransduktionswege als therapeutischer Ansatz bei Prionkrankheiten

INAUGURAL DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Alexa Ertmer

aus Ludwigshafen

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am
19.07.2005

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. Guntram Suske

Korreferent: Prof. Dr. Klaus-Heinrich Röhm

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Historisches	3
2.2. Prion-Erkrankungen	6
2.2.1 Prion-Erkrankungen bei Tieren	6
2.2.2. Prion-Erkrankungen beim Menschen	9
2.3. Das Prion Protein	15
2.3.1. Die Genstruktur des Prion Proteins	15
2.3.2. Die strukturellen Eigenschaften des Prion Proteins	17
2.3.3. Die Konformation von PrP ^c und PrP ^{Sc}	20
Die „Protein-only“-Hypothese	20
Die Struktur von PrP ^c und PrP ^{Sc}	20
Spezies-Barriere und Prion-Stämme	24
Der experimentelle Nachweis von PrP ^c und PrP ^{Sc}	25
2.4. Physiologische Funktionen des Prion Proteins	27
Die Rolle von PrP ^c in der Signaltransduktion	29
2.5. Konversionsmodelle	30
2.6. Ansätze zur Therapie und Prophylaxe	32
2.7. Zielsetzung	37
3. Material und Methoden	38
3.1. Material	38
3.1.1. Strahlenschutz und biologische Sicherheit	38
3.1.2. Chemikalien	38
3.1.3. Antibiotika	39
3.1.4. Radioaktive Verbindungen	39
3.1.5. Restriktionsendonukleasen und DNA-modifizierende Enzyme	39
3.1.6. Zelllinien	40
3.1.7. Bakterien	42

3.1.8. Inhibitorische Substanzen	42
3.1.9. Antikörper	43
3.1.10. Plasmide	44
3.1.11. Oligonukleotide	47
3.2. Methoden	50
3.2.1. Molekularbiologische Methoden	50
3.2.1.1. Quantifizierung von Nukleinsäuren	50
3.2.1.2. Restriktionsverdau	51
3.2.1.3. Dephosphorylierung von 5'-überhängenden DNA-Enden	51
3.2.1.4. Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide zu doppelsträngiger DNA für Klonierungen	51
3.2.1.5. Agarose Gelelektrophorese	52
3.2.1.6. Ligation	52
3.2.1.7. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	52
3.2.1.8. Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmiden	53
3.2.1.9. Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Mini-Lysat-DNA)	54
3.2.1.10. Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab	54
3.2.1.11. Generierung von siRNA-Expressionsplasmiden zur Niederregulation von Proteinen	54
3.2.2. Zellbiologische Methoden	58
3.2.2.1. Passagieren und Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	58
3.2.2.2. Einfrieren und Lagerung von Zellen	58
3.2.2.3. Auftauen von Zellen	58
3.2.2.4. Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Lipofektion	58
3.2.2.5. Behandlung von Zellen mit STI571 bzw. anderer Substanzen (Screening)	59
3.2.2.6. Zytotoxizitätstests	59
3.2.2.7. Verfahren zur Fluoreszenzmarkierung zellulärer Proteine	61
3.2.2.8. Metabolische Radiomarkierung zellulärer Proteine	63
3.2.2.9. Verfahren zum Nachweis von <i>in vivo</i> Tyrosin-Phosphorylierungen zellulärer Proteine	66
3.2.3. Biochemische Methoden	67
3.2.3.1. Herstellung von Proteinextrakten	67

3.2.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford	68
3.2.3.3. Proteinase K-Verdau postnukleärer Extrakte	69
3.2.3.4. Löslichkeits-Assay	70
3.2.3.5. Verdau mit PIPLC (Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C)	71
3.2.3.6. Immunpräzipitationen	73
3.2.3.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	75
3.2.3.8. Western Blot	76
3.2.3.9. <i>In vitro</i> Kinase-Assays	77
3.2.3.10. Test auf eine Wirkung von STI571 auf PrP ^{Sc} in toten Zellen	78
3.2.3.11. Test auf proteolytische Aktivität in Zell-Lysaten	79
4. Ergebnisse	81
4.1. Vorbemerkung	81
4.2. STI571 reduziert PrP ^{Sc} in Prion-infizierten Zellen	81
4.3. Effekte von STI571 auf Prion-infizierte Zellen	85
4.3.1. STI571 weist keine Zytotoxizität auf	85
4.3.2. Die Reduktion von PrP ^{Sc} durch STI571 ist Zeit- und Dosis-abhängig	87
4.3.3. Wie stabil ist der Effekt von STI571 auf PrP ^{Sc} ?	90
4.3.4. Was geschieht mit PrP ^c unter der Behandlung mit STI571?	92
Die Löslichkeit von PrP ^c in 1 % Sarkosyl unter der Behandlung mit STI571	92
Die Lokalisierung von PrP ^c an der Zelloberfläche unter der Behandlung mit STI571	93
4.3.5. Liegt eine Verfälschung des PrP ^{Sc} -Nachweises durch Bindung von STI571 an PrP ^{Sc} vor?	96
4.4. Der molekulare Wirkungsmechanismus von STI571	98
4.4.1. STI571 hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Neubildung von PrP ^{Sc}	98
4.4.2. STI571 reduziert die Halbwertszeit von PrP ^{Sc} in Prion-infizierten Zellen	100
4.4.3. Welche Degradationsmechanismen werden von STI571 aktiviert?	103
4.4.4. Die Lysosomen unter der Behandlung mit STI571	106
4.4.5. Haben Lysate STI571-behandelter Zellen eine erhöhte proteolytische Aktivität?	108
4.5. Das molekulare Target von STI571 im anti-Prion Effekt	111
4.5.1. PDGF-Rezeptor und c-Kit	111

4.5.2. c-Abl	113
Inhibition der Aktivität von c-Abl über eine Transdominant-Negativ-Mutante	113
Niederregulierung von c-Abl mittels RNAi	115
4.6. Phosphorylierungs-Studien	118
4.6.1. <i>In vitro</i> Kinase-Assays	118
4.6.1.1. STI571 inhibiert c-Abl aus N2a- und ScMHM2-Zellen <i>in vitro</i>	119
4.6.1.2. Rekombinantes PrP wird <i>in vitro</i> nicht von c-Abl phosphoryliert	120
4.6.2. Wird PrP <i>in vivo</i> an Tyrosinresten phosphoryliert?	121
5. Diskussion	124
5.1. Der Tyrosin-Kinasen Inhibitor STI571	124
5.2. Der anti-Prion Effekt von STI571	127
5.2. Kein Einfluss von STI571 auf PrP ^c	129
5.3. Der anti-Prion Effekt von STI571 beruht auf zellulären Vorgängen	130
5.4. STI571 induziert die lysosomale Degradation von bereits existierendem PrP ^{Sc}	131
5.5 Lysate von STI571-behandelten Zellen besitzen keine erhöhte proteolytische Aktivität	133
5.6. Beruht der anti-Prion Effekt auf der Inhibition von c-Abl?	135
Die Tyrosin-Kinase c-Abl	136
5.7 STI571: von der Zellkultur zu <i>in vivo</i> Studien?	139
5.8. Ausblick	144
6. Literaturverzeichnis	147
Anhang	
Abkürzungsverzeichnis	
Tabellarischer Lebenslauf	
Verzeichnis der akademischen Lehrer	
Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	
Danksagung	
Ehrenwörtliche Erklärung	

1. Zusammenfassung

Prionkrankheiten sind stets tödliche, neurodegenerative, infektiöse Erkrankungen, die unterteilt werden können in sporadische, genetisch-familiäre oder erworbene Formen. Sie sind auch bekannt unter dem Namen transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSEs). Zu ihnen gehören die Creutzfeldt-Jakob Erkrankung (CJD), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom (GSS), Kuru, die fatale (letale) familiäre Insomnie (FFI) und die Variante der CJD (vCJD) im Menschen, Scrapie bei Schafen und Ziegen sowie die bovine spongiforme Enzephalopathie bei Rindern (BSE). Prion-Erkrankungen werden durch die Akkumulierung einer abnormal gefalteten Isoform des zellulären Prion Proteins PrP^c verursacht, die PrP^{Sc} genannt wird und den Hauptbestandteil von infektiösen Prionen darstellt. Die Konversion des zellulären Prion Proteins PrP^c in seine pathogene Isoform PrP^{Sc} und die Akkumulierung von aggregiertem PrP^{Sc} sind demnach wesentliche Merkmale von Prion-Erkrankungen.

Auf der Suche nach Wegen für eine mögliche Therapie und/oder Prophylaxe wurde bisher eine Vielzahl von experimentellen Ansätzen durchgeführt, mit dem Ziel in die Prion-Konversion einzugreifen. In dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob durch einen Eingriff in zelluläre Signaltransduktionsprozesse ein Effekt auf die Konversion von PrP^c in PrP^{Sc} ausgeübt werden kann. Dafür wurde von etwa 50 verschiedenen Substanzen, die spezifische Signalwege der Zelle inhibieren, der Effekt auf die Prion-Konversion in Prion-infizierten Zellen untersucht. Der Tyrosin-Kinasen Inhibitor STI571 zeigte in diesem Screening als einzige Substanz eine sehr starke Reduktion von PrP^{Sc}. Die Konzentration, mit der eine 50 %ige Reduktion von PrP^{Sc} in Prion-infizierten Zellen erreicht werden kann (IC₅₀), liegt bei ≤ 1 μ M. Weitere Untersuchungen ergaben, dass der durch STI571 ausgelöste anti-Prion Effekt zeit- und dosisabhängig ist und keinen Effekt auf die Biogenese, die Lokalisierung oder die biochemischen Eigenschaften der zellulären Isoform PrP^c hat. Experimente zum molekularen Wirkungsmechanismus zeigten, dass STI571 nicht die Neusynthese von PrP^{Sc} inhibiert, sondern vielmehr den lysosomalen Abbau von bereits in der Zelle vorhandenem PrP^{Sc} aktiviert. Hierbei wird die zelluläre Halbwertszeit von PrP^{Sc}, die unter normalen Umständen sehr hoch ist und bei mehr als 24 Stunden liegt, auf unter 9 Stunden reduziert. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass durch STI571 nicht die allgemeine lysosomale Aktivität der Zellen erhöht wird, sondern dass es spezifisch den

physiologischen Abbau von PrP^{Sc} aktiviert und dadurch die zelluläre Clearance von PrP^{Sc} erhöht.

Schließlich konnte das molekulare Ziel von STI571, das spezifisch die drei Tyrosin-Kinasen c-Kit, den PDGF(platelet derived growth factor)-Rezeptor und c-Abl inhibiert, bestimmt werden. Den verschiedenen durchgeführten Untersuchungen zufolge wird die Degradierung von PrP^{Sc} durch die Inhibition der Kinase c-Abl ausgelöst.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Eingriffe in die zelluläre Signaltransduktion auf den Prozess der Prion-Konversion Einfluss genommen und die zelluläre Clearance von PrP^{Sc} aktiviert werden kann. Demnach stellen Signaltransduktionswege generell potentielle Ziele für Ansätze zur Prophylaxe und Therapie von Prion-Erkrankungen dar. Substanzen, die spezifisch in Signaltransduktionsprozesse der Zelle eingreifen, sind somit eine neue Klasse von Substanzen mit anti-Prion Wirkung.

2. Einleitung

2.1. Historisches

Die Existenz von Prionkrankheiten, neurodegenerativen Erkrankungen bei Mensch und Tier, die auch transmissible, spongiforme Enzephalopathien (TSEs) genannt werden, ist schon seit vielen Jahrzehnten bekannt. In das Licht des öffentlichen Interesses gerückt sind sie allerdings erst seit dem Auftauchen der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE), dem so genannten „Rinderwahnsinn“, und der 1996 damit in Zusammenhang gebrachten neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung beim Menschen (Will *et al.*, 1996; Collinge & Rossor, 1996a; Will, 1998). Mehr als 180.000 bestätigte BSE-Fälle in Großbritannien und später zahlreiche positiv getestete Rinder im restlichen Europa stellen eine große Bedrohung für den Verbraucher durch in den Handel gelangtes kontaminiertes Fleisch dar. Das stellt den Verbraucherschutz und die Forschung vor große, neue Herausforderungen. In den letzten Jahren wurde deshalb noch intensiver an der Erforschung der Entstehung und Eigenschaften dieser Krankheiten gearbeitet und es konnten bahnbrechende Erkenntnisse gewonnen werden. Zwar zählen Prion-Erkrankungen zu den Infektionskrankheiten, jedoch sind nicht alle durch Infektion bzw. auf natürlichem Weg übertragbar. Einige Formen entstehen familiär-genetisch als Folge von Mutationen oder auch spontan. Aus diesem Grund war die Natur des Erregers lange Jahre eine Streitfrage unter den Forschern. Die am längsten bekannte und damit am besten erforschte Prionkrankheit ist die Scrapie oder Traberkrankheit bei Schafen. Die älteste bekannte Literatur geht auf das Jahr 1732 zurück und stammt aus Großbritannien (McGowan, 1914). 1936 gelang die experimentelle Übertragung von Scrapie auf gesunde Schafe und Ziegen durch Inokulation von infektiösem Schafhirnhomogenat. Infolgedessen wurde vermutet, dass es sich bei dem Erreger um eine Art Virus handeln müsse. 1954 postulierte Sigurdson eine „slow virus“-Infektion, mit Inkubationszeiten um die zwanzig Jahre (Sigurdson, 1954).

1956 wurde Vincent Zigas auf Kuru, einer neurodegenerativen Krankheit, die die Stämme der Fore, einem Volk im Hochland von Papua Neuguinea, heimsuchte, aufmerksam (Zigas, 1981). 1957 stieß der Virologe D. C. Gajdusek zu Zigas (Gajdusek,

1981) und beschloss, Kuru systematisch zu erforschen (Gajdusek & Zigas, 1957; Zigas & Gajdusek, 1957). Unter sehr harten Bedingungen trieb er das Kuru-Projekt, dem sich vorübergehend weitere Forscher anschlossen, in Papua Neuguinea voran und ermöglichte so eine detaillierte Beschreibung der Krankheit.

Der Veterinärpathologe und Scrapie-Spezialist Hadlow erkannte 1959 die Ähnlichkeit in Klinik und Neuropathologie zwischen Scrapie und Kuru (Hadlow, 1992), und empfahl die Durchführung von Übertragungsversuchen an Schimpansen (Hadlow, 1959). Sieben Jahre später gelang Gajdusek die experimentelle Übertragung von Kuru auf Schimpansen durch intracerebrale Inokulation (Gajdusek *et al.*, 1966). Die pathologischen Veränderungen im Zentralen Nervensystem (ZNS), die bei diesen Krankheiten beobachtet werden konnten, ähnelten stark der Pathologie einer weiteren Krankheit beim Menschen (Klatzo *et al.*, 1959), der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung (CJD – Creutzfeldt-Jakob disease). Diese sehr seltene neurodegenerative Krankheit wurde 1920 von Hans Creutzfeldt und 1921 von Alfons Jakob unabhängig voneinander beschrieben (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921). 1968 wurde die Übertragung von CJD bei einem neurochirurgischen Eingriff von einem infizierten Patienten auf einen anderen Menschen durch die Verwendung von nicht adäquat dekontaminierten Elektro-Enzephalogramm-(EEG-) Elektroden berichtet. Etwa zeitgleich gelang auch die Übertragung von CJD auf Schimpansen durch intracerebrale Inokulation (Gibbs jr. *et al.*, 1968). Mit der Übertragung der beiden menschlichen neurodegenerativen Erkrankungen Kuru und CJD konnte erstmals gezeigt werden, dass diese Krankheiten ebenso wie die Scrapie bei den Schafen und Ziegen, ebenfalls infektiös sind.

Entgegen der anfänglich postulierten Virus-Hypothese als Ursache für Prionkrankheiten, ließen sich weder ein Virus noch eine Immunantwort in den infizierten Organismen finden. Zudem berichtete Tikvah Alper 1966, dass der Scrapie-Erreger selbst durch massive DNA- und RNA-schädigende Strahlung nicht zu inaktivieren ist. Stattdessen konnte die Infektiosität durch Verfahren reduziert werden, die in der Lage waren Proteine zu hydrolysieren oder zu modifizieren, wie Behandlung mit Harnstoff oder Natriumhydroxid (Alper *et al.*, 1966; Alper *et al.*, 1967). Diese Beobachtungen führten zu der Schlussfolgerung, dass der Erreger anscheinend keine Nukleinsäure besitzt. 1976 stellte Griffith die Hypothese auf, dass ein bloßes Protein im Zuge einer Autokatalyse „vermehrt“ wird und für die Übertragung von Scrapie verantwortlich sein könnte (Griffith, 1976). Prusiners Gruppe gelang es 1982 ein Proteasen-resistentes Glykoprotein zu isolieren, das den Hauptbestandteil der

infektiösen Fraktion im Hirnhomogenat infizierter Tiere darstellte. Dieses Proteasen-resistente Glykoprotein war in der Lage, amyloide Ablagerungen in Form von filamentösen Strukturen zu bilden, so genannte scrapie-associated-fibrils (SAF) oder „prion rods“ (Hilmert & Diringer, 1984; Prusiner *et al.* 1981; Prusiner, 1982). Um diese Erregerklasse von den bisher bekannten Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilzen und Protozoen abzugrenzen, prägte Prusiner die Definition „Prion“ für „proteinaceous infectious particle“, als Bezeichnung für einen Erreger ohne Nukleinsäure. In angereicherten Fraktionen aus Homogenat von Gehirnen von infizierten Syrischen Hamstern hatte das isolierte Proteinase K (PK)-resistente Protein ein Molekulargewicht zwischen 27 und 30 kDa (PrP²⁷⁻³⁰) und wurde nach Proteinase K-Verdau von einem größeren Protein gebildet, das ein Molekulargewicht von 33 bis 35 kDa hatte. Diese Proteinase K-resistente Form wurde später PrP^{Sc} genannt (Sc für Scrapie, um den infektiösen Charakter des Proteins wiederzugeben). Gegen diese Hamster-Prionen konnten experimentell in Mäusen Antiseren generiert werden. Diese Seren reagierten auch mit einem Protein aus nicht-infizierten Geweben, sofern diese nicht zuvor mit Proteinase K behandelt worden waren. Sequenzanalysen des N-Terminus von PrP^{Sc} mittels Edman Degradierung (Prusiner *et al.*, 1984) ermöglichten 1985 der Gruppe um Charles Weissmann die Identifikation und Klonierung des kodierenden Gens in Hamsterzellen, das Prion Protein (PrP) Gen *Prnp* genannt wurde (Oesch *et al.* 1985). Es konnte gezeigt werden, dass das PrP Gen nicht in Prionen sondern auf den Chromosomen von Mensch, Hamster, Maus und allen anderen untersuchten Arten lokalisiert war. Auch war dieses Gen die meiste Zeit aktiv, was bedeutet, dass jeder tierische und menschliche Organismus PrP-mRNA herstellt, ohne zu erkranken (Oesch *et al.*, 1985; Basler *et al.*, 1986). Das zelluläre Homolog des infektiösen Prion Proteins PrP^{Sc} erhielt den Namen PrP^c (c für cellular). Die beiden Isoformen des Prion Proteins haben dieselbe Aminosäuresequenz, aber unterscheiden sich beträchtlich in ihren strukturellen und biochemischen Eigenschaften (Prusiner, 1991).

Tabelle 1. gibt einen Überblick über die wichtigsten Unterschiede in den Eigenschaften von PrP^c und PrP^{Sc} wieder.

Eigenschaft	PrP^c	PrP^{Sc}
Infektiosität	Nein	Ja
Sekundärstruktur	Hauptsächlich α -helikal	Hauptsächlich β -Faltblatt
Halbwertszeit	2 – 6 Stunden	≥ 24 Stunden
Proteinase K-Resistenz	Keine	(Relative) Resistenz
Löslichkeit in Detergenzien	Löslich	Unlöslich
Molekulargewicht*: -PK \rightarrow +PK	33 – 35 kDa \rightarrow degradiert	33 – 35 kDa \rightarrow 27 – 30 kDa

Tabelle 1: Vergleich der Eigenschaften der zellulären und der pathogenen Isoform des Prion Proteins. *Molekulargewicht der zweifach-glykosylierten Form des Prion Proteins.

2.2. Prion-Erkrankungen

Prion-Erkrankungen kommen sowohl beim Menschen als auch bei Tieren vor und sind stets letal. Die Erkrankungen haben gemeinsame neuropathologische Eigenschaften. Das Zentralnervensystem weist eine schwammartige (spongiforme) Degeneration auf, die verschiedene Teile der Grauen Substanz betrifft. Zudem lässt sich neben einem massiven Verlust an Neuronen auch die Proliferation von Astrozyten beobachten, die zusätzlich von der Bildung amyloider Plaques begleitet werden kann. Der Grad der spongiformen Vakuolisierung kann sehr unterschiedlich sein und das Ausmaß der Astrozytenproliferation hängt mit der Menge an degenerierten Neuronen zusammen.

2.2.1 Prion-Erkrankungen bei Tieren

Wie bereits anfangs erwähnt, ist die älteste bekannte Prion-Erkrankung die Scrapie oder Traberkrankheit bei Schafen und Ziegen (McGowan, 1914). Bei dieser Krankheit konnte eine Übertragbarkeit sowohl vom Muttertier auf das un- oder neugeborene Jungtier, als auch auf andere Tiere in der Herde nachgewiesen werden (Brotherston, 1968; Dickinson *et al.*, 1974). Neben Scrapie existieren aber noch weitere Prionkrankheiten bei Tieren. Beispiele sind die transmissible Enzephalopathie in

Nerzen (TME = Transmissible Mink Encephalopathy) (Burger & Hartsough, 1965; Hartsough & Burger, 1965), die chronisch zehrende Krankheit der Hirsche und Elche (CWD = Chronic Wasting Disease) (Williams & Young, 1980), die bovine spongiforme Enzephalopathie in Rindern und rinderartigen Wiederkäuern (BSE) (Wells *et al.*, 1987) und die feline spongiforme Enzephalopathie in Katzen und Großkatzen (FSE) (Wyatt *et al.*, 1990).

Erkrankung	Wirt	Ursache
Scrapie	Schaf/Ziege	Vertikale und horizontale Übertragung in genetisch anfälligen Tieren Orale Transmission Spontan
TME (transmissible mink encephalopathy)	Nerz	Infektion über verseuchtes Fleisch von Schaf und Rind
CWD (chronic wasting disease)	Hirsch, Elch	Möglicherweise ähnliche Übertragung wie bei Scrapie
BSE (bovine spongiform encephalopathy)	Rinder und rinderartige Wiederkäuer	Infektion mit Prion-verseuchtem Futter Spontan (?)
FSE (feline spongiform encephalopathy)	Katze/Großkatze	Infektion über verseuchtes Fleisch von Schaf und Rind

Tabelle 2: Beispiele für Prion-Erkrankungen bei Tieren und ihre Ursachen.

Die TME bei Nerzen und FSE bei Katzen und Großkatzen sind die einzigen bislang bekannten Prion-Erkrankungen bei Carnivoren und wurden wahrscheinlich durch die Verfütterung von Prion-infizierten Schlachtabfällen von Rindern und Schafen verursacht.

Bei der 1986 in Großbritannien ausgebrochenen BSE-Epidemie wird als ursprüngliche Quelle meist Schaf-Scrapie gesehen. Die betroffenen Tiere reagierten zunächst äußerst überempfindlich gegenüber sensorischen Reizen wie Lärm und Licht und wiesen allmählich immer stärker werdende Bewegungsstörungen auf (Wilesmith *et al.*, 1988). Die Übertragung von infizierten Schafen zum Rind und die damit verbundene

Überwindung der Artenschanke (Spezies-Barriere) erfolgten indirekt über Kraftfutter, das teilweise vom Schaf stammendes Tiermehl enthielt. In den 70er Jahren wurde in Großbritannien in vielen Anlagen zur Herstellung von Tiermehl eine neue Fettextraktionsmethode eingeführt, die mit Temperaturen unter 100° C arbeitete und auf die Verwendung von Natronlauge verzichtete (Ford, 1996). Diese Bedingungen reichten nicht mehr zur Inaktivierung des Scrapie-Erregers aus, der in Folge in infektiöser Form an Rinder verfüttert würde. Die erneute Verarbeitung der verendeten Rinder zu Tiermehl verursachte eine breite Streuung des verseuchten und nunmehr rinderpathogenen Futters. Eine weitere diskutierte Möglichkeit, wie die BSE-Epidemie ihren Anfang genommen haben könnte, ist die Verarbeitung von Rindern zu Tiermehl, die an einem spontanen Fall von BSE erkrankt waren. Mehr als 180.000 klinische BSE-Fälle wurden in Großbritannien bestätigt, Schätzungen gehen allerdings von etwa einer Million infizierter bzw. kranker Tiere aus (Anderson *et al.*, 1996). Das 1988 eingeführte Verbot der Verfütterung von Tiermehl führte zu einem drastischen Rückgang der Epidemie. In den 90er Jahren wurden auch einige BSE-Fälle aus anderen Ländern wie der Schweiz, Irland und Portugal bekannt. Das Auftreten von BSE z. B. bei deutschen Rindern, verursacht durch aus Großbritannien importiertes Futter, führte, gemäß den EU-Richtlinien von 2001, zu einer systematischen Untersuchung von älter als 30 Monate (EU) bzw. 24 Monate (Deutschland) altem Schlachtvieh mittels BSE-Tests. Bis heute hatten mehr als 300 BSE-Tests in Deutschland ein bestätigtes positives Ergebnis. Beunruhigend ist hierbei, dass die Zahl bestätigter positiver BSE-Tests in Deutschland im Jahr 2004 im Vergleich zum Vorjahr wieder ansteigend war (53 Fälle im ganzen Jahr 2003, 54 Fälle bis November 2004).

CWD tritt ausschließlich in Nordamerika und Kanada auf und wurde sowohl bei freilebenden als auch bei in Gefangenschaft gehaltenen Tieren beobachtet. Der natürliche Entstehungs- und Übertragungsweg ist nicht bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass es sich wie bei Scrapie um eine spontan auftretende Krankheit handeln könnte, die sich dann innerhalb einer Population verbreiten kann. Aufgrund von Erregerstammtypisierungen dürfte CWD eine eigene Entität darstellen (vergleiche auch Abschnitt 2.3.3. Spezies-Barriere und Prionen-Stämme).

2.2.2. Prion-Erkrankungen beim Menschen

Ätiologie	Krankheit	Ursache
Sporadisch (spontan) (endogen)	sCJD (sporadische CJD)	Spontane Konformationsänderung von PrP (?) Somatische Mutation von <i>PRNP</i> (?)
Genetisch-familiär (endogen)	fCJD (familiäre CJD) GSS (Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom) FFI (fatale familiäre Insomnie)	Keimbahn-Mutation von <i>PRNP</i>
Erworben (durch exogene Infektion)	Kuru iCJD (iatrogene CJD) vCJD	Ritueller Kannibalismus Operationsbesteck (EEG-Elektroden) Hirnhaut-, Hornhaut-Transplantationen Hormone aus Leichenhypophysen Verzehr von BSE-verseuchter Nahrung Bluttransfusionen

Tabelle 3: Ätiologische Einteilung der menschlichen Prion-Erkrankungen und die Ursachen ihrer Entstehung.

Gemäß ihrer Ätiologie lassen sich Prionkrankheiten beim Menschen in drei Gruppen einteilen: spontane (sporadische), genetisch-familiäre und erworbene Formen.

Rund 80 % - 90 % aller CJD Fälle sind idiopathisch und treten sporadisch (sCJD) mit einer Häufigkeit von etwa 0,3 – 1,3 Fälle/1 Million Einwohner pro Jahr auf. Als Ursache der Krankheit wird eine somatische Mutation des Prion Protein Gens (*PRNP*) oder eine spontane Konformationsänderung des Prion Protein (PrP) diskutiert, die in einer Art Kettenreaktion zu einer Umformung des normalen PrP^c zur infektiösen Form PrP^{Sc} führt. Zumeist tritt die Krankheit zwischen dem 45. und 75. Lebensjahr auf und führt nach etwa 3-6 Monaten zum Tod. Schlaflosigkeit, Müdigkeit, Depressionen, Gewichtsverlust, Kopf- und allgemeine Schmerzen sowie eine rasch fortschreitende

Demenz, dem fortschreitenden Verlust der Sprechfähigkeit bis hin zur völligen Hilflosigkeit sind charakteristische Symptome. Neurologisch lassen sich Myoklonien, Kleinhirnsymptomatik (Ataxie), pyramidale bzw. extrapyramidale und visuelle Symptomatik (zunehmende Sehschwäche) feststellen.

Die familiär-genetisch auftretenden Formen der Prion-Erkrankungen werden im Allgemeinen autosomal-dominant vererbt. Untersuchungen ergaben, dass pro 2,5 Millionen Einwohner in Deutschland eine Familie mit einer erblichen Prionkrankheit zu finden ist. Über 20 verschiedene pathogene *PRNP*-Mutationen konnten bislang identifiziert werden. Sie lassen sich in zwei Gruppen aufteilen: (a) Punktmutationen, die einen Aminosäureaustausch oder, in zwei Fällen, durch Generierung eines Stop-Codons die Entstehung eines verkürzten PrP zur Folge haben und (b) Insertionen innerhalb der N-terminalen Octarepeat-Region, die zu den fünf Tandem-Wiederholungen eines Octapeptids bis zu 9 zusätzliche Kopien hinzufügen (siehe Abbildung 2.2.2.1.). Es wird postuliert, dass diese Mutationen zu einer Destabilisierung des Prion Proteins führen, was eine spontane Veränderung der Konformation zur Folge haben kann (Owen *et al.*, 1989). Alternativ könnte eine Mutation die Interaktion zwischen PrP^c und PrP^{Sc} oder die Bindung zu einem noch nicht identifizierten Kofaktor der Konversion erleichtern (Collinge 2001) (siehe auch Abschnitt 2.5. Konversionsmodelle).

Rund 10 % aller CJD-Fälle sind genetisch vererbt (fCJD = familial CJD). Wie in der sporadischen Form von CJD bricht die Krankheit bei älteren Menschen aus und führt nach längerem Krankheitsverlauf zum Tod. Weitere genetisch vererbte Prionkrankheiten sind das Gerstman-Sträussler-Scheinker Syndrom (GSS) und die fatale (letale) familiäre Insomnie (FFI = fatal familial insomnia). GSS wurde erstmals 1936 von Josef Gerstmann, Erwin Sträussler und Isaak Scheinker beschrieben (Gerstmann *et al.*, 1936). Die am häufigsten vorliegende *PRNP* Mutation ist P102L. Andere GSS-assoziierte Mutationen betreffen die Codons 105, 117, 145, 198 und 217. Das Durchschnittsalter bei Ausbruch der Krankheit beträgt etwa 45 Jahre, unterliegt jedoch beträchtlichen Schwankungen (zwischen 25 und 59 Jahren). Ebenso schwankt die Krankheitsdauer zwischen 2 und 17 Jahren und liegt im Durchschnitt bei 6 – 7 Jahren. Es existieren zwei Formen von GSS. Der klassisch-ataktische Phänotyp beginnt mit einer spinal-ataktischen Symptomatik. Höhere Hirnleistungen sind erst später betroffen und drücken sich in Vergesslichkeit, herabgesetzten intellektuellen Leistungen bis hin zur schweren Demenz aus. Der dementielle Phänotyp verläuft, ähnlich wie CJD, meist deutlich rascher. 1981 konnte GSS experimentell auf Affen übertragen werden

und zählt seither zu den TSEs (Masters *et al.*, 1981). Die sehr seltene FFI ist die jüngste bekannte Prion-Erkrankung. Erstmals wurde sie 1986 in Italien beschrieben (Lugaresi *et al.* 1986). Sie wird durch die *PRNP* Mutation D178N in Zusammenhang mit einem Methionin an Codon 129 desselben Allels verursacht (siehe unten). Auch bei dieser Krankheit bestehen große Schwankungen im Alter der Patienten (20 – 60 Jahre) und der Krankheitsdauer (8 – 30 Monate). Ebenso sind die klinische und die neuropathologische Ausprägung sehr heterogen. Zumeist besteht eine charakteristische Störung im Schlaf-Wach-Rhythmus (Insomnie) neben anderen fortschreitenden neurologischen Defiziten. Die experimentelle Übertragung von FFI gelang 1995 (Tateishi *et al.*, 1995).

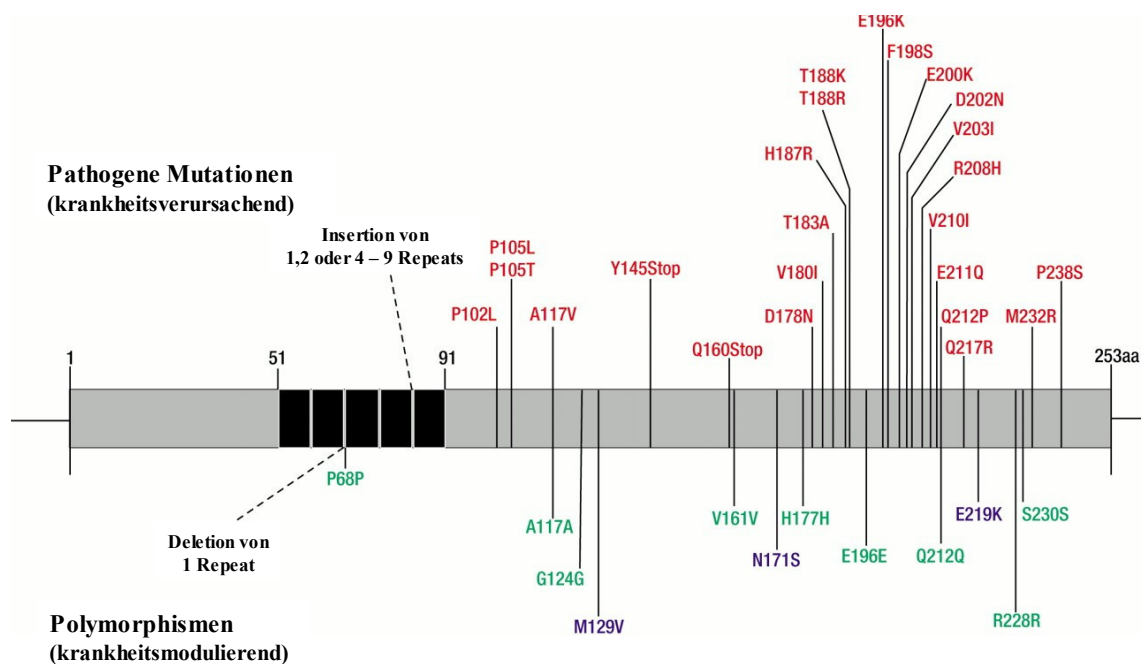


Abb. 2.2.2.1. Pathogene Mutationen und Polymorphismen des Prion Protein Gens (*PRNP*). Humane Sequenz von *PRNP*. Über der Sequenz stehen die Mutationen, die Krankheiten verursachen, darunter sind die Polymorphismen aufgelistet, von denen einige (blau markiert) die Empfänglichkeit für eine Prion-Erkrankung oder den Phänotyp einer bestehenden Prion-Erkrankung beeinflussen. Nach Collinge, 2001.

Schließlich wurden auch Polymorphismen im *PRNP* identifiziert. Von einigen konnte gezeigt werden, dass sie die Empfänglichkeit für eine Prion-Erkrankung oder auch den Phänotyp einer bestehenden Prion-Erkrankung beeinflussen können (siehe Abbildung 2.2.2.1.). Einen sehr wichtigen Polymorphismus stellt das Codon für die Aminosäure 129 dar, das beim Menschen entweder für Methionin oder für Valin kodiert. Dieses Codon nimmt eine Schlüsselposition in der genetischen Empfänglichkeit für erworbene und sporadische Prion-Erkrankungen ein, von denen die meisten in für dieses Codon

homozygoten Individuen vorkommen (Collinge *et al.*, 1991; Palmer *et al.*, 1991; Windl *et al.*, 1995). Der schützende Charakter der Heterozygotie an Codon 129 von *PRNP* kann auch bei einigen genetisch-familären Prionkrankheiten beobachtet werden (Baker *et al.*, 1991; Hsiao *et al.*, 1992). Zudem tritt das Erscheinungsbild der FFI nur dann auf, wenn an Codon 129 des die *PRNP*-Mutation D178N tragenden Allels ein Methionin kodiert ist. Steht an dieser Stelle ein Valin, so erkrankt der Patient an CJD. In der kaukasischen Bevölkerung sind ~50 % an Codon 129 Methionin/Valin heterozygot.

Obwohl die klassischen Prionkrankheiten durch Inokulierung experimentell auf Tiere übertragen werden können, ist keine „natürliche“ Übertragung auf Menschen durch familiären oder sexuellen Kontakt möglich. Die so genannten erworbenen Prion-Erkrankungen, Kuru, die iatrogene CJD (iCJD) und die neue Variante von CJD (vCJD) werden somit durch Ereignisse hervorgerufen, die einer experimentellen Inokulation sehr ähnlich sind. Die bei den Papuas durch Kannibalismus übertragene Kuru-Krankheit (kurz: Kuru), die erstmals 1957 detailliert beschrieben wurde, war in der Erforschung der erworbenen Prionkrankheiten besonders wichtig (Gajdusek & Zigas, 1957; Zigas & Gajdusek, 1957). Die Kuru-Epidemie, deren Entstehungszeitraum auf Anfang des 20. Jahrhunderts datiert wird, blieb immer auf Papua Neuguinea beschränkt. Selbst dort wurde sie nur beim Eingeborenenstamm der Fore und vereinzelt bei dessen Nachbarstämmen festgestellt. Dieses Volk verzehrte bei rituellen Begräbnissen verstorbene Stammesmitglieder in der Hoffnung, deren Geist würde so den Hinterbliebenen erhalten bleiben. Da hauptsächlich Frauen und Kinder an diesen kannibalistischen Zeremonien teilnahmen, bei denen vor allem Gehirn und innere Organe verzehrt wurden, waren sie auch am meisten von der Krankheit betroffen. Ihren Ursprung nahm die Krankheit wahrscheinlich, als ein Stammesangehöriger an sporadischer CJD erkrankte und nach seinem Ableben von den Angehörigen verzehrt wurde. Seit Mitte der 50er Jahre wurde der Kannibalismus in Papua Neuguinea verboten, was eine totale Unterbrechung der Kuru-Übertragungswege und das Ende der Epidemie zur Folge hatte. Die Inkubationszeit lässt sich nur sehr schwer bestimmen, da neben dem hauptsächlichlichen Übertragungsweg über die Nahrung auch die Infektion über Hautläsionen und die Bindehaut durch Kontakt mit kontaminiertem Gewebe bei der Zubereitung der rituellen Mahlzeiten vermutet wird (Alpers, 1987). Solche Übertragungen haben gegenüber der oralen Infektion eine verkürzte Inkubationszeit zur Folge, was das sehr seltene Auftreten von Kuru-Fällen bei Kindern von gerade einmal 4,5 Jahren erklären könnte. Das andere Extrem ist, dass mehr als 40 Jahre nach dem

Verbot immer noch vereinzelte Fälle von Kuru bei Stammesmitgliedern auftauchen, die an einer der letzten Zeremonien vor Inkrafttreten des Verbots teilgenommen hatten. Im Schnitt wird die mittlere Inkubationszeit von Kuru bei oraler Übertragung auf etwa 12 Jahre geschätzt (Collinge, 2001). Wie schon erwähnt, waren vor allem Frauen und Kinder im Alter von 5 – 60 Jahren betroffen. Das klinische Bild betrifft hauptsächlich das Kleinhirn und schlägt sich deshalb in rasch fortschreitender Ataxie nieder. Im Gegensatz zu CJD lässt sich anfangs zumeist keine Demenz feststellen (Alpers, 1987). Die Krankheit führt im Durchschnitt nach 12 Monaten zum Tod der Erkrankten, allerdings unterliegt die Krankheitsdauer erheblichen Schwankungen (3 Monate – 3 Jahre).

Die iatrogene CJD (iCJD) ist sehr selten und wird durch medizinische „Unfälle“ verursacht. 1968 wurde das erste Mal das Auftreten einer Übertragung von CJD bei einem neurochirurgischen Eingriff auf einen gesunden Menschen durch nicht adäquat dekontaminierte intracerebrale EEG-Elektroden dokumentiert. Die häufigsten Ursachen für die Verbreitung von iCJD sind die parenterale Verabreichung von kontaminierten Präparaten mit Wachstumshormon, das aus Leichenhypophysen extrahiert wurde, sowie die Transplantation von erregerehaltiger Hirnhaut und Augenhornhaut. Hierbei ist interessant, dass Fälle, die durch intracerebrale oder transokulare Inokulation verursacht wurden sich klinisch als CJD mit rasch fortschreitender Demenz niederschlagen, während die periphere Übertragung ein Krankheitsbild hervorruft, das an Kuru erinnert und hauptsächlich das Kleinhirn betrifft. Weltweit wurden bisher etwa 313 iatrogene Fälle bekannt. Je nach Übertragungsart liegt die mittlere Inkubationszeit bei intracerebraler Infektion zwischen 19 und 46 Monaten und bei peripherer Infektion bei etwa 15 Jahren. Kürzlich wurde zudem in zwei Fällen die Übertragung von vCJD auf Patienten über Bluttransfusionen, deren Spender kurze Zeit später an vCJD erkrankten und starben, berichtet (Llewelyn *et al.*, 2004; Peden *et al.*, 2004).

Die Bedenken, dass BSE auf Menschen übertragen werden könnte, führten dazu, dass nach dem Auftreten von BSE 1990 in Großbritannien die epidemiologische Überwachung der CJD verstärkt wurde. 1993 wurde in sechs europäischen Ländern (Großbritannien, Frankreich, Deutschland, Italien, den Niederlanden und der Slowakei) ein nationales bzw. internationales CJD-Überwachungsprogramm etabliert. Tatsächlich wurden 1995/1996 einige Fälle von CJD bei Teenagern und jungen Erwachsenen beobachtet. Bis Januar 2003 traten 140 Fälle auf, davon 130 in Großbritannien, 6 in Frankreich und je 1 Fall in Irland, Italien, den USA und Kanada. Im April 2004 waren

es insgesamt 146 Fälle. Das klinische Bild der anfangs als neue Variante von CJD, inzwischen einfach nur noch variante CJD bezeichneten Prion-Erkrankung unterscheidet sich stark von allen anderen bisher bekannten humanen Prionkrankheiten. Der auffälligste Unterschied liegt im Lebensalter der betroffenen Personen. Sind bei den klassischen Formen der Prion-Erkrankungen die Patienten bei Ausbruch der Krankheit 50 Jahre und älter, so tritt vCJD hauptsächlich bei jungen Menschen im Alter zwischen 16 und 51 Jahren (im Durchschnitt 29 Jahre) auf. Außerdem lässt sich eine Verlängerung des Krankheitsverlaufs auf 9 bis 35 Monate (durchschnittlich 14 Monate) beobachten. Anfangs tritt eine, gegenüber der sCJD verlängerte Phase mit psychiatrischen Symptomen auf. Der folgende Verlauf ähnelt dann dem der sCJD. In der Hälfte aller Fälle kommen schmerzhaft sensorische Symptome vor. Unwillkürliche Bewegungen sind ein Charakteristikum, Chorea und Dystonie ebenso wie Myoklonien kommen vor. Alle Patienten entwickeln eine Ataxie, gefolgt von einer progressiven Demenz, die in einem Zustand der Hilflosigkeit endet. Ein weiterer Unterschied zu klassischen Formen der CJD betrifft die histologische Pathologie. Zusätzlich zu den charakteristischen Veränderungen der CJD, wie spongiforme Veränderungen, astrozytäre Gliose und Nervenzellverlust, ist die vCJD neuropathologisch charakterisiert durch weit verbreitete Ablagerungen von charakteristischen amyloiden PrP Plaques, umgeben von kuru-ähnlichen spongiformen Vakuolen („florid“ Plaques) Die Veränderungen sind über die gesamte Groß- und Kleinhirnrinde weit verstreut, treten aber im Vergleich zur sCJD im Thalamus und in der Molekularschicht des Kleinhirns deutlicher auf. (Will *et al.*, 1996). Ein sehr wichtiger Unterschied stellt das Auftauchen von PrP^{Sc} in Tonsillen und sonstigen lymphoretikulären Geweben dar, das einzigartig für vCJD ist und sonst in keiner anderen menschlichen Prionkrankheit vorkommt (Collinge *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1999). Waren zunächst alle betroffenen Personen homozygot für Methionin am PRNP-Polymorphismus 129 (Collinge *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1999), so wurde kürzlich auch von einem präklinischen Fall berichtet, bei dem der Patient heterozygot war (Peden *et al.*, 2004). Daher lässt sich vermuten, dass dieser Polymorphismus auch hier die Inkubationszeit der Krankheit und wahrscheinlich auch den klinisch-pathologischen Phänotyp beeinflusst. Nur etwa 12 % der kaukasischen Bevölkerung sind an Codon 129 homozygot für Valin, 37 % homozygot für Methionin und 51 % Methionin/Valin heterozygot.

Zunächst basierte die Hypothese, dass BSE und vCJD kausal verbunden sind, hauptsächlich auf der Co-Lokalisierung in Großbritannien und der zeitliche Abfolge

ihres Auftretens. Diese Hypothese konnte inzwischen durch eine Reihe experimenteller Daten bestätigt werden. So sind die Verhältnisse zwischen den drei Glykosylierungsformen von PrP^{Sc}, anhand derer man Prion-Stämme voneinander unterscheiden kann, in BSE und vCJD gleich, unterscheiden sich aber deutlich von den Mustern, die bei den klassischen Formen von CJD oder Scrapie beobachtet werden (Collinge *et al.*, 1996b) (siehe auch Abschnitt 2.3.3. Spezies-Barriere und Prion-Stämme). Makaken, die mit BSE inokuliert wurden, wiesen einige Jahre nach der Inokulation ebenfalls neurologische Symptome auf. Bei der histologischen Untersuchung des Gehirns fand man Plaques, ähnlich derer, die auch in vCJD-Patienten vorkommen (Lasmézas *et al.*, 1996).

1989 wurde die Verwendung bestimmter Risiko-Gewebe aus geschlachteten Rindern für die Zubereitung von humanen Nahrungsmitteln verboten. Bis dahin war Rinderhirnhomogenat z. B. als Bindemittel für Lebensmittel, wie Hamburger, Würste etc, verwendet worden. Das bedeutet, dass die Möglichkeit besteht, dass bis zu diesem Zeitpunkt hochinfektiöses Material konsumiert wurde. Geht man davon aus, dass sich die bisher bekannten Fälle von vCJD vor dem Verbot infiziert hatten, dann liegt die kürzeste Inkubationszeit etwa bei 10 Jahren.

Jedoch ist es bislang sehr schwer, von den bisherigen Fällen an vCJD ausgehend, das Ausmaß einer möglichen vCJD-Epidemie abzuschätzen. Diesbezüglich gehen bestehende Statistiken und Berichte über die Anzahl an Personen, die in den nächsten Jahren an vCJD erkranken werden, weit auseinander und reichen von einigen Hunderten bis vielen Tausend Krankheitsfällen (Donnelly *et al.*, 2002; Ghani *et al.*, 2002).

2.3. Das Prion Protein

2.3.1. Die Genstruktur des Prion Proteins

Das Prion Protein Gen *PRNP* des Menschen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 20, das der Maus auf der homologen Region von Chromosom 2 (Robakis *et al.*, 1986; Sparkes *et al.*, 1986). Das Prion Protein ist in der Evolution hoch konserviert (Schätzl *et al.*, 1995; Wopfner *et al.*, 1999). Das dürfte auf eine wichtige Funktion des Proteins hinweisen.

Alle bekannten PrP-Gene bestehen aus einem oder zwei sehr kurzen Exons am 5'-Ende und einem Exon am 3'-Ende, das durch ein etwa 10 Kilobasen (kb) langes Intron von den 5'-seitigen Exons getrennt ist. Das letzte Exon enthält den kompletten Leserahmen (ORF) des Prion Proteins, der für ca. 250 Aminosäuren kodiert (Hsiao *et al.*, 1989; Gabriel *et al.*, 1992; Schätzl *et al.*, 1995). Somit besteht keine Möglichkeit der Bildung unterschiedlicher Proteine durch alternatives Splicen. Der Promotor von *PRNP* enthält keine TATA-Box und zeigt Ähnlichkeiten mit so genannten „Housekeeping-Genen“. Es liegen potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren der SP-Familie (z. B. SP1) und AP1 (McKnight & Tjian, 1986) vor, jedoch steht eine detaillierte Analyse der Regulierung noch weitgehend aus (Westaway *et al.*, 1987). Die vom PrP-Gen transkribierte mRNA ist 2,1 – 2,5 kb groß. Abbildung 2.3.1.1. zeigt den Aufbau des murinen *Prnp*.

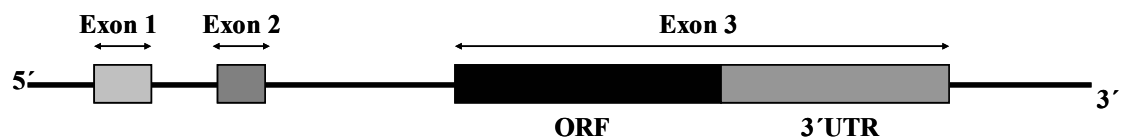


Abb. 2.3.1.1. Struktur des murinen PrP-Gens der Maus. Das Gen beinhaltet 3 Exons, wobei Exon 3 den kompletten Leserahmen (ORF) des Prion Proteins und den 3'untranslatierten Bereich (3'UTR) enthält.

Tierversuche zeigten, dass einige Mausstämme eine verlängerte Inkubationszeit bei Inokulation mit Prion-infiziertem Hirnhomogenat aufweisen. Untersuchungen ergaben, dass das murine PrP-Gen in zwei Allelen existiert (Maus PrP-A- und -B-Gen). PrP-A und PrP-B der Maus unterscheiden sich an zwei Aminosäurepositionen. Dieser Unterschied ist für die unterschiedlichen Inkubationszeiten verantwortlich (Carlson *et al.*, 1994). Zudem sind die murinen Allele auch in der Exon-Intron-Organisation unterschiedlich. So enthält das PrP-B-Gen eine 7 kb große Insertion im langen Intron (Westaway *et al.*, 1994).

Auf dem Gegenstrang der PrP-Gene befindet sich ein langer Antisense-Leserahmen, der sogar zwischen den Spezies konserviert ist (Rother *et al.*, 1997). Lediglich das PrP-Gen einiger Nager, des Nerzes (Kretzschmar *et al.*, 1992) und der meisten Vögel weist auf diesem Strang Stop-Codons auf. Allerdings wurde vom Antisense-ORF keine mRNA gefunden.

2.3.2. Die strukturellen Eigenschaften des Prion Proteins

Zahlreiche Daten unterstützen die Vorstellung, dass Prionen vor allem oder auch ausschließlich aus einer abnormen Isoform des zellulären Prion Protein PrP^c bestehen. Diese abnorme Isoform wurde PrP^{Sc} genannt. Das pathogene Protein stellt hierbei das Template dar, das eine posttranslationale Konformationsänderung bei PrP^c (Substrat) verursacht (Cohen *et al.*, 1994; Prusiner, 1997; Prusiner, 1998;).

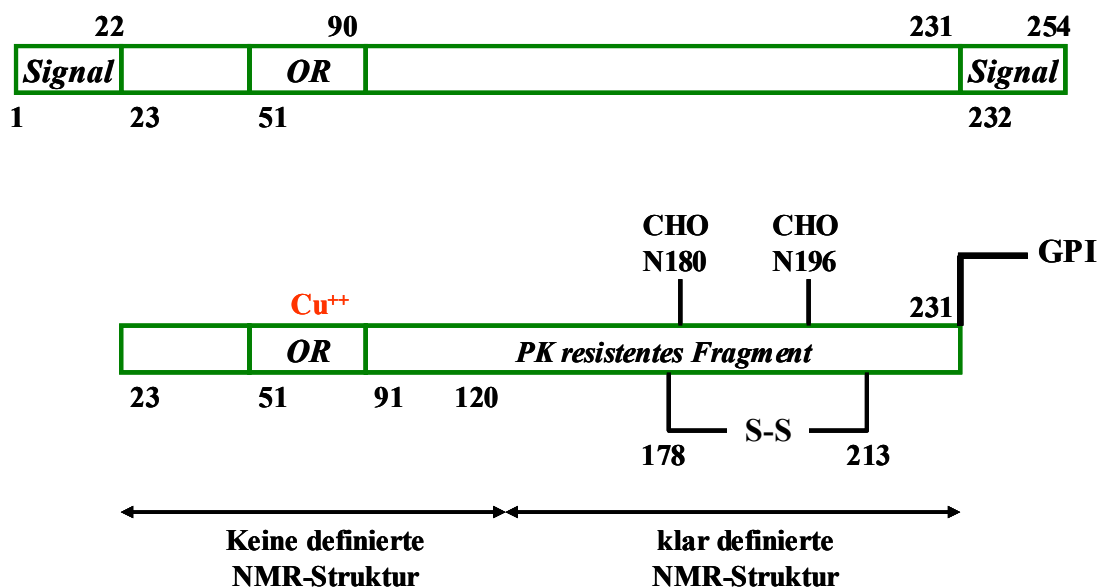


Abb. 2.3.2.1. Primärstruktur von Maus-PrP^c vor und nach der Reifung. Die N- und C-terminalen Signalpeptide werden vom primären Translationsprodukt abgespalten und ein Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol- (GPI-) Anker wird mit dem Protein verknüpft. Das Molekül kann zweimal N-glykosyliert werden (CHO). Zudem wird eine intramolekulare Disulfidbrücke (S-S) ausgebildet. Das Endprodukt besteht aus 209 Aminosäuren. Für den N-Terminus bis AS 120 konnte bislang noch keine definierte NMR-Struktur erhalten werden.

Bei der Translation der PrP-mRNA entsteht bei der Maus ein primäres Produkt aus 254 Aminosäuren, mit kurzen Signalpeptidsequenzen an N- und C-Terminus, die bei der Maturierung des Proteins entfernt werden. Die N-terminalen 22 Aminosäuren stellen das Signalpeptid für die Translation der Polypeptidkette in das raue endoplasmatische Retikulum dar (Oesch *et al.* 1985). Das Signalpeptid am C-Terminus führt zur Anheftung eines Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol- (GPI-) Ankers an Ser231 des Prion Proteins, durch den es mit der äußeren Plasmamembran verknüpft wird (Stahl *et al.*, 1987). Die beiden vorhandenen Asparaginreste an Codon 180 und 196 können im weiteren Maturierungsprozess glykosyliert werden (Bolton *et al.*, 1985; Manuelidis *et al.*, 1985). Dadurch entsteht einfach- doppelt- und nicht-glykosyliertes PrP, was im

SDS-Gel zu einem typischen Drei-Banden-Muster führt. Die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten an den Positionen 178 und 213 trägt zur Stabilisierung der Konformation von PrP bei (Hope *et al.*, 1986). Nach Abspaltung beider Signalpeptide weist das fertige Prion Protein eine Länge von 209 Aminosäuren auf.

Richtig gefaltetes PrP^c gelangt durch den Golgi-Apparat über den sekretorischen Weg an die äußere Plasmamembran, wo es über einen GPI-Anker mit dieser verknüpft ist (Borchelt *et al.*, 1990; Taraboulos *et al.*, 1990; Caughey, 1991).

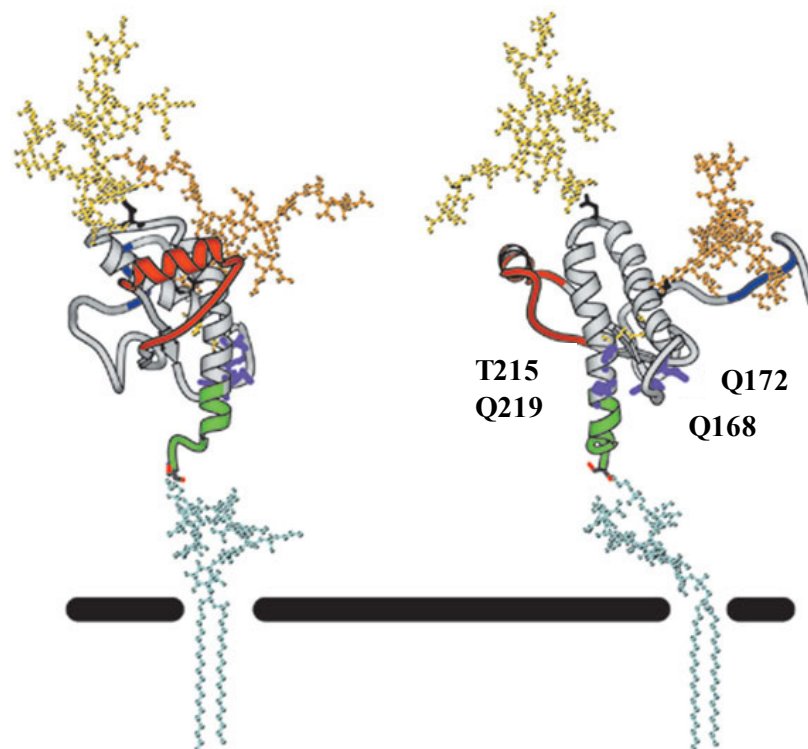


Abb. 2.3.2.2. NMR-Struktur von Maus-PrP^c an der Zelloberfläche. Die Struktur von PrP^c wie sie über einen GPI-Anker in der äußeren Plasmamembran verankert ist. Die Glykosylgruppen sind gelb gezeichnet. Die Aminosäuren, die die vorgeschlagene Bindungsstelle eines postulierten Ko-Faktors der Konversion (Faktor „X“) ausbilden sollen, sind in lila gezeichnet (aus Peretz *et al.*, 2001).

Es wird vermutet, dass die Internalisierung von PrP^c entweder über Caveolae-ähnliche Domänen oder in Rafts, spezielle Membranregionen oder Einstülpungen der Plasmamembran, die sehr reichhaltig an Cholesterol und Glykosphingolipiden sind, stattfindet (Taraboulos *et al.*, 1995). Von den Endosomen kann PrP^c entweder zurück an die Plasmamembran geführt („Recycling“) werden (Vey *et al.*, 1996), oder es wird zum Abbau in Lysosomen geleitet.

Die Lokalisierung von PrP^c an der Zelloberfläche ist absolut essentiell für eine folgende Konversion in PrP^{Sc} (Borchelt *et al.*, 1990; Taraboulos *et al.*, 1990; Caughey &

Raymond, 1991; Caughey, 1991). Durch die Behandlung Prion-infizierter Zellen mit der Substanz Suramin, die eine Aggregation von PrP^c im Trans-Golgi-Netzwerk und damit eine Reduktion von PrP^c an der Zelloberfläche hervorruft, konnte innerhalb weniger Tage eine Abnahme von PrP^{Sc} beobachtet werden (Gilch *et al.*, 2001). Derzeit scheinen alle Untersuchungen darauf hinzuweisen, dass die Konversion entweder direkt an der Plasmamembran, in Caveolae-ähnlichen Domänen oder Rafts, oder in den frühen Kompartimenten des endozytotischen Wegs stattfindet (Borchelt *et al.*, 1992; Naslavsky *et al.*, 1997; Nunziante *et al.*, 2003). Nach der Konversion gelangt PrP^{Sc} in die Lysosomen. Dort bildet es sehr protease-resistente Aggregate und wird nur sehr langsam von der Zelle abgebaut.

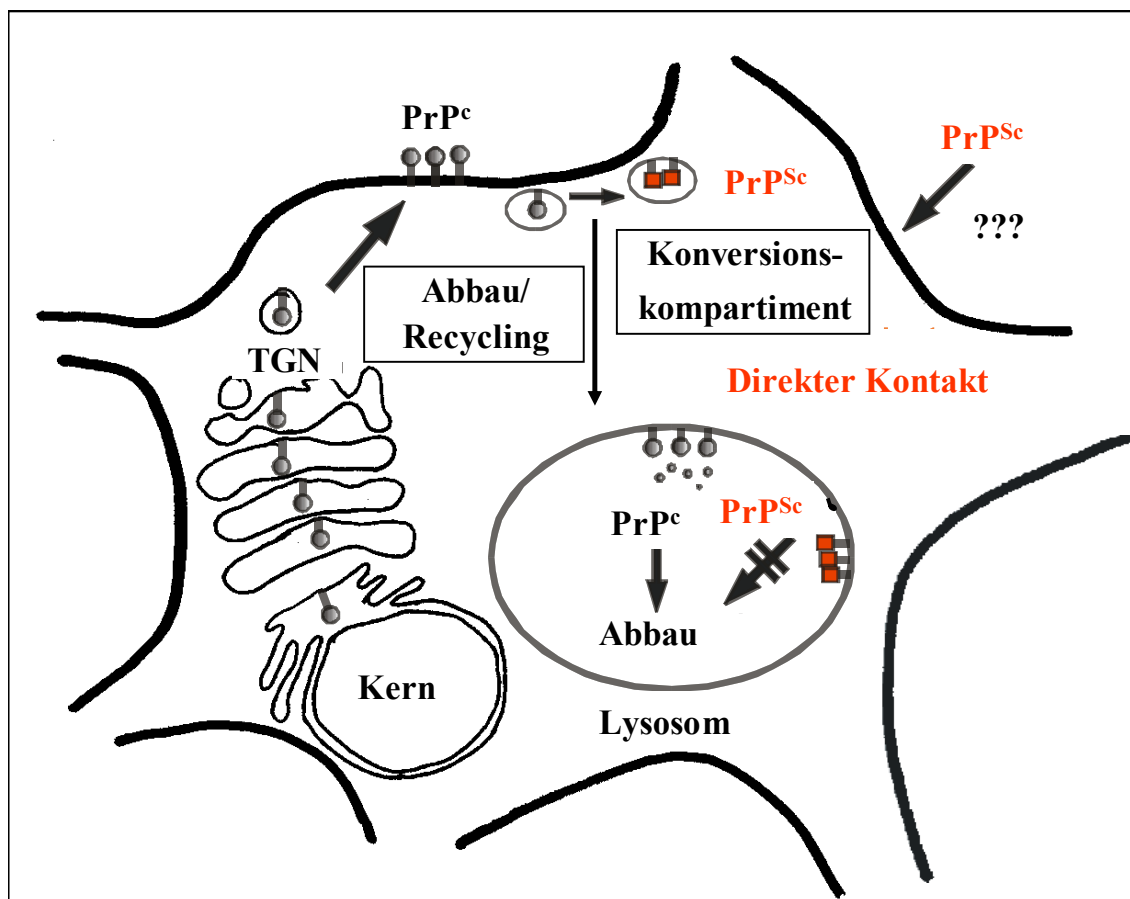


Abb. 2.3.2.3. Der Lebens-Zyklus von PrP^c und PrP^{Sc} in der Zelle. Nach seiner Translation in das raue endoplasmatische Retikulum, wird PrP^c über den Golgi-Apparat und den sekretorischen Weg zur Plasmamembran transportiert, wo es über einen GPI-Anker mit der äußeren Membran verknüpft ist. Es ist in Cholesterin-reichen Membrandomänen lokalisiert. Von dort wird es internalisiert und entweder zurück an die Plasmamembran oder zum Abbau in Lysosomen geleitet. Die Konversion von PrP^c zu PrP^{Sc} findet wahrscheinlich direkt an der Plasmamembran oder in den frühen Kompartimenten der Endozytose statt. Unabdingbar ist hierbei der direkte Kontakt zwischen PrP^c und PrP^{Sc}. PrP^{Sc} akkumuliert in den Lysosomen und wird nur sehr langsam von der Zelle abgebaut.

2.3.3. Die Konformation von PrP^c und PrP^{Sc}

Die „Protein-only“-Hypothese

Die allgemein anerkannte „Protein-only“-Hypothese besagt, dass das Prion Protein in seiner pathogenen Form PrP^{Sc} den alleinigen Bestandteil des infektiösen Agens von Prionkrankheiten bei Mensch und Tier darstellt (Prusiner, 1982; Prusiner *et al.*, 1984; Prusiner *et al.*, 1987; Prusiner, 1997; Prusiner, 1998). Gemäß der Prion-Hypothese weist PrP^{Sc} eine abnorme, oligomere Form des körpereigenen, zellulären Prion Proteins (PrP^c) auf (Prusiner, 1982). Die grundlegende Annahme dieser Hypothese besteht darin, dass PrP^c und PrP^{Sc} in ihrer Primärstruktur identisch sind, sich ausschließlich in ihrer Konformation unterscheiden und dass PrP^{Sc} repliziert wird, indem es dem monomeren PrP^c *in vivo* seine eigene Struktur aufzwingt (Cohen *et al.*, 1994).

Dieses Modell steht jedoch im apparenten Widerspruch zu einem zentralen Dogma der Proteinforschung, wonach jedes Protein nur eine einzigartige Raumstruktur einnimmt (Anfinsen, 1973). Dennoch, als aufgereinigte PrP^c und PrP^{Sc}-Moleküle isoliert und deren Sekundärstruktur mittels optischer Spektroskopie untersucht wurden, konnte gezeigt werden, dass diese beiden Isoformen, trotz identischer Aminosäuresequenz, unterschiedliche Konformationen einnahmen (Pan *et al.*, 1993). Das Modell der „Protein-only“-Hypothese wird von den meisten Forschern favorisiert. Seit den 90er Jahren war es möglich, PrP^c im Reagenzglas durch Vermischen mit PrP^{Sc} in die Konformation von PrP^{Sc} umzuwandeln (*in vitro* Konversion) (Koscisko *et al.*, 1994). Allerdings konnte erst kürzlich durch den Nachweis von Infektiosität solcher *in vitro* generierten PrP^{Sc}-Moleküle der letzte, bislang noch fehlende, endgültige Beweis der „Protein-only“-Hypothese erbracht werden (Legname *et al.* 2004).

Die Struktur von PrP^c und PrP^{Sc}

Durch die Identifizierung des Leserahmens von PrP^c wurden Vorhersagen über die Sekundärstruktur des Prion Proteins möglich. Für den N-terminalen Bereich von PrP bis Aminosäure (AS) 120 ließ sich keine definierte Struktur vorhersagen. Für den C-Terminus konnten vier α -helikale Bereiche und einige sehr kurze β -Faltblatt-Strukturen errechnet werden (Huang *et al.*, 1994). Mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) (Caughey *et al.*, 1991; Gasset *et al.*, 1993; Pan *et al.*,

1993), Massenspektroskopie (Stahl *et al.*, 1993) sowie Zirkulardichroismus (CD) konnte schließlich gezeigt werden, dass PrP^c zu etwa 42 % aus α -Helices besteht, während der Anteil an β -Faltblatt-Strukturen nur etwa 3 % beträgt. Im Gegensatz dazu wird die Konformation von PrP^{Sc} zu etwa 30 % von α -Helices und zu 45 % von β -Faltblatt-Strukturen ausgebildet (Pan *et al.*, 1993; Gasset *et al.*, 1993; Pergami *et al.*, 1996). Bislang ist noch keine 3-D-Kristallisierung von PrP^c oder PrP^{Sc} gelungen, so dass zur Zeit nur Modelle der dreidimensionalen Strukturen und keine kristallographischen Analysen existieren. Durch die Expression eines Fragmentes von rekombinantem Maus Prion Protein (AS 121 – 231) in *E. coli* konnte nach Aufreinigung und Rückfaltung dessen Struktur mittels Kernresonanz-Spektroskopie (NMR) aufgeklärt werden (Riek *et al.*, 1996). Damit konnten die durch Computerprogramme errechneten beiden antiparallelen β -Faltblatt-Strukturen und drei der vier α -Helices (AS 144 – 154, 175 – 193, 200 – 219) weitgehend bestätigt werden (Cohen *et al.*, 1994) (Abb. 2.3.3.1.A). Schließlich gelang es auch, die Tertiärstruktur des gesamten Proteins (AS 23 – 231) zu charakterisieren (Riek *et al.*, 1997). Die Struktur des C-Terminus wurde dabei bestätigt, während für den N-Terminus bis AS 120 keine definierte Struktur nachgewiesen werden konnte. Daher geht man davon aus, dass dieser Bereich von PrP^c sehr flexibel ist. Der N-Terminus von PrP der meisten bekannten Spezies enthält eine Region, die aus Wiederholungen von 8 Aminosäuren („Octarepeats“), vor allem den Aminosäuren Prolin, Glycin und je ein Histidin, besteht. Das Prion Protein der meisten Säugetiere hat in diesem Bereich fünf dieser Octarepeats (in der Maus zwischen AS 51 und 90). Durch Bindung dieser Region *in vivo* an Metall-Ionen oder andere mögliche Liganden besteht somit dennoch die Möglichkeit, dass der N-Terminus *in vivo* eine definierte globuläre Struktur einnehmen kann. Kürzliche Untersuchungen weisen auf die Existenz einer poly-L-Proline Typ II Helix Struktur (PPII-Helix) in der *in vivo* Konformation des Prion Proteins hin (Gill *et al.*, 2000). Von PrP^{Sc} konnte bislang noch keine NMR-Struktur erstellt werden, allerdings eine auf Computerberechnungen basierende Modellvorstellung ist in Abbildung 2.3.3.1.B zu sehen.

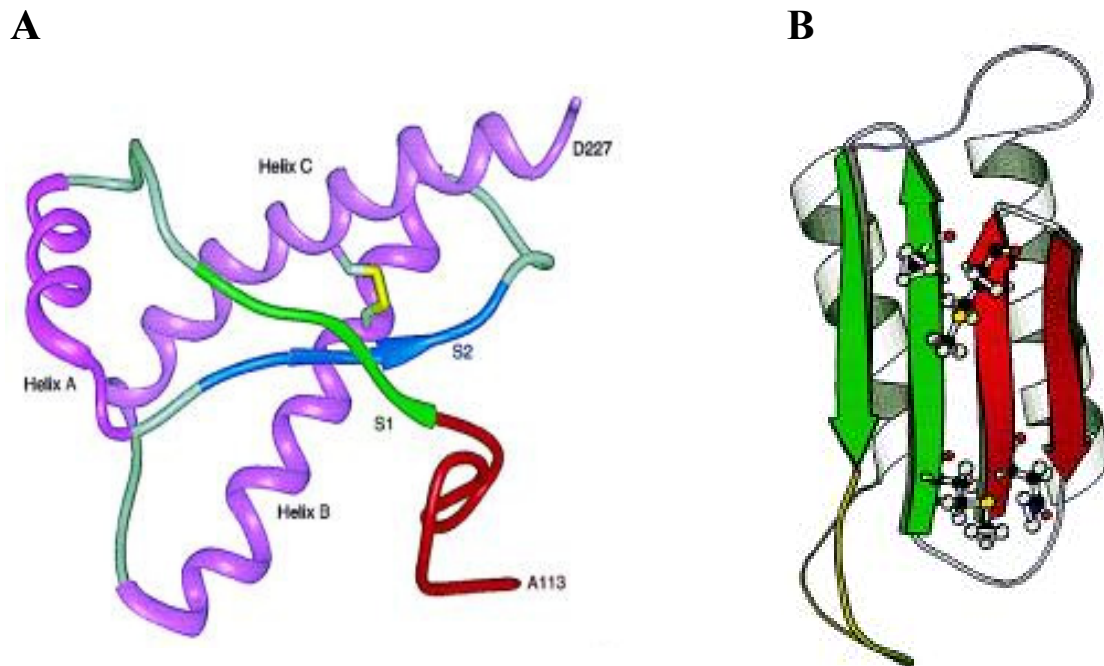


Abb. 2.3.3.1. Vorgeschlagene NMR Struktur von PrP^c und PrP^{Sc}. (A) Darstellung von rekombinatem Hamster PrP^c (113–231) von der Seite, von der angenommen wird, dass sie an PrP^{Sc} bindet (AS 90–112 sind nicht dargestellt). Die drei α -Helices sind in lila gezeichnet: Helix A (AS 144–157), Helix B (AS 172–193) und Helix C (AS 200–227). (B) Modellvorstellung der β -Faltblatt-Struktur von humanem PrP^{Sc}. (Nach Prusiner, 1998)

Kürzlich gelang es jedoch mittels Elektronenkristallographie 2-D-Kristalle von PrP^{Sc} (PrP 27-30) zu erhalten. Zudem wurden auch fibrilläre „prion rods“ erhalten, was zur Vermutung führte, dass die 2D-Kristalle die Bausteine zur Ausbildung höherer Aggregate darstellten (Wille *et al.*, 2002). Die Analyse ergab für die Kristalle eine Konformation mit dreifacher Symmetrie. Gebildet werden diese Kristalle von PrP^{Sc}-Trimeren. Infolge von Computer-Berechnungen und Strukturvergleichen wurde vorgeschlagen, dass die Struktur von PrP^{Sc} durch parallele β -Helices gebildet wird. In diesem Modell nimmt der flexible Bereich von PrP (AS 89 – 175) die Konformation eines linksgängigen, β -helikalen Faltblatts ein. Drei dieser Moleküle lagern sich zu einem Trimer zusammen und bilden eine Scheibenstruktur aus. Diese Scheiben können sich wiederum zur Ausbildung von fibrillären Strukturen („prion rods“) aneinander lagern. In einem solchen Trimer liegen die β -Helices der drei Moleküle im Zentrum, während die beiden C-terminalen α -Helices nach außen ragen (Govaerts *et al.*, 2004).

Abbildung 2.3.3.2. zeigt die vorgeschlagene Struktur von PrP^{Sc}, die postulierte trimere Form (A – C) und eine Modellvorstellung der Aneinanderlagerung mehrerer Trimere zu „prion rods“ (D + E).

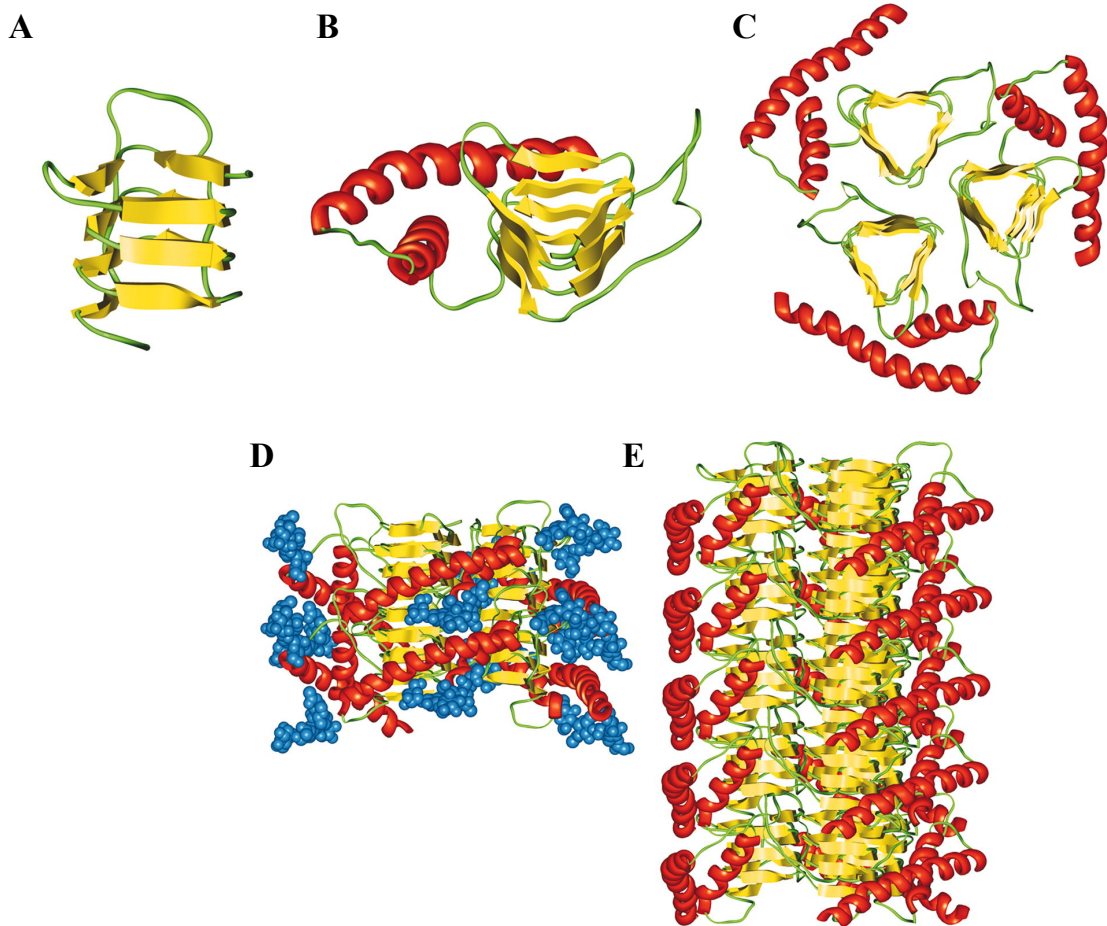


Abb. 2.3.3.2. Vorgeschlagene Struktur von PrP^{Sc} und eine Modellvorstellung über die Ausbildung von „prion rods“. (A) Der N-terminale Teil von PrP^{Sc} (AS 89–143) bildet ein linksgängiges β -helikales Faltblatt aus. (B) Modellvorstellung der Struktur eines PrP^{Sc}-Monomers. Die mittels NMR bestimmte α -helikale Region (AS 177–227) wurde mit dem β -helikalen Modell aus (A) verbunden. (C) Durch Strukturvergleiche und Computerberechnungen erstelltes trimeres Modell von PrP^{Sc}. (D) Zwei Scheiben (PrP^{Sc}-Trimer) können sich über die polaren Wechselwirkungen zwischen der oberen Windung der β -Helix der unteren Scheibe und der unteren Windung der β -Helix der oberen Scheibe aneinanderlagern. Somit steht an der Außenseite der Struktur genug Raum für die α -Helices und die Glykosylgruppen zur Verfügung. (E) Modellvorstellung für die Zusammenlagerung mehrerer PrP^{Sc}-Trimere zu einer PrP^{Sc}-Fibrille („prion rod“). Der Übersichtlichkeit halber wurden die Glykosylgruppen hier weggelassen. (aus Govaerts *et al.*, 2004).

Spezies-Barriere und Prion-Stämme

Inzwischen zeigten NMR-Studien an rekombinatem Hamster- (Donne *et al.*, 1997), Mensch- (Zahn *et al.*, 2000) und Rinder-PrP (Lopez Garcia *et al.*, 2000), dass es neben geringen Abweichungen in der Länge der α -Helices keinen prinzipiellen Unterschied zwischen den Prion Proteinen bekannter Säuger-Spezies gibt. Bei der experimentellen Übertragung von Prionkrankheiten von einer Spezies auf eine andere konnte eine Verlängerung der Inkubationszeit beobachtet werden, die beim erneuten Übertragen auf dieselbe Spezies (Passagieren) wiederum verkürzt wurde. Als Ursache für diese erschwerte zwischenartliche Übertragbarkeit wurde in den 60er Jahren die Existenz einer „Spezies-Barriere“ postuliert (Pattison & Jones, 1968). Diese Spezies-Barriere konnte durch viele Experimente in Tierversuchen mit transgenen Mäusen bestätigt werden. Die Aminosäure-Ähnlichkeit der Prion Proteine (PrP-Aminosäuresequenzhomologie) von Donor- und Empfänger-Arten wird als die Hauptdeterminante bei der Kodierung der Spezies-Barriere gesehen (Prusiner, 1997; Schätzl *et al.*, 1995; Scott *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 1993). Dabei gilt als grobe Richtlinie, dass die Spezies-Barriere klein ist, wenn die PrPs zweier Arten sehr ähnlich sind, wie z.B. von Schaf und Rind. Sind die Prion Proteine sehr unterschiedlich wie z.B. vom syrischen Hamster und von der Maus, ist die Spezies-Barriere groß. Diese Richtlinie konnte mit chimären Prion Proteinen in transgenen Mäusen bestätigt werden (Scott *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 1993; Telling *et al.*, 1994; Telling *et al.*, 1995). Welche PrP-Bereiche hauptsächlich für die Spezies-Barriere verantwortlich sind, ist bisher noch nicht ganz klar. Aufgrund von Analysen an Primaten und Nagetieren scheint der Bereich um AS 112 wichtig zu sein (Schätzl *et al.*, 1995). Studien mit transgenen Tieren deuten auf den C-Terminus hin. In diesem Bereich liegt auch die vorgeschlagene Bindungsstelle (Kaneko *et al.*, 1997) des für die Konversion postulierten Ko-Faktors Faktor „X“ (Telling *et al.*, 1994; Telling *et al.*, 1995) (AS 168, 172, 215, 219; siehe auch Abbildung 2.3.2.2.).

Durch die Aufreinigung von PrP^{Sc}-Isolaten aus verschiedenen natürlich vorkommenden Prion-Erkrankungen bei Mensch und Tier konnte die Existenz verschiedener Prion-Stämme („Strains“) gezeigt werden. Solche Stämme unterscheiden sich sowohl in ihren biologischen als auch ihren biochemischen Eigenschaften voneinander. Bei experimenteller Inokulation weisen die verursachten Erkrankungen unterschiedliche Inkubationszeiten und unterschiedliche neuropathologische Veränderungen auf. Des

Weiteren zeigt das elektrophoretische Auftrennungs-Profil auf einem SDS-Polyacrylamidgel Proteinase K-verdauter Isolate verschiedener Stämme deutliche Unterschiede. Diese Unterschiede betreffen sowohl die Fragmentgröße, als auch das Verhältnis der drei glykosylierten Formen untereinander (einfach-, zweifach- und nicht-glykosyliert) (siehe unten). So konnten beispielsweise verschiedene humane Prion-Stämme isoliert werden, die jeweils ein unterschiedliches Erscheinungsbild der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung hervorriefen (Parchi *et al.*, 1996; Collinge *et al.*, 1996b). Die biologischen und biochemischen Eigenschaften eines Prion-Stammes bleiben auch nach dem Passagieren in eine andere Spezies erhalten. Das bedeutet, dass unterschiedliche Konformationen von PrP^{Sc} existieren, die für die verschiedenen Stämme kodieren (Telling *et al.*, 1996). Im Menschen wurden abhängig von der verwendeten Nomenklatur, bislang aus Fällen sporadischer und iatrogenen CJD drei Stämme und ein vierter Stamm aus allen bekannten vCJD-Fällen beschrieben.

Der experimentelle Nachweis von PrP^c und PrP^{Sc}

In Prion-infizierten Geweben bzw. Zellen liegen stets beide Isoformen des Prion Proteins vor. Da die herkömmlichen Antikörper stets beide Isoformen erkennen, wurden verschiedene Methoden etabliert, die es erlauben, in Gewebe-Homogenaten bzw. Zell-Lysaten vorhandenes PrP^c und PrP^{Sc} voneinander zu unterscheiden. Dabei macht man sich die unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften der beiden Isoformen, die bereits in Abschnitt 2.1. erwähnt wurden und in Tabelle 1 zusammengefasst sind, zunutze. Die gängigsten Methoden sind der Verdau mit Proteinase K mit anschließendem Western Blot oder Immunpräzipitation, der Löslichkeits-Assay und der Indikator-Tierversuch. Beim Verdau von Prion-infizierten Hirn-Homogenaten bzw. Zell-Lysaten mit Proteinase K (PK) wird das PK-sensitive PrP^c vollständig degradiert. PrP^{Sc} hingegen ist (relativ) resistent gegenüber proteolytischem Verdau (Prusiner, 1998; Collinge, 2001; Weismann *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 1994) und bleibt demnach im Homogenat/Lysat erhalten. Im anschließenden Western Blot lässt sich somit nach PK-Verdau kein PrP^c, sondern nur noch PrP^{Sc} nachweisen. In Abbildung 2.3.3.2.A ist ein Schema eines Western Blots von Zell-Lysat dargestellt. In nicht-infizierten Zellen sind im unverdauten Lysat nur die typischen Banden von PrP^c bei den Molekulargewichten ~25 kDa, ~30 kDa und ~35 kDa zu sehen, die die nicht-glykosylierte, die einfach- und die zweifach-glykosylierte Form von PrP^c repräsentieren. Nach PK-Verdau ist in dem

Lysat kein PrP^c mehr nachweisbar. Im nicht-PK-verdauten Lysat Prion-infizierter Zellen sind beide Isoformen vorhanden. Somit sieht man hier eine Mischung aus PrP^c und PrP^{Sc}, wobei die Signale für PrP^{Sc} gegenüber denen von PrP^c nach unten verschoben sind, so dass mehr als 3 Banden zu detektieren sind. Das wird dadurch verursacht, dass die Zellen in der Lage sind, PrP^{Sc} anzudauen. D.h. zelluläre Proteasen dauern den N-Terminus (~ AS 23-90) von PrP^{Sc} an, so dass N-terminal trunkiertes PrP^{Sc} übrig bleibt, dessen drei Banden dann im SDS-Polyacrylamidgel auf einer Höhe von 19 kDa (nicht-glykosyliert), 25 kDa (einfach-glykosyliert) und 27 - 30 kDa (zweifach-glykosyliert) laufen. Im Western Blot überlagern sich die Signale für PrP^c und PrP^{Sc}, so dass in der Regel 4 Banden detektierbar sind. Wird dieses Lysat mit PK verdaut, so bleibt nur noch das PK-resistente PrP^{Sc} übrig (3 Banden). Der Proteinase K-Verdau wird mit Konzentrationen zwischen 20 und 40 µg/ml für 30 – 60 Minuten bei 37° C durchgeführt. Eine weitere Möglichkeit, PrP^c von PrP^{Sc} zu unterscheiden und auch räumlich voneinander zu separieren, ist der Löslichkeits-Assay, der sich der unterschiedlichen Löslichkeit von PrP^c und PrP^{Sc} in nicht-ionischen Detergenzien bedient. Wird ein Lysat Prion-infizierter Zellen mit 1 % Sarkosyl versetzt und für eine Stunde bei 100.000 g zentrifugiert, so bleibt das lösliche PrP^c im Überstand, während das nicht-lösliche PrP^{Sc} im Bodensatz des Reaktionsgefäßes aggregiert (Prusiner, 1998; Collinge, 2001; Weismann *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 1994). Somit kann man beide Isoformen voneinander trennen und nachweisen (Abbildung 2.3.3.2. B). Im Indikator-Tierversuch lässt sich die Infektiosität Prion-infizierter Gewebe bzw. Zellen nachweisen (Abbildung 2.3.3.2.C). Hierfür werden Mäuse mit dem zu testenden Homogenat bzw. Lysat inokuliert und die Inkubationszeit bis zum Ausbruch der Krankheit bzw. den Tod des Tieres gemessen. Die Inokulation kann hierbei intracerebral oder intraperitoneal entweder in Wildtyp-Mäusen, in transgenen Mäusen, die PrP überexprimieren, oder in Hamstern erfolgen.

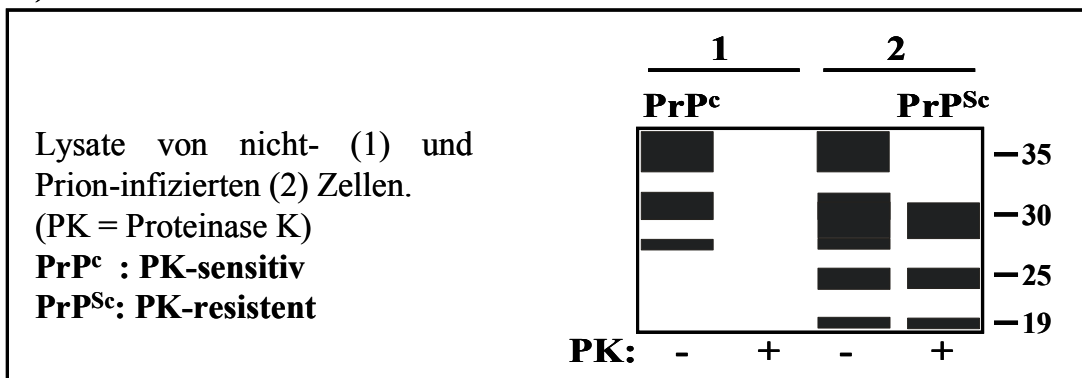
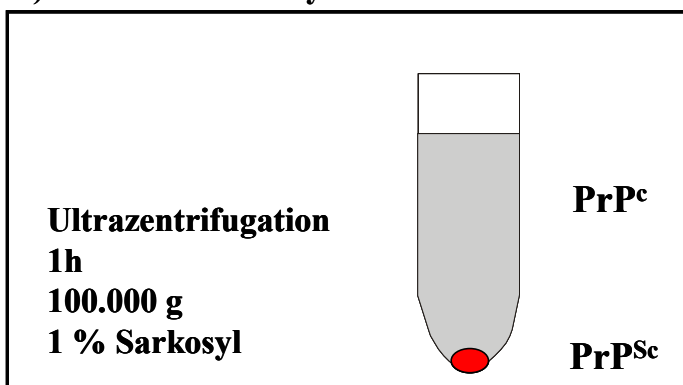
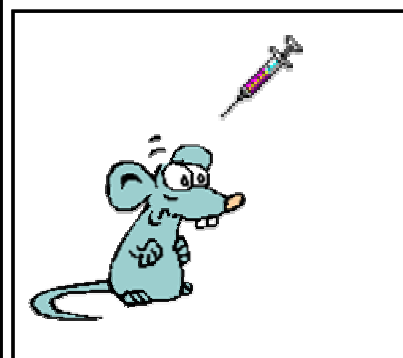
A) Proteinase K-Verdau**B) Löslichkeits-Assay****C) Indikator-Tierversuch in Mäusen oder Hamstern**

Abb. 2.3.3.2. Möglichkeiten der experimentellen Unterscheidung zwischen PrP^c und PrP^{Sc}.
(A) Proteinase K (PK)-Verdau: Schema eines Western Blots des Nachweises über die unterschiedliche PK-Resistenz von PrP^c und PrP^{Sc}. Dargestellt ist das typische 3-Bandenmuster für PrP, hervorgerufen von der nicht-, der einfach- und der zweifach-glykosylierten Form. (B) Löslichkeitsassay: Unterscheidung über das unterschiedliche Lösungsverhalten von PrP^c und PrP^{Sc} in nicht-ionischen Detergenzien. (C) Indikator-Tierversuch: Nachweis der Infektiosität von PrP durch Inokulation in Mäusen oder Hamstern.

2.4. Physiologische Funktionen des Prion Proteins

Das Prion Protein wurde in Säugetieren, Vögeln (Harris *et al.*, 1993; Wopfner *et al.* 1995), Beuteltieren (Windl *et al.*, 1995), Amphibien (Strumbo *et al.*, 2001) und Fischen (Oidtmann *et al.*, 2003) identifiziert. Die höchste Konzentration an PrP^c besteht in Neuronen (Kretschmar *et al.*, 1986), insbesondere an deren synaptischen Enden (Fournier *et al.*, 1995), wohin das Protein über axonalen Transport gelangt (Borchelt *et al.*, 1994). Am meisten kann PrP^c in den prä-synaptischen Bereichen gefunden werden

(Herms *et al.*, 1999). Obwohl das höchste Expressionslevel von PrP^c im zentralen Nervensystem (ZNS) vorliegt, wird PrP^c in den meisten Geweben detektiert und wird insbesondere auch von Zellen des Immunsystems exprimiert (Dodelet & Cashman, 1998).

Die genaue physiologische Funktion von PrP^c konnte bislang noch nicht geklärt werden. Der Knockout von *Prnp* in Mäusen ergab keinen nennenswerten Phänotyp (Bueler *et al.*, 1992). Jedoch waren diese Tiere völlig resistent gegenüber einer Infektion mit PrP^{Sc} und erkrankten im Gegensatz zu den Wildtyp-Kontroll-Mäusen nicht nach erfolgter Inokulation mit Prion-infiziertem Hirnhomogenat. (Bueler *et al.*, 1993). Allerdings konnten später einige neurologische Abnormalitäten in den Knockout-Tieren festgestellt werden. So wurde von Veränderungen in der synaptischen Übertragung nach repetitiver Stimulation (Collinge *et al.*, 1994), in der Kinetik der inhibitorischen postsynaptischen Ströme (Collinge *et al.*, 1994) sowie im zirkadianen Rhythmus und im Schlafverhalten (Tobler *et al.*, 1996) berichtet. Später konnte zudem eine Störung des späten Posthyperpolarisationsstroms in PrP^(0/0)-Mäusen nachgewiesen werden (Colling *et al.*, 1996). Als Ursache dafür wurde eine verminderte Leitfähigkeit Kalziumaktivierter Kaliumkanäle angenommen, die wahrscheinlich durch eine gestörte intrazelluläre Kalziumhomöostase bedingt ist (Colling *et al.*, 1996).

Einige Analysen deuten darauf hin, dass das Prion Protein eine Rolle im Kupfer-Metabolismus spielt. Dies basiert auf der Tatsache, dass PrP in der Lage ist, Kupferionen zu binden (Hornshaw *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1997a; Pauly & Harris, 1998). An der Kupferbindung ist der Octarepeat-Bereich am N-Terminus maßgeblich beteiligt (Stockel *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an Kupferionen in Zellmembranen aus PrP^(0/0)-Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen um 50 % (Leber) bzw. um 90 % (Gehirn) reduziert ist (Brown *et al.*, 1997b). In diesen Mäusen konnte zudem eine gesteigerte Sensitivität von Neuronen gegenüber oxidativem Stress (Brown *et al.*, 1997b; Pauly & Harris, 1998), eine geringere Konzentration an Kupferionen an synaptischen Membranen und eine reduzierte Cu/Zn Superoxid-Dismutase- (SOD-) Aktivität festgestellt werden. Daher wird für PrP eine SOD-Aktivität oder eine Transporterfunktion für die Aufnahme von Metallionen aus dem synaptischen Spalt und deren Transport in die Zelle diskutiert (Brown *et al.*, 1997a, Brown *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2000). Diese Hypothese konnte allerdings nicht *in vivo* in transgenen Mäusen bestätigt werden. Somit bleibt eine Beteiligung von PrP^c an der gesamten Superoxid-Dismutase-Aktivität der Zelle fraglich (Hutter *et al.*, 2003).

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass PrP^c eine Funktion als Rezeptor für einen bislang nicht identifizierten extrazellulären Liganden ausüben könnte. Mittels Yeast-Two-Hybrid Untersuchungen konnten bereits einige sowohl extra- als auch intrazelluläre Interaktoren von PrP^c identifiziert werden. Interaktoren wären zum Beispiel der Laminin Rezeptor Prekursor (Rieger *et al.*, 1997; Gauczynski *et al.*, 2001), Caveolin-1 (Mouillet-Richard *et al.*, 2001), HSP 60 (Edenhofer *et al.*, 1996), Bcl-2 (Kürschner & Morgan, 1996), Synapsin Ib und Grb2 (Spielhauer & Schätzl, 2001). Einige dieser Interaktionspartner spielen wichtige Rollen in der zellulären Signaltransduktion, weshalb eine Rolle für PrP^c in Signaltransduktionswegen vermutet wird.

Die Rolle von PrP^c in der Signaltransduktion

Eine mögliche Funktion für PrP^c in der zellulären Signaltransduktion wurde in den letzten Jahren von einigen Arbeitsgruppen postuliert und experimentell untermauert. Signaltransduktionskaskaden nehmen ihren Anfang zumeist an der Zelloberfläche durch die Bindung von Liganden an spezifische Rezeptoren, die das Signal in das Zytoplasma bzw. in den Kern weiterleiten. Solche Rezeptoren befinden sich hauptsächlich konzentriert in Caveolae oder Rafts, spezialisierten Regionen auf der Plasmamembran mit einer hohen Konzentration an Cholesterol und Glykosphingolipiden. Auch für das GPI-verankerte Prion Protein konnte eine Lokalisation in Rafts nachgewiesen werden (Taraboulos *et al.*, 1995). Selbst wenn PrP somit keinen direkten Kontakt zu zytoplasmatischen Proteinen hat, so ist dennoch nicht ausgeschlossen, dass es an der Signalübertragung ins Zytoplasma beteiligt sein kann. Eine Vielzahl von GPI-verankerten Proteinen ist ebenfalls in Rafts lokalisiert und übernimmt als solche wichtige Rollen in der Signaltransduktion. Kürzliche Publikationen bringen PrP^c mit intrazellulären Signaltransduktionskaskaden in Verbindung. In der differenzierten neuronalen Zelllinie 1C11 der Maus führte das Crosslinken von PrP^c über Antikörper zu einer Dephosphorylierung und Aktivierung der intrazellulären Fyn-Kinase. Dieser Effekt war vom Vorhandensein von Caveolin-1 abhängig, ebenfalls ein in Caveolae und Rafts lokalisiertes Protein (Mouillet-Richard *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte in einer PrP^(0/0)-Fibroblasten-Zelllinie eine veränderte Regulation von einigen Genen nachgewiesen werden, die wichtig für die Proliferation und Differenzierung der Zelle sind (Sato *et al.*, 2000). Einen weiteren Hinweis auf eine Beteiligung von PrP^c an dem Überleben und der Differenzierung neuronaler Zellen gab die Entdeckung, dass einige

Signaltransduktionswege, die beim Neuronenwachstum und dem Überleben neuronaler Zellen eine Rolle spielen, durch PrP^c ausgelöst werden (Chen *et al.*, 2003). So wurden bei PrP^(0/0)-Mäuse, die N-terminal trunkeiertes PrP^c exprimierten kurz nach der Geburt schwerwiegende neurodegenerative Erscheinungen beobachtet Shmerling *et al.*, 1998). Schließlich konnte, wie oben bereits erwähnt, die Interaktion von PrP^c mit Proteinen gezeigt werden, die an der zellulären Signaltransduktion beteiligt sind. Im Falle von dem Adapterprotein Grb2 und Synapsin Ib war dieser Nachweis sowohl *in vitro* als auch in Zellkultur möglich (Spielhauer & Schätzl, 2001). Darüber hinaus gibt es noch zahlreiche weitere experimentelle Befunde, die eine Beteiligung von PrP^c an zellulären Signaltransduktionsvorgängen sehr wahrscheinlich machen.

2.5. Konversionsmodelle

Gemäß der „Protein-only“-Hypothese (siehe auch Abschnitt 2.3.3.) wird angenommen, dass PrP^c des Wirts durch direkten Kontakt mit PrP^{Sc} in PrP^{Sc} konvertiert wird. Hierbei soll hauptsächlich die Umfaltung des Bereiches zwischen den Aminosäuren 90 und 120, der beiden kurzen β -Faltblatt-Strukturen und der ersten α -Helix zu einer großen β -Faltblatt-Formation die Konformationsänderung von PrP^c in die pathogene Isoform verursachen. Der restliche C-terminale Teil, der die anderen beiden α -Helices und die Disulfidbrücke ausbildet, muss jedoch für die Infektiosität von PrP^{Sc} erhalten bleiben (Prusiner, 1998; Hornemann, *et al.*, 1997; Wille *et al.*, 2002). Für diese Umwandlung des Prion Proteins von seiner zellulären in die pathogene Isoform existieren zur Zeit zwei grundsätzlich mögliche Modellvorstellungen.

Das Heterodimer-Modell wurde 1990 von Prusiner vorgeschlagen (Prusiner *et al.*, 1990; Cohen *et al.*, 1994) und schlägt die Umfaltung von PrP^c zu PrP^{Sc} über ein Konversionsintermediat PrP* vor. Hierbei wird PrP^c zu PrP* umgefaltet, das dann mit PrP^{Sc} interagiert (Heterodimer) und schließlich dessen Konformation annimmt, was zu der Ausbildung eines Homodimer-Komplexes führt, Das neu entstandene PrP^{Sc} kann wiederum an PrP* binden und dieses in einem autokatalytischen Prozess umwandeln. Die Energiebarriere für diese Konversion ist wahrscheinlich sehr hoch (Cohen *et al.*, 1994) und betrifft vor allem den Übergang von PrP^c zu PrP*. PrP* selbst ist sehr instabil und nimmt infolgedessen direkt wieder die Konformation von PrP^c ein, sollte es

nicht zur Ausbildung des Heterodimers mit PrP^{Sc} kommen. Diese Eigenschaften würden auch das äußerst seltene, nur im fortgeschrittenen Lebensalter auftretende, Vorkommen spontaner Formen von Prion-Erkrankungen erklären. Spezielle Mutationen, die eine β -Faltblatt-Konformation verursachen oder die Konformation von PrP^c destabilisieren und damit die Energiebarriere nach unten verschieben, könnten die erblichen Formen der Prionkrankheiten erklären. Es wird vermutet, dass der postulierte, bislang noch nicht identifizierte Ko-Faktor der Konversion, Faktor „X“, die Interaktion zwischen PrP* und PrP^{Sc} vermittelt. Das würde die Spezies-Barriere (siehe auch Abschnitt 2.3.3. Spezies-Barriere und Prion-Stämme) auch damit erklären, dass dieser Faktor ein wirtseigenes Protein ist, das bevorzugt an wirtseigenes PrP bindet (Telling *et al.*, 1994; Telling *et al.*, 1995). Bei größeren Abweichungen in der Aminosäuresequenz wäre die Bindungsaffinität viel geringer. Das würde bedeuten, dass die Ausbildung von PrP* - PrP^{Sc} Heterodimeren stark erschwert werden würde.

Das Kristallisations-Modell wurde zum ersten Mal 1990 in der Gruppe von Gajdusek diskutiert und dann von Lansbury weiterentwickelt (Come *et al.*, 1993). Gemäß dieser Theorie ist das Wirts-PrP^c in der Lage, sich an einen Polymerisations-Keim aus infektiösen PrP^{Sc}-Oligomeren anzulagern. Ein Konversions-Intermediat im Sinne von PrP* ist dabei nicht notwendig. Vielmehr nimmt PrP^c nach der Anlagerung die Konformation des Keims an, was zur Ausbildung von großen PrP^{Sc}-Aggregaten führt. Diese Aggregate können sich dann wieder in kleine Polymerisations-Keime zerteilen. Dieses Modell liefert eine Erklärung für das Bestehen der verschiedenen Prion-Stämme (siehe auch Abschnitt 2.3.3. Spezies-Barriere und Prion-Stämme). Der PrP^{Sc}-Polymerisations-Keim bestimmt die Struktur der polymeren Aggregate. Damit wird die Konformation nicht vom PrP-Monomer des Wirts bestimmt, sondern vom (exogenen) PrP^{Sc}-Oligomer.

Beide Modellvorstellungen schließen sich gegenseitig nicht aus und sind sowohl mit infektiösen, als auch mit den familiären Formen der Prion-Erkrankungen vereinbar. In beiden wird vom Vorhandensein einer pathogenen Isoform ausgegangen und entweder die spontane Bildung von PrP* oder eines PrP^{Sc}-Keimes favorisiert.

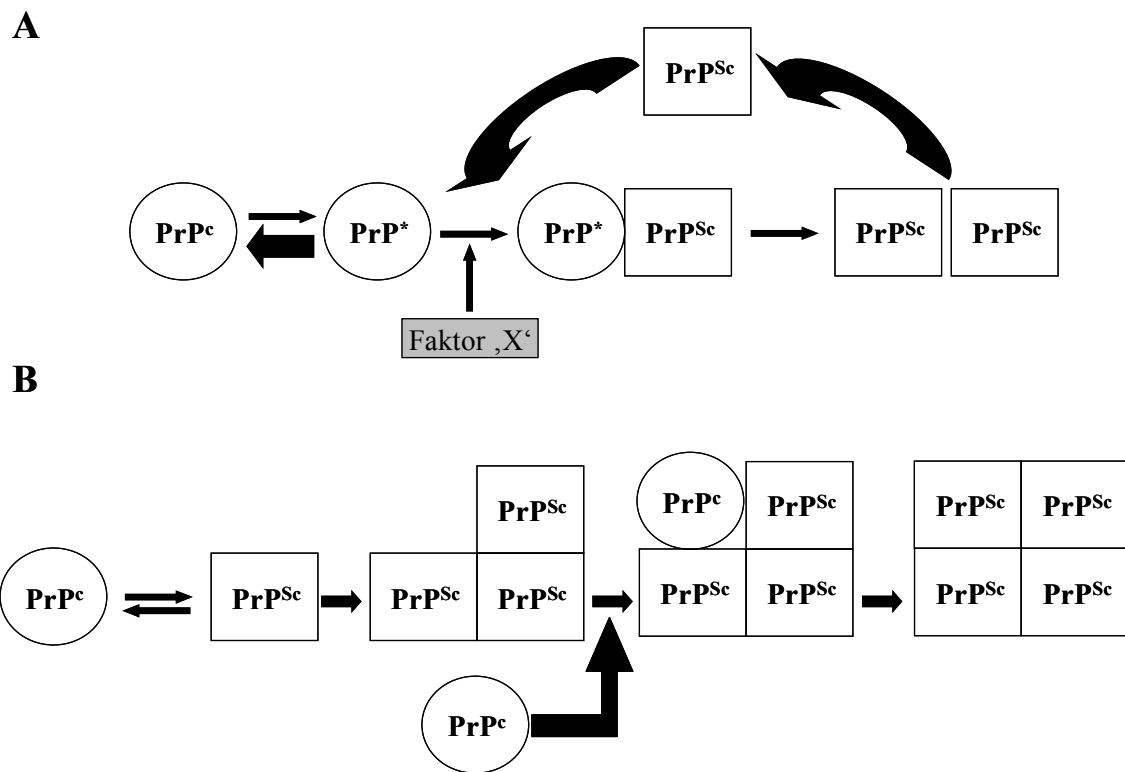


Abb. 2.5.1. Zwei Modellvorstellungen der Prion-Konversion und Replication. (A) Heterodimer-Modell (Prusiner *et al.*, 1990; Cohen *et al.*, 1994). (B) Kristallisations-Modell. (Come *et al.*, 1993).

2.6. Ansätze zur Therapie und Prophylaxe

In den letzten Jahren wurden viele Anstrengungen unternommen, Wege zu finden, in die Prion-Konversion experimentell einzugreifen. Der Konversionsprozess bietet hierfür einige Punkte, an denen anti-Prion Ansätze angreifen können. In Abbildung 2.6.1. ist das Heterodimer-Modell (siehe vorangegangenes Kapitel) abgebildet. Zusätzlich sind Angriffspunkte von bisherigen experimentellen anti-Prion Ansätzen durch Buchstaben gekennzeichnet (a – g). Das Heterodimer-Modell wurde hier nur beispielhaft gewählt. Sämtliche Ansätze gelten ebenso, wenn das Kristallisationsmodell zur Grundlage genommen wird.

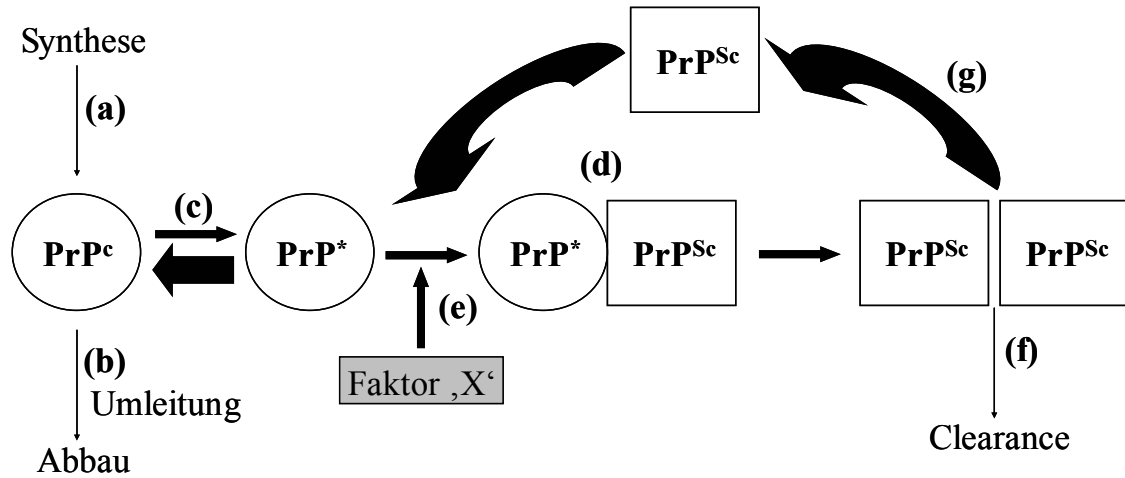


Abb. 2.6.1. Heterodimer-Modell der Prion-Konversion und mögliche Ansätze des Eingriffs in den Konversionsprozess. Angriffspunkte bisheriger Ansätze wurden durch die Buchstaben (a)–(g) gekennzeichnet. Erläuterungen siehe Text.

Viele Ansätze haben PrP^c, das Substrat der Konversion, als Ziel. Wird PrP^c dem Konversionsprozess entzogen, so kann keine weitere Umwandlung zu PrP^{Sc} mehr stattfinden. Das kann entweder dadurch erfolgen, dass die Synthese von PrP^c inhibiert wird (a), beispielsweise in PrP^(0/0)-Mäusen (Bueler *et al.*, 1993; Prusiner, 1998; Weissmann *et al.*, 2001) oder mittels RNAi (Tilly *et al.*, 2003). Oder man entzieht PrP^c durch intrazelluläres Umleiten dem Ort der Konversion (b), wie es beispielsweise für die Substanz Suramin gezeigt werden konnte. Suramin führt zur Aggregation von PrP^c im Trans-Golgi-Netzwerk. Die Aggregate werden direkt in die Lysosomen transportiert und abgebaut. PrP^c gelangt somit nicht mehr an die Plasmamembran (Gilch *et al.*, 2001). PrP^c steht im Gleichgewicht mit einem vorgeschlagenen Konversions-Intermediat PrP^{*}. Durch eine Überstabilisierung von PrP^c kann dessen Umwandlung in PrP^{*} verhindert werden (c) (Cohen *et al.*, 1994; Prusiner, 1998; Clarke *et al.*, 2001). Dieser Mechanismus wurde zum Beispiel für chemische Chaperone (Tatzelt *et al.*, 1996) oder Kongo Rot vorgeschlagen (Head & Ironside, 2000). Für die Konversion von PrP^c zu PrP^{Sc} ist ein direkter Kontakt zwischen den beiden Isoformen notwendig. Durch Inhibition des Kontakts zwischen PrP^{*}/PrP^c und PrP^{Sc} kann somit die Konversion verhindert werden (d). Das kann durch Verwendung von „β-Sheet-Breakern“, anti-PrP-Aptameren oder anti-PrP-Antikörpern geschehen (Head & Ironside 2000; Soto *et al.*, 2000; Enari *et al.*, 2001; Heppner *et al.*, 2001; Peretz *et al.*, 2001; Proske *et al.*, 2002;

Sigurdsson *et al.*, 2002; Gilch *et al.*, 2003; White *et al.*, 2003). Ebenso kann die Bindung eines postulierten Ko-Faktors der Konversion, Faktor „X“ (Prusiner, 1998; Head & Ironside 2000) inhibiert und die Konversion damit unterbunden werden **(e)**. Für ein lösliches PrP-Dimer wurde vermutet, dass es die Interaktion eines solchen Ko-Faktors mit Konversions-Intermediaten verhindert, wodurch die Konversion zu PrP^{Sc} gestoppt wird (Meier *et al.*, 2003). Nur wenige Substanzen, wie zum Beispiel verzweigte Polyamine haben als Ansatz-Ziel direkt PrP^{Sc} **(g) + (f)**. Für diese Substanzen wird vermutet, dass sie durch Aktivierung der zellulären Clearance zum Abbau von PrP^{Sc} führen (Supattapone *et al.*, 1999; Winklhofer *et al.*, 2000; Supattapone *et al.*, 2001).

Eine sehr wirkungsvolle, in großem Rahmen einsetzbare Krankheitsprophylaxe ist seit jeher die Impfung. Der anti-Prion Effekt von anti-PrP-Antikörpern in Prion-infizierten Zellen konnte bereits vor 3 Jahren gezeigt werden (Enari *et al.*, 2001; Peretz *et al.*, 2001). Da PrP^c auf nahezu allen Zellen des Organismus exprimiert wird und damit eine Auto-Toleranz gegenüber PrP existiert, erscheint eine aktive Immunisierung gegen PrP nahezu unmöglich. Dennoch war es möglich, durch Immunisierung Auto-Antikörper gegen PrP zu generieren (Sigurdsson *et al.*, 2002; Gilch *et al.*, 2003), die in der Lage waren, Prion-infizierte Zellen zu heilen (Gilch *et al.*, 2003). In einer transgenen Maus, die sowohl PrP^c als auch einen definierten anti-PrP-Antikörper exprimierte, war die Infektiosität in der Milz nach erfolgter Infektion drastisch reduziert (Heppner *et al.*, 2001). In keinem Fall konnten durch Auto-Immunantworten wesentliche Nebeneffekte beobachtet werden. Ob die aktive Immunisierung den Ausbruch der Krankheit verzögern oder gar verhindern kann, bleibt noch zu untersuchen.

Sehr viel versprechende Ergebnisse ergaben passive Immunisierungsversuche (White *et al.*, 2003). Hier wurde Mäusen nach der Infektion zweimal wöchentlich anti-PrP-Antikörper in hohen Dosen injiziert, die in PrP^(0/0)-Mäusen generiert worden waren. Tatsächlich konnte durch diese Immunisierung die Inkubationszeit beträchtlich verlängert werden (die Tiere waren bei Erscheinen der Publikation tatsächlich noch am Leben). Untersuchung von Milz und Gehirn ergaben einen stark reduzierten Gehalt an PrP^{Sc} in der Milz und kein nachweisbares PrP^{Sc} im Gehirn. Das lässt vermuten, dass die passive Immunisierung einen Langzeit-Effekt haben und vielleicht sogar völligen Schutz geben könnte.

Unklar ist jedoch, ob sich diese Situation direkt auf den Menschen übertragen lässt, zumal, im Gegensatz zur experimentellen Situation, der Zeitpunkt der Infektion selten

bekannt ist. Für eine protektive Wirkung müssten die Antikörper aber so bald wie möglich nach erfolgter Infektion verabreicht werden. Damit stellt die passive Immunisierung eher eine Möglichkeit für die postexpositionelle Prophylaxe dar.

Ob die Therapie und/oder Prophylaxe gegen Prion-Erkrankungen beim Menschen überhaupt realistische Ziele sind bleibt jedoch offen. Menschliche Prionkrankheiten zeichnen sich durch eine sehr lange Inkubationszeit gefolgt von einer sehr kurzen klinischen Phase aus, die stets mit dem Tod endet. Bislang bestehen keine Möglichkeiten der präklinischen Diagnose und beim Auftreten von Symptomen ist es fraglich, ob es für eine Therapie nicht bereits zu spät ist. Im Falle von genetisch-familiären Erkrankungen jedoch wären Mittel, die in der Lage wären, den Ausbruch der Krankheit zu verhindern/verzögern, durchaus denkbar. Kürzlich konnte in transgenen Mäusen, bei denen die PrP^c-Expression nach Infektion und erfolgter Neuroinvasion in Neuronen gestoppt wurde, gezeigt werden, dass frühe neurodegenerative Veränderungen reversibel waren (Mallucci *et al.*, 2003). In diesen Mäusen stoppte die PrP^c-Expression in Neuronen etwa 12 Wochen nach der Geburt. In dieser Zeitspanne waren die Tiere bereits infiziert und begannen die charakteristischen neurodegenerativen Erscheinungen, wie spongiforme Veränderungen und Nervenzellverlust zu entwickeln. Nach dem Stopp der neuronalen PrP^c-Expression wurde PrP^c weiterhin in nicht-neuronalen Zellen exprimiert und in PrP^{Sc} konvertiert, das in Folge akkumulierte. Dennoch hörte die Neurodegeneration auf und bisherige Veränderungen bildeten sich zum Teil sogar zurück. Das zeigte, dass nicht-neuronales PrP^{Sc} nicht pathogen ist, dass durch das selektive Anhalten der Konversion PrP^c zu PrP^{Sc} in Neuronen während der Infektion die Neurotoxizität verhindert werden kann und dass, entgegen aller bisheriger Meinungen, Neuronen sich doch zu einem gewissen Grad regenerieren können (Mallucci *et al.*, 2003). Da es sich allerdings hierbei um sehr junge Tiere gehandelt hat, bleibt abzuwarten ob eine Regeneration von Nervenzellen im adulten Organismus ebenfalls zu beobachten ist. Jedoch geben diese Ergebnisse Hoffnung auf die Möglichkeit, Prion-Erkrankungen therapieren zu können.

Wie bei allen neurodegenerativen Erkrankungen, müssen therapeutische Mittel die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, um das Zentrale Nervensystem (ZNS) zu erreichen. Daran scheitern die meisten aller bisher erfolgreich in Zellkultur angewandten Substanzen mit anti-Prion Effekt. Bei Prion-Erkrankungen, bei denen die Infektion jedoch an peripheren Stellen des Körpers stattfindet, so dass die Prionen erst in der Peripherie akkumulieren und ins ZNS transportiert werden müssen, wären Therapie

und/oder Prophylaxe anwendbar. Bedenkt man die langen Inkubationszeiten wäre eine postexpositionelle Prophylaxe nach erfolgter Infektion denkbar. Mittel zur Prophylaxe sind angesichts von vCJD, für die man bisher die Zahl zukünftiger Fälle nur schwer voraussagen kann, dringend notwendig.

2.7. Zielsetzung

Da PrP^c möglicherweise eine Rolle in der zellulären Signaltransduktion spielt, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob durch Eingriff in spezielle Signaltransduktionsvorgänge der Zelle, die Konversion von PrP^c zu PrP^{Sc} beeinflusst werden könnte. Dieser Ansatz entstand aus der Überlegung heraus, dass die meisten Proteine, die in Vorgänge der Signaltransduktion involviert sind, selbst über Signalkaskaden aktiviert bzw. inaktiviert werden. Die Überführung von PrP^c in PrP* im Heterodimer-Modell der Konversion zum Beispiel würde einer solchen „Aktivierung“ gleich kommen.

Zunächst wurden in einem Screening verschiedene Substanzen, die bestimmte Vorgänge der zellulären Signaltransduktion inhibieren, in Prion-infizierten Zellen auf ihren Effekt auf PrP^{Sc} getestet.

In diesem Screening wurde interessanterweise nur eine Substanz gefunden, die PrP^{Sc} drastisch reduzierte, ohne einen Effekt auf PrP^c zu zeigen. Sie stellte sich als der Tyrosin-Kinasen Inhibitor STI571 heraus. Die meisten Substanzen hatten überhaupt keinen Effekt und wieder andere waren sehr toxisch. Jedoch hatten einige wenige Substanzen sowohl einen Effekt auf PrP^{Sc} als auch auf PrP^c.

Wegen des herausragenden und einzigartigen Effekts von STI571 wurde speziell diese Substanz in der vorliegenden Arbeit weiter charakterisiert, um den zugrunde liegenden molekularen Wirkungsmechanismus zu analysieren.

Zunächst sollte der anti-Prion Effekt ebenfalls in weiteren Prion-infizierten Zelllinien bestätigt werden.

Neben Experimenten, die den Effekt von STI571 auf PrP^{Sc} genauer untersuchen sollten, sollten auch Studien zur Klärung des ausgelösten Wirkungsmechanismus durchgeführt werden.

Schließlich sollten weitere Experimente Aufschluss über das molekulare Target von STI571 im anti-Prion Effekt geben.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Strahlenschutz und biologische Sicherheit

Gentechnische Arbeiten erfolgten nach den Richtlinien des Gentechnikgesetzes vom 01.07.1990 beziehungsweise vom 01.01.2004. Biologisch kontaminierte Materialien und Lösungen wurden getrennt gesammelt und gemäß den Bestimmungen der Betriebsanweisungen für Arbeiten mit Prionen inaktiviert und entsorgt. Arbeiten mit radioaktiven Substanzen und ihre Entsorgung erfolgten entsprechend der Strahlenschutzverordnung vom 26.07.2001.

3.1.2. Chemikalien

2-Morpholinoethansulfonsäure (MES)	AppliChem, Darmstadt
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma, München
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Agarose zur DNA-Gelelektrophorese	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat	Sigma, München
Bacto Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto Trypan	Becton Dickinson, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
Eisessig	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	VWR, Darmstadt

Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat (DOC)	Roth, Karlsruhe
N-Lauroylsarcosin (Sarkosyl)	Roth, Karlsruhe
PBS	Gibco, Karlsruhe
Pefabloc SC	Roche, Mannheim
Proteinase K (PK)	VWR, Darmstadt
Protogel (30 % (w/v), Acrylamid : Bisacrylamid (37.5:1))	Biozym, Hess. Oldendorf
Tris-Hydroxy-Methyl-Amino-Methan (Tris)	Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma, München
Triton X-100	Sigma, München
Tween-20	Roth, Karlsruhe

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien wurden von den Firmen Invitrogen Karlsruhe, Roth Karlsruhe, Sigma München und VWR Darmstadt in p.a. Qualität bezogen.

3.1.3. Antibiotika

Ampicillin	Sigma, München
Kanamycin	Sigma, München

3.1.4. Radioaktive Verbindungen

(³² P)- γ -ATP (3000 Ci/mmol)	Amersham, Freiburg
(³⁵ S)-Met/Cys (Promix; 1000 Ci/mmol)	Amersham, Freiburg

3.1.5. Restriktionsendonukleasen und DNA-modifizierende Enzyme

Restriktionsendonukleasen und DNA-modifizierende Enzyme wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Roche (Mannheim) und New England Biolabs (Frankfurt) bezogen.

3.1.6. Zelllinien

Für die Herstellung von Zellkulturmedien verwendetes Serum wurde vor Verwendung für 30 Minuten bei 56° C hitzeinaktiviert.

N2a: Neuroblastomzelllinie der Maus. Die Zellen stammen von einem spontanen Tumor in A/J-Mäusen (PrP^{al/a}-Stamm) ab (Klebe und Ruddle, 1969). Die Zellen wurden in Opti-MEM kultiviert (Zusammensetzung: 500 ml Opti-MEM Glutamax (Gibco, Karlsruhe), 55 ml fötales Kälberserum (PAA, Marburg), 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 IU/ml; 10000 UG/ml).

3F4-N2a: Stabil mit 3F4-PrP transfizierte N2a-Zellen (Klebe und Ruddle, 1969). In 3F4-PrP ist die Aminosäuresequenz 94 – 131 des murinen Prion Proteins-Leserahmens mit der des syrischen Hamsters ausgetauscht (Scott *et al.* 1992). Die beiden Spezies unterscheiden sich in diesem Bereich nur durch 2 Aminosäuren voneinander (109, 112). Dadurch entsteht eine Maus-Hamster-Maus-Chimäre des Prion Proteins (MHM). Dieser Aminosäurebereich (aa 94 – 131) beinhaltet das 3F4-Epitop (aa 109 – 112), das außer in Hamster- auch in humanem PrP, nicht aber in der Maus vorhanden ist. Das stabil transfizierte 3F4-PrP wird demnach vom 3F4-Antikörper (Kascsak *et al.*, 1987) erkannt, nicht jedoch das endogene murine Wildtyp-PrP. Die Zellen wurden in DMEM kultiviert (Zusammensetzung: 50 ml DMEM (Gibco, Karlsruhe), 55 ml fötales Kälberserum (PAA, Marburg), 10 ml 200 mM L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe), 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 IU/ml; 10000 UG/ml).

Sc-3F4-N2a: Persistent mit dem mausadaptierten Prion-Stamm RML (Rocky-Mountain-Laboratories) infizierte Neuroblastomzelllinie der Maus, die stabil mit 3F4-PrP transfiziert ist (siehe unter 3F4-N2a). Die Zellen wurden in Opti-MEM kultiviert (Zusammensetzung siehe oben unter N2a-Zellen).

GT1: Hypothalamuszelllinie der Maus (Mellon *et al.*, 1990). Die Zellen wurden in MEM kultiviert. (Zusammensetzung: 500 ml MEM (Gibco, Karlsruhe), 55 ml fötales Kälberserum (PAA, Marburg), 10 ml 200 mM L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe), 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 IU/ml; 10000 UG/ml).

ScGT1: Persistent mit dem mausadaptierten Prion-Stamm RML (Rocky-Mountain-Laboratories) infizierte Hypothalamuszelllinie der Maus (Schätzl *et al.*, 1997). ScGTI-Zellen zeigen im Gegensatz zu den oben aufgeführten infizierten Neuroblastomzellen deutliche neurodegenerative Veränderungen, ähnlich der ZNS-Veränderungen, die man bei Prion-infizierten Menschen und Tieren beobachten kann (Vakuolisierung, Zelldegeneration, Apoptose usw.) Die Zellen wurden in Opti-MEM kultiviert. (Zusammensetzung siehe oben unter N2a-Zellen).

SMBs.15: Persistent mit dem mausadaptierten Prion-Stamm RML (Rocky-Mountain-Laboratories) infizierte Zellen aus dem Gehirn der Maus (Birkett *et al.*, 2001). Die Zellen wurden in Medium 199 kultiviert. (Zusammensetzung: 500 ml Medium 199 mit Earle's Salzen (Gibco, Karlsruhe), 55 ml neugeborenen Kälberserum (Gibco, Karlsruhe), 5,5 ml fötales Kälberserum (PAA, Marburg), 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 IU/ml; 10000 UG/ml).

Die Infektion von murinen Zelllinien mit Scrapie erfolgt in der Regel durch Behandlung der Zellen mit 1 % Hirnhomogenat von einer Prion-infizierten, terminal erkrankten Maus. Dafür werden zu etwa 40 – 50 % konfluente Zellen mit 1 % Hirnhomogenat für drei Tage behandelt. Danach wird das Medium samt Homogenat entfernt, die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und bis zur Konfluenz in normalem Kulturmedium weiterkultiviert. Die Zellen werden dreimal passagiert und dann auf die Existenz von PrP^{Sc} hin getestet (Proteinase K-Verdau, Löslichkeits-Assay, siehe 3.2.3.3. bzw. 3.2.3.4). Zu diesem Zeitpunkt kann man davon ausgehen, dass sämtliches Inokulum entfernt ist, jetzt nachgewiesenes PrP^{Sc} neu konvertiert wurde und somit die Zellen erfolgreich infiziert worden sind. Nach einer erfolgreichen Infektion konvertieren die Zellen persistent, d.h. es wird ständig ein gewisser Prozentsatz des neu gebildeten zellulären Prion Proteins (PrP^c) in den Zellen in die pathogene Isoform (PrP^{Sc}) umgewandelt. Die Zellen können zur längeren Lagerung wie unter 3.2.2.2. beschrieben eingefroren werden.

3.1.7. Bakterien

XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam): Bakterienstamm zur Klonierung von Plasmid-DNA und Lambda Phagen Vektoren.

Luri-Bertani-Medium (LB)	10 g/l Bacto Typton 5 g/l Bacto Hefeextrakt 10 g/l NaCl
LB-Agar-Platten	15 g Bacto Agar/1 l LB-Medium
LB-Agar-Platten + Antibiotikum	15 g Bacto Agar/1 l LB-Medium + 50 mg Antibiotikum/1 l LB-Medium

3.1.8. Inhibitorische Substanzen

Die im anfänglichen Screening verwendeten Substanzen waren alle von der Firma Axxima, Martinsried, im Rahmen einer Kollaboration zur Verfügung gestellt worden und lagen in einer Stocklösung von 10 mM in DMSO vor. Die Lagerung erfolgte bei -20° C.

Suramin	Stocklösung 200 mg/ml in 0,9 % NaCl, Lagerung: lichtgeschützt bei 4° C.
STI571	Novartis, Zürich. Stocklösung 10 mM in DMSO, Lagerung: -20° C.
CT52923	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Millenium Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA, Stocklösung 3 mM in DMSO, Lagerung: lichtgeschützt bei -20° C.

Soweit nicht anders angegeben, wurden in der vorliegenden Arbeit mock-behandelte Kontroll-Zellen mit dem entsprechenden Lösungsmittel in gleicher Weise wie Substanz-behandelte Zellen behandelt.

3.1.9. Antikörper

Erstantikörper

Antikörper gegen PrP

- A7 polyklonales Kaninchen-Serum (Proske *et al.* 2002).
- 4H11 monoklonaler Maus-Antikörper. Dieser Antikörper wurde in Kollaboration mit Frau Dr. Elisabeth Kremmer (GSF, München) generiert. Als Immunogen diente rekombinantes dimeres Maus-PrP.
- 3F4 monoklonaler Maus-Antikörper, Signet Pathology, Dedham, MA, USA. Dieser Antikörper erkennt die Aminosäuren 109 – 112 (Nummerierung gemäß Schätzl *et al.*, 1995; Wopfner *et al.* 1999) von Mensch- und Hamster-PrP.

Sonstige Antikörper

- Anti-Abl 8E9 monoklonaler Maus-Antikörper gegen die Tyrosin-Kinase c-Abl, Klon: 8E9, Becton Dickinson, Heidelberg.
- Anti- CD107a 1D4B monoklonaler Ratten-Antikörper gegen das Lysosomen Membranprotein Lamp-1, Klon 1D4B, Becton Dickinson, Heidelberg.
- 4G10 monoklonaler Maus-Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosin-Reste, Biozol, Eching.

Zweitantikörper

Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie

FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)-konjugiertes Ziege Anti-Kaninchen IgG, Dianova, Hamburg.

Texas Red-konjugiertes Esel Anti-Ratte IgG, Dianova, Hamburg.

Westernblot

Peroxidase-konjugiertes Schaf Anti-Maus IgG, Amersham, Freiburg.

3.1.10. Plasmide

Grundvektoren

pcDNA3.1/Zeo: Expressionsvektor für Mammaliazellen (Invitrogen, Karlsruhe).

Plasmide, die für die vorliegende Arbeit hergestellt wurden

pcDNAVSVc-abl: Plasmid für die Expression von VSV-getaggttem humanem Wildtyp c-Abl in Mammaliazellen. Dieses Konstrukt wurde im Rahmen einer Kollaboration von der Firma Axxima, Martinsried, hergestellt.

pcDNAVSVc-ablK271M: Plasmid für die Expression einer VSV-getaggtten c-Abl-Mutante in Mammaliazellen. Für die Herstellung war das für die ATP-Bindung in der Kinasen-Domäne wichtige Lysin an Stelle 271 (Kharbanda *et al.*, 1995; Yuan *et al.*, 1996) zu einem Methionin-Rest mutiert worden. Diese Mutante hat einen transdominant-negativen Effekt (Kharbanda *et al.*, 1995; Yuan *et al.*, 1996). Wenn sie in Zellen überexprimiert wird, inhibiert sie die Aktivität der endogenen c-Abl Kinase. Dieses Konstrukt wurde im Rahmen einer Kollaboration von der Firma Axxima in Martinsried hergestellt.

pSilencer3.1-H1#WZ: Plasmid zur Expression von Zufalls- („Random“-) siRNA in Mammaliazellen. Die exprimierte siRNA ist zu keiner mRNA homolog und sollte demnach keinerlei Effekt auf die zelluläre Proteinexpression haben. Dieses Konstrukt diente in den Versuchen als Negativ-Kontrolle. Es wurde uns freundlicherweise von Dr. Eckhard Flechsig, Würzburg, zur Verfügung gestellt. Das Plasmid trägt das Ampicillin-Resistenzgen für die Klonierung in *E. coli* und das Hygromycin-Resistenzgen unter dem SV40-Promotor, was eine Selektionierung in Mammaliazellen ermöglicht. Die Expression der siRNA steht unter der Kontrolle des H1 Promotors für die RNA-Polymerase III. Von diesem Konstrukt ausgehend wurden alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten pSilencer-Konstrukte kloniert. Hierzu wurde das Plasmid zum Entfernen des für die Expression der #WZ-siRNA dienenden Bereiches mit *BamHI* und *HindIII* geschnitten. Der entstandene linearisierte Vektor konnte dann für die Klonierungen der siRNA-Expressionsplasmide verwendet werden.

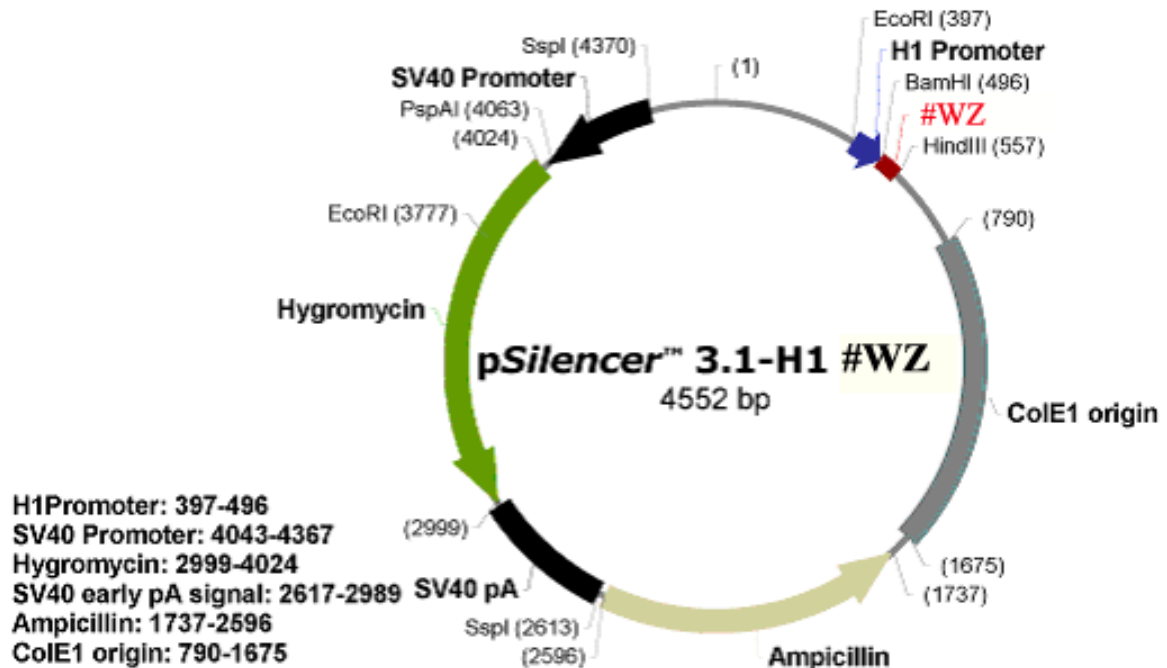


Abb 3.1.10.1. Vektorkarte des Plasmids pSilencer3.1H1#WZ.

(nach Ambion http://www.ambion.com/techlib/misc/vectors/3.1_hygro.html)

Zum Verfahren des Selektionierens geeigneter Bereiche der mRNA von c-Abl für die Herstellung von siRNAs und über den Aufbau der Einzelstrang-Oligonukleotide für die Klonierung siehe 3.2.1.11.

pSilencer3.1-H1cabl#2: Plasmid zur Expression von siRNA zur Niederregulierung von c-Abl in Mammaliazellen. Die durch dieses Konstrukt exprimierte siRNA ist gegen einen Abschnitt der c-Abl mRNA gerichtet, der für einen Bereich innerhalb der SH3 Domäne (Bindung prolinreicher Bereiche) von c-Abl kodiert. Als Vektor diente *BamHI* und *HindIII* geschnittener pSilencer3.1-H1#WZ. In diesen linearisierten Vektor konnten die Einzelstrang-Oligonukleotide CABL#2-f und CABL#2-r nach ihrer Hybridisierung zu einem Doppelstrang-Oligonukleotid über die Restriktionsstellen *BamHI* und *HindIII* ligiert werden.

pSilencer3.1-H1cabl#4a: Plasmid zur Expression von siRNA zur Niederregulierung von c-Abl in Mammaliazellen. Die durch dieses Konstrukt exprimierte siRNA ist gegen einen Abschnitt der c-Abl mRNA gerichtet, der für einen Bereich kodiert, der sich zwischen der SH2 (Bindung an Phospho-Tyrosin-Reste) und der SH1 (Kinase-Aktivität) Domäne von c-Abl befindet. Zudem liegt der Bereich 5' des Codons für Tyr245, das

eine Rolle in der *trans*-Phosphorylierung der Kinase spielt. Als Vektor diente *BamHI* und *HindIII* geschnittener pSilencer3.1-H1#WZ. In diesen linearisierten Vektor konnten die Einzelstrang-Oligonukleotide CABL#4a-f und CABL#4a-r nach ihrer Hybridisierung zu einem Doppelstrang-Oligonukleotid über die Restriktionsstellen *BamHI* und *HindIII* ligiert werden.

pSilencer3.1-H1cabl#7: Plasmid zur Expression von siRNA zur Niederregulierung von c-Abl in Mammaliazellen. Die durch dieses Konstrukt exprimierte siRNA ist gegen einen Abschnitt der c-Abl mRNA gerichtet, der für einen Bereich innerhalb der SH1 Domäne (Kinase-Aktivität) von c-Abl kodiert. Zudem liegt dieser Bereich 5' des Codons, das für die katalytische basische Aminosäure Asp382 kodiert, deren Aufgabe es ist, ein Proton vom Ziel-Tyrosin abzuziehen, so dass der nukleophile Angriff durch das γ -Phosphor-Atom des $Mg^{2+}ATP^{2-}$ Komplexes erleichtert wird. Als Vektor diente *BamHI* und *HindIII* geschnittener pSilencer3.1-H1#WZ. In diesen linearisierten Vektor konnten die Einzelstrang-Oligonukleotide CABL#7-f und CABL#7-r nach ihrer Hybridisierung zu einem Doppelstrang-Oligonukleotid über die Restriktionsstellen *BamHI* und *HindIII* ligiert werden.

pSilencer3.1-H1cabl#7a: Plasmid zur Expression von siRNA zur Niederregulierung von c-Abl in Mammaliazellen. Die durch dieses Konstrukt exprimierte siRNA ist gegen einen Abschnitt der c-Abl mRNA gerichtet, der für einen Bereich kodiert, der innerhalb der SH1 Domäne (Kinase-Aktivität) von c-Abl liegt. Zudem liegt dieser Bereich 5' der Region, die für den Aktivierungs-„Loop“ kodiert, der typisch für Proteinkinasen ist. Der Beginn des „Loops“ wird von den Aminosäuren Asp400, Phe401 und Gly402 gebildet. Außerdem bindet Asp400 Mg^{2+} , das für die Bindung von ATP erforderlich ist. Als Vektor diente *BamHI* und *HindIII* geschnittener pSilencer3.1-H1#WZ. In diesen linearisierten Vektor konnten die Einzelstrang-Oligonukleotide CABL#7a-f und CABL#7a-r nach ihrer Hybridisierung zu einem Doppelstrang-Oligonukleotid über die Restriktionsstellen *BamHI* und *HindIII* ligiert werden.

pSilencer3.1-H1cabl#8: Plasmid zur Expression von siRNA zur Niederregulierung von c-Abl in Mammaliazellen. Die durch dieses Konstrukt exprimierte siRNA ist gegen einen Abschnitt der c-Abl mRNA gerichtet, der für einen Bereich kodiert, der innerhalb der SH1 Domäne (Kinase-Aktivität) von c-Abl liegt. Zudem liegt dieser Bereich 3' der Region, die für den Aktivierungs-„Loop“ kodiert, der typisch für Proteinkinasen ist. Das Ende des „Loops“ wird von den Aminosäuren Ala426, Pro427 und Glu428 gebildet. Als Vektor diente *BamHI* und *HindIII* geschnittener pSilencer3.1-H1#WZ. In diesen

linearisierten Vektor konnten die Einzelstrang-Oligonukleotide CABL#8-f und CABL#8-r nach ihrer Hybridisierung zu einem Doppelstrang-Oligonukleotid über die Restriktionsstellen *Bam*HI und *Hind*III ligiert werden.

3.1.11. Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Klonierung der siRNA-Expressionsplasmide für die Niederregulierung von c-Abl:

Kennzeichnungscode:

Schnittstelle 5'-GGATCC-3' für *Bam*HI

Schnittstelle 5'-AAGCTT-3' für *Hind*III

5' **TTCAAGAGA** 3' (Sense-Strang), 5' **TCTCTTGAA** 3' (Antisense-Strang):

Loop

5' **TTTTTT** 3' (Sense-Strang), 5' **AAAAAA** 3' (Antisense-Strang):

Terminationssequenz für RNA-Polymerase III

G (Sense-Strang), C (Antisense-Strang): Zusätzlich eingefügtes Nukleotid downstream nach *Bam*HI-Schnittstelle, für optimalen RNA-Polymerase III Transkriptionsstart

Genaue Erläuterung zum Aufbau der Oligonukleotide siehe unter 3.2.1.11.

siRNA#WZ: (43,4 % G/C-Gehalt) Zufalls-siRNA als Negativ-Kontrolle, Oligonukleotidsequenzen des im Vektor enthaltenen Inserts.

WZ-f

5' **GATCC**CGCGCACCAGAACAAACACAC**TTCAAGAGA**GTGTGTTTGTCTGGTGCG**TTT**
TTT GGAAA 3'

WZ-r

5' **AGCTT**TCC**AAAAAA**CGCACCAGAACAAACACAC**TCTCTTGAA**GTGTGTTTGTCTGG
TGCGCGG 3'

siRNAcabl#2: (39,6 % G/C-Gehalt)

CABL#2-f

5' **GATCC**CGTCACAATGGGGAATGGTGT**TTCAAGAGA**ACACCATTCCCCATTGTGA**TTT**
TTTGGAAA 3'

CABL#2-r

5' **AGCTT**TCC**AAAAAA**TCACAATGGGGAATGGTGT**TCTCTTGAA**ACACCATTCCCCATT
GTGACGG 3'

siRNAcabl#4a: (47 % G/C-Gehalt)

CABL#4a-f

5' **GATCC**CGCGCAACAAGCCCACTATC**TTCAAGAGA**GATAGTGGGCTTGTTCGC**TTTT**
TTGGAAA 3'

CABL#4a-r

5' **AGCTT**TCC**AAAAAA**GCGCAACAAGCCCACTATC**TCTCTTGAA**GATAGTGGGCTTGT
GCGCGG 3'

siRNAcabl#7: (35,8 % G/C-Gehalt)

CABL#7-f

5' **GATCC**CGAAGAACTTCATCCACAGAT**TTCAAGAGA**TCTGTGGATGAAGTTCTT**TTTT**
TTGGAAA 3'

CABL#7-r

5' **AGCTT**TCC**AAAAAA**GAAGAACTTCATCCACAGAT**TCTCTTGAA**TCTGTGGATGAAGTT
CTTCGG 3'

siRNAcabl#7a: (47 % G/C-Gehalt)

CABL7a-f

5' **GATCC**CGCCACTTGGTGAAGGTGGCT**TTCAAGAGA**AGCCACCTTCACCAAGTGG**TTT**
TTTGGAAA 3'

CABL7a-r

5' **AGCTT**TCC**AAAAAA**CCACTTGGTGAAGGTGGCTTCTCTTGAAAGCCACCTTCACCAA
GTGGCGG 3'

siRNAcabl#8: (39,6 % G/C-Gehalt)

CABL#8-f

5' GATCCCGCAAGTTCTCCATCAAGTCGTTCAAGAGACGACTTGATGGAGAACTTGTTT
TTTGGAAA 3'

CABL#8-r

5' AGCTTTCCAAAAACAAGTTCTCCATCAAGTCGTCTCTTGAACGACTTGATGGAGAA
CTTGCGG 3'

3.2. Methoden

3.2.1. Molekularbiologische Methoden

Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht besonders vermerkt, bei 4° C ausgeführt. Verwendete Puffer, Medien und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und vor Gebrauch autoklaviert oder sterilfiltriert. Als *E. coli* Stamm wurde XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam, siehe 3.1.7.) verwendet.

3.2.1.1. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Höhere Konzentrationen an Nukleinsäuren lassen sich photometrisch bestimmen. Hierbei wird die Absorption von UV-Licht einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm durch Nukleinsäuren gemessen. Bei dieser Wellenlänge haben die aromatischen Reste der Basen ein Absorptionsmaximum. Die Umrechnung in die molare Konzentration erfolgt mit Hilfe von Faktoren, die für die verschiedenen Arten von Nukleinsäuren unterschiedlich sind:

Doppelsträngige DNA:	1 OD ₂₆₀ = 50 µg/ml
Einzelsträngige DNA oder RNA	1 OD ₂₆₀ = 40 µg/ml
Oligonukleotide	1 OD ₂₆₀ = 20 µg/ml

Exakte Konzentrationsbestimmungen erhält man nur in Absorptionsbereichen von 0,1 bis 0,7. Wird zudem auch die Absorption bei $\lambda = 280$ gemessen, so kann der Reinheitsgrad der DNA überprüft werden. Bei dieser Wellenlänge haben die Reste der aromatischen Aminosäuren (Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin und Histidin) ihr Absorptionsmaximum. Hierfür wird der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ gebildet. Für eine saubere Nukleinsäure sollte er im Bereich um 1,8 liegen.

Kleinere Mengen an Nukleinsäuren werden durch Abschätzung im Agarosegel im Vergleich zu einer bekannten Menge an DNA-Marker quantitiert. Hierfür wird die Probe zusammen mit einer bekannten Menge an DNA-Marker (2-log-ladder, Roche, Mannheim) mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Konzentration nach

Ethidiumbromidfärbung durch Vergleich der Bandenintensität der Probe mit den Markerbanden unter UV-Licht bestimmt.

3.2.1.2. Restriktionsverdau

Spaltungen von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen der Firmen Roche, Mannheim und New England Biolabs, Frankfurt erfolgten unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen bei 37° C für drei Stunden in den entsprechenden Puffern. Die Reaktionen wurden bei einer BSA-Konzentration von 0,1 µg/µl durchgeführt.

3.2.1.3. Dephosphorylierung von 5'-überhängenden DNA-Enden

Um bei der folgenden Ligation eine Religation des Vektors zu vermeiden, wurden die Phosphatreste an den 5'-überhängenden Enden der geschnittenen Plasmid-DNA entfernt. Dazu wurde das Volumen des Restriktionsansatzes der geschnittenen Vektor-DNA mit 100 mM Tris/HCl pH 8,0 auf das Doppelte erhöht und mit 1U Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm („calf intestine phosphatase, CIP“, Roche, Mannheim) 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Durch Zugabe von 0,5 M EDTA auf eine Endkonzentration von 10 mM wurde das Enzym inaktiviert. Der Ansatz wurde mit 5x DNA-Probenpuffer versetzt und die DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.2.1.5.) aufgetrennt.

3.2.1.4. Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide zu doppelsträngiger DNA für Klonierungen

Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in RNase-freiem Wasser gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. Je 2 µg der komplementären Oligonukleotide wurden in 50 µl 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl, pH 8,0 für 3 Minuten auf 95° C inkubiert. Die Lösung kühlte dann langsam auf dem ausgeschalteten Heizblock auf 37° C ab und wurde für eine weitere Stunde bei 37° C inkubiert. Die abgekühlte, hybridisierte DNA wurde bei -20° C gelagert und bei Gebrauch auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

3.2.1.5. Agarose Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophoresen wurden in 1x TAE-Puffer durchgeführt. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA wurden Gele von 0,5 % bis 4,0 % (w/v) Agarose verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht und nach dem Abkühlen auf etwa 60° C mit 1 µl Ethidiumbromidlösung (1mg/ml) pro 50 ml Gellösung versetzt. Die DNA-Lösung wurde vor dem Auftrag mit 5x DNA-Probenpuffer versetzt. Als Größenstandard diente entweder eine 100 bp Leiter (Invitrogen, Karlsruhe) oder ein 2-log Marker (Roche, Mannheim).

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit der Firma Amersham, Freiburg, nach Angaben des Herstellers aus Agarosegelen isoliert.

Material:

1x TAE-Puffer	40 mM Tris
	20 mM Eisessig
	1 mM EDTA
5x DNA-Probenpuffer	50 % (v/v) Glycerin
	0,25 % (w/v) Bromphenolblau
	0,25 % (w/v) Xylen-Cyanol FF

3.2.1.6. Ligation

Ligationen erfolgten bei einem molaren Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 mit 200 ng Vektor-DNA und 1 U T4-DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe) in einem Gesamtvolumen von 10 µl über Nacht bei 16° C unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen.

3.2.1.7. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Von einer *E. coli* XL1-Blue Übernachtskultur (5 ml LB-Medium) wurden 1 ml auf 100 ml LB-Medium überimpft und die Bakterien bei 200 UpM und 37° C bis zu einer optischen Dichte bei $\lambda = 600$ nm von 0,5 bis 0,7 kultiviert. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend bei 4° C für 12 Minuten bei 3.500 UpM in einer Sigma 4K15 Laborzentrifuge abzentrifugiert.

Die Bakterien wurden in 50 ml eiskalter, steriler 100 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert und nach einer dreißigminütigen Inkubation auf Eis erneut wie oben zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 50 ml eiskalter, steriler 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Schließlich wurden die Bakterien in 2 ml eiskalter, steriler 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 24 Stunden auf Eis bei 4° C gelagert. Nach Zugabe von 2,5 ml eiskalter, steriler CaCl₂-Lösung und 0,5 ml Glycerin (steril) wurden die Bakterien zu je 100 µl aliquotiert und bei -70° C gelagert. Die Transformationseffizienz angegeben in Anzahl der Kolonien/µg DNA wurde mittels Testtransformation einer bestimmten Menge Plasmid-DNA kontrolliert.

3.2.1.8. Transformation von *E. coli* mit Plasmiden

Chemisch kompetente XL1-Blue wurden auf Eis aufgetaut, mit 1,5 µl Ligationsansatz versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42° C, wonach die Ansätze sofort wieder für 2 Minuten auf Eis gebracht wurden. Nach der Zugabe von je 900 µl SOC-Medium wurden die Ansätze für 45 Minuten bei 200 UpM und 37° C kultiviert. Dann wurden die Zellen kurz abzentrifugiert und 800 µl des Überstandes abgenommen. Im restlichen Medium wurden die Bakterien resuspendiert und auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht mit der Agarschicht nach oben bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

Material:

SOC-Medium: 2 % Bacto Tryptone
 0,5 % Bacto Hefeextrakt
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10 mM MgCl₂
 10 mM MgSO₄
 20 mM Glukose

3.2.1.9. Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Mini-Lysat-DNA)

Die Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Mini-Lysate) wurde mit Hilfe des GFX Micro Plasmid Prep Kit der Firma Amersham, Freiburg, nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte entweder in 100 µl bidestilliertem, autoklavierten Wasser oder in 100 µl 2/02 TE-Puffer.

Die Identifikation rekombinanter Plasmide erfolgte durch Restriktionsanalyse von Mini-Lysat-DNA. Positiv identifizierte rekombinante Plasmide wurden zur Verifizierung sequenziert.

Material:

2/02 TE-Puffer	2 mM Tris/HCl pH 8,0
	0,2 mM EDTA pH 8,0

3.2.1.10. Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

100 ml LB-Medium (+Antibiotikum) wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden rekombinanten Bakterienklons angeimpft. Die Kultur wurde bei 200 UpM und 37° C bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bis 0,8 ($\lambda = 600$ nm) inkubiert. Dann wurden die Bakterien abzentrifugiert. Die Präparation der DNA wurde mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde je nach Menge in 100 – 250 µl 10/1 TE-Puffer resuspendiert und Konzentration und Reinheit photometrisch bestimmt.

Material

10/1 TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0
	1 mM EDTA pH 8,0

3.2.1.11. Generierung von siRNA-Expressionsplasmiden zur Niederregulation von Proteinen

„Small Interfering RNAs“ (siRNAs) sind kurze, doppelsträngige RNA-Moleküle, die über einen zellulären Prozess, der RNA Interferenz (RNAi), zur Degradierung von mRNA mit komplementärer Sequenz führen (Elbashir *et al.*, 2001a). Es besteht die Möglichkeit, siRNA *in vitro* zu synthetisieren und direkt in die Zellen zu transfizieren oder aber man verwendet Plasmide, die für die siRNA kodieren. Werden solche

Plasmide in Zellen transfiziert, so wird in den Zellen funktionelle siRNA exprimiert (Sui *et al.*, 2002). Solche siRNA-Expressions-Vektoren haben den Vorteil, dass die Expression der gewünschten Zielgene für Wochen oder sogar Monate reduziert werden kann (Brummelkamp *et al.*, 2002). Durch die transiente Transfektion von synthetischer siRNA werden allenfalls 6-10 Tage lang eine Niederregulation erreicht (Byrom *et al.* 2002). Durch die Existenz eines Anitbiotikum-Resistenzgens auf dem Vektor können siRNA-exprimierende Zellen durch Selektion für Kurzzeit-Versuche angereichert oder für Langzeit-Versuche auch kloniert werden. Am geeignetsten für die siRNA-Expression in Zellen ist der Promotor für die RNA-Polymerase III. Die RNA-Polymerase III produziert große Mengen an kleinen RNAs unter Verwendung relativ einfacher Promotor- und Terminator-Sequenzen. Der Terminator besteht aus wenigen Uridinen, normalerweise 3 – 4 Nukleotide, was gut zum originalen siRNA-Design passt, das mit einem 3'-Überhang aus zwei Uridinen endet (Elbashir *et al.*, 2001b).

Die prototypische siRNA besteht aus zwei hybridisierten 21-meren RNA-Molekülen mit 19 komplementären Nukleotiden und 3' terminalen Dinukleotid-Überhängen. In dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten System der Firma Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, UK, wird die siRNA als ein einzelnes Molekül exprimiert, das eine 19-meren „Hairpin“-Struktur mit einem Loop und einem 3' terminalen Uridin-Schwanz besitzt (Paddison *et al.*, 2002). In Abb. 3.2.1.11.1. ist die resultierende Struktur schematisch dargestellt.

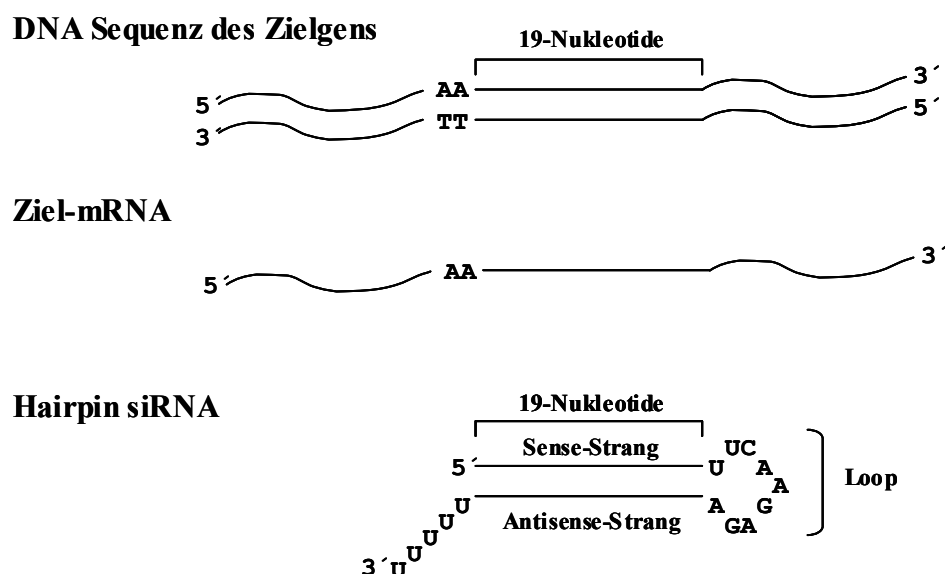


Abb. 3.2.1.11.1. Schematische Darstellung der entstehenden siRNA-Struktur.
(nach http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html)

In der vorliegenden Arbeit sollte die Expression der Tyrosin-Kinase c-Abl reduziert werden. Hierfür wurde der Vektor pSilencer3.1-H1 hygro (Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, UK) verwendet. Auf diesem Vektor wird die siRNA-Expression vom H1 RNA-Polymerase III Promotor kontrolliert (Myslinski *et al.*, 2001). Für die Selektion von geeigneten Ziel-Bereichen in der mRNA von c-Abl wurde gemäß den Vorgaben des Herstellers die mRNA-Sequenz von c-Abl nach AA-Dinukleotid-Sequenzen durchsucht. Da Bereiche der mRNA, die für strukturell und funktionell wichtige Proteindomänen kodieren, sehr effiziente Ziele für die Niederregulierung sind, wurde auf solche Bereiche der c-Abl mRNA besondere Gewichtung gelegt. Strukturell und funktionell wichtige Domänen sind bei c-Abl vor allem die N-terminal gelegene SH3- (Bindung an prolinreiche Regionen), die SH2- (Bindung an Phospho-Tyrosin-Reste) und die SH1- (Kinase-Aktivität) Domäne. Innerhalb dieses Bereichs liegen zudem spezielle Regionen und Aminosäuren, die für die Aktivierung und die Kinase-Aktivität von c-Abl wichtige Rollen spielen (Roskoski, 2003). Die auf die AA-Dinukleotid-Sequenz folgenden 19 Nukleotide stellen mögliche siRNA Ziel-Bereiche dar. Daraus resultiert eine siRNA mit 3' UU-Dinukleotid-Überhängen. Diese Design-Strategie hatte sich bisher als die effizienteste Methode erwiesen (Elbashir *et al.*, 2001b). Sie bedient sich zudem der Tatsache, dass die RNA-Polymerase III eine Terminator-Sequenz auf der DNA aus 4-6 T-Nukleotiden verwendet und somit RNA-Moleküle mit kurzem poly(U)-Schwanz entstehen. Die so gefundenen möglichen mRNA-Ziel-Bereiche wurden dann auf folgende Eigenschaften hin untersucht:

1. es sollten innerhalb der Sequenz nicht mehr als 4 T-Nukleotide hintereinander liegen, da das ansonsten von der RNA-Polymerase III als Terminationssequenz gelesen werden könnte.
2. es sollte mit den gefundenen Sequenzen eine Suche auf BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) durchgeführt werden, um eine Homologie zu anderen Genen außer c-Abl und damit eine Niederregulierung anderer Proteine ausschließen zu können.
3. es sollten die Sequenzen möglichst einen G/C-Gehalt von 30 – 50 % besitzen.

Gemäß diesen Regeln wurden fünf Ziel-Regionen auf der mRNA gewählt. Für eine genaue Beschreibung dieser Bereiche siehe unter den entsprechenden siRNA-Expressionsplasmiden (3.1.10.).

Aus diesen Bereichen wurden nun die Sequenzen der zu synthetisierenden zueinander komplementären Einzelstrang-Oligonukleotide für die Klonierung in den Vektor bestimmt. Der Hersteller gibt hierfür ein Sequenz-Gerüst vor, das später in der Zelle zur Ausbildung der „Hairpin“-Struktur der siRNA führt (siehe Abb. 3.2.1.11.2.).

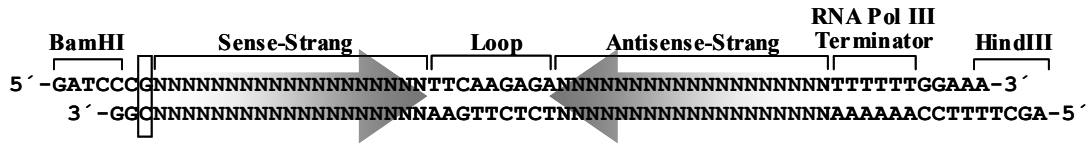


Abb. 3.2.1.11.2. Schema des Aufbaus der Einzelstrang-Oligonukleotide für die Expression von siRNA über den Vektor pSilencer3.1HI hygro. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *BamHI* und *HindIII*, die Region, die den Loop bildet und die Terminationssequenz für die RNA-Polymerase III sind gekennzeichnet, die Sense- und die Antisense-DNA-Sequenzen, die für die siRNA kodieren, sind mit einem Pfeil hinterlegt. Die Stelle, an der das zusätzliche Guanin für einen optimalen Transkriptionsstart für die RNA-Polymerase III eingefügt werden sollte, ist umrahmt. (Nach http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html)

Hierfür wird der 19-Nukleotid Bereich der mRNA in DNA-Sequenz als Sense-Strang mit dem Antisense-Strang über eine kurze Sequenz verbunden, die später den Loop ausbildet. Die vom Hersteller vorgeschlagene Sequenz 5'-TTCAAGAGA-3' ist nur eine von vielen Möglichkeiten. Nach dem Antisense-Strang folgt dann als Terminationssequenz für die RNA-Polymerase III, eine kurze Poly(T)-Sequenz (5-6 Nukleotide). Die Funktion der direkt darauf folgenden Sequenz 5'-GGAA-3' wird noch nicht vollständig verstanden, ihr Einbau wird allerdings empfohlen. Für die spätere Klonierung der hybridisierten Oligonukleotide sind die 3'- und 5'-Enden der Oligonukleotide nicht komplementär zueinander und formen die Restriktionsstellen-Überhänge für die Restriktionsenzyme *BamHI* und *HindIII*, mit denen auch der Zielvektor pSilencer3.1-HI#WZ linearisiert wurde. Da die RNA-Polymerase III die Transkription bevorzugt an einem Purin beginnt, sollte die siRNA mit einem Adenin oder einem Guanin beginnen (erstes Nukleotid des 19-meren Sense-Strang). Ist das nicht der Fall, so sollte zwischen der *BamHI*-Restriktionsstelle und dem ersten Nukleotid der siRNA ein zusätzliches Guanin (Sense-Strang) eingefügt werden. Die Sequenzen der einzelnen Oligonukleotide sind unter 3.1.11. aufgelistet. Die lyophilisiert gelieferten Einzelstrang-Oligonukleotide wurden zunächst in H₂O gelöst, photometrisch quantifiziert und wie unter 3.2.1.4. beschrieben hybridisiert. Nach Verifizierung der Hybridisierung auf einem 4 %igen Agarosegel konnten die entstandenen Doppelstrang-siRNA-Inserts direkt in den Vektor pSilencer ligiert werden.

3.2.2. Zellbiologische Methoden

3.2.2.1. Passagieren und Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Bei Bedarf, spätestens bei Konfluenz, wurden die Zellen mit 1x PBS (Gibco, Karlsruhe) gewaschen und solange mit 1x Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco, Karlsruhe) inkubiert, bis sich die Zellen durch leichtes Klopfen ablösen ließen. Anschließend wurde das entsprechende Medium zugesetzt und die Zellsuspension in entsprechender Verdünnung in neue Zellkulturschalen ausgesät. Die Kultivierung erfolgte bei 37° C, unter 5 % CO₂ und in mit H₂O gesättigter Atmosphäre. Zu den einzelnen Medien für die verschiedenen Zelllinien siehe 3.1.6.

3.2.2.2. Einfrieren und Lagerung von Zellen

Zur längeren Lagerung und Sicherung wurden die Zellen wie unter 3.2.2.1. beschrieben trypsiniert und 5 Minuten bei 1.000 UpM in einer Sigma 4K15 Laborzentrifuge vorsichtig sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in entsprechendem Medium mit Zusatz von 10 % DMSO und 20 % fötalem Kälberserum aufgenommen. Je 1 ml wurde in vorgekühlte Kryoröhrchen (Corning, NE Schiphol-Rijk, Niederlande) überführt und sofort in Styropor verpackt bei -70° C eingefroren. Am nächsten Tag wurden sie zur endgültigen Lagerung bei -196° C eingefroren.

3.2.2.3. Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellen wurden möglichst schnell bei 37° C aufgetaut und ohne Verzug in das entsprechende Medium überführt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 1.000 UpM wurden die Zellen in frisches Medium aufgenommen und ausgesät.

3.2.2.4. Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Lipofektion

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden mittels Lipofektion mit Fugene (Roche, Mannheim) transfiziert. Hierfür wurden jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen in 5 ml Medium auf einer Zellkulturschale von 6 cm Durchmesser ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurde in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß 94 µl entsprechendes

Medium ohne fötales Kälberserum mit 6 µl Fugene-Transfektionsreagenz vermischt und 2 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA dazu pipettiert. Nach einer fünfzehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei den Zellen das Medium gewechselt, der gesamte Transfektionsansatz auf die Zellen getropft und durch leichtes Schwenken der Platte mit dem Kulturmedium gemischt. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium erneut gewechselt und nach weiteren 48 Stunden die Zellen geerntet. Für die Expression der Transdominant-Negativ-Mutante von c-Abl erfolgte die Zell-Ernte 96 Stunden nach der Transfektion.

3.2.2.5. Behandlung von Zellen mit STI571 bzw. anderer Substanzen (Screening)

Die meisten in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Behandlungen von Zellen mit STI571 bzw. die Behandlungen im initial durchgeführten Screenings fanden für drei Tage mit einer Konzentration von 10 µM statt. In dieser Zeit fand kein Mediumwechsel oder eine erneute Zugabe der Substanz statt. In Fällen einer zweitägigen Behandlung mit 10 µM STI571 wurde ebenfalls nicht das Medium gewechselt. Bei längerer Behandlung mit STI571 wurden Medium und Substanz alle drei Tage gewechselt. Wurden die Zellen nur für einen Tag mit STI571 behandelt, beispielsweise bei der Bestimmung der Halbwertszeit, wurden die Zellen mit 20 µM STI571 behandelt.

Für die Bestimmung der IC₅₀ wurden die Zellen gemäß Korth *et al.* (2001) für sechs Tage mit STI571 behandelt, wobei Medium und Substanz täglich gewechselt wurden.

Für die Inhibition der Wirkung von STI571 mit NH₄Cl wurden die Zellen insgesamt 2 Tage lang mit 10 µM STI571 behandelt. Hierbei wurde jedoch am zweiten Tag das Medium gewechselt und sowohl STI571 als auch NH₄Cl zugegeben.

3.2.2.6. Zytotoxizitätstests

Um einen Einfluß von STI571 auf die Vitalität der Zellen sicher ausschließen zu können, wurden Zytotoxizitätstests durchgeführt.

MTT-Assay

Beim MTT-Assay handelt es sich um einen kolorimetrischen, nicht radioaktiven Test, der auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalses 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-

Diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) zu lila Formazankristallen durch zelluläre mitochondriale Dehydrogenasen beruht. Diese Dehydrogenasen spalten den Tetrazoliumring im MTT-Tetrazoliumsalz, welches dadurch zu MTT-Formazan umgewandelt wird. Die wasserunlöslichen Formazankristalle werden anschließend in saurem Milieu mit 2-Propanol gelöst. Die Absorption der entstandenen Formazanlösung kann photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 550 - 600$ nm bestimmt werden. Die Spaltung ist direkt proportional zur Zellzahl und spiegelt die Vitalität der Zellen wieder. Für den MTT-Assay wurden in eine 96-Well-Zellkulturplatte 10.000 Zellen pro Well in 100 μ l Medium ausplattiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit 10 μ M STI571 bzw. mit 10 μ M einer im Screening als toxisch eingestuften Substanz (als Positiv-Kontrolle) behandelt. Als Negativ-Kontrolle dienten mock-behandelte Zellen. Nach 72 Stunden wurden je 20 μ l MTT-Stocklösung auf die Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken der Platte mit dem Kulturmedium gemischt. Nach einer dreistündigen Inkubation der Zellen unter normalen Zellkulturbedingungen wurde der Zellüberstand abgesaugt und je 150 μ l 2-Propanol/0,03 M HCl auf die Zellen gegeben. Die Platte wurde leicht geschüttelt und für zwei weitere Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Die Absorption der entstandenen Lösung wurde anschließend am Sunrise ELISA-Reader (Tecan, Maennedorf, Schweiz) bei $\lambda = 570$ nm gemessen.

Material:

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid) Stocklösung
5 mg/ml in PBS

Trypanblau-Färbung

Trypanblau ist ein membranimpermeabler Farbstoff, der nur tote Zellen oder Zellen mit beschädigter Plasmamembran anfärbt. Durch Auszählung gefärbter und nicht gefärbter Zellen kann somit der prozentuale Anteil der toten Zellen bestimmt werden.

Für den Test wurden zunächst $2,5 \times 10^5$ Zellen in 5 ml Medium auf eine 6 cm Zellkulturschale ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit 10 μ M STI571 behandelt. Als Negativ-Kontrolle dienten mock-behandelte Zellen. Nach 72 Stunden wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen, mit 1 ml 1x PBS/1mM EDTA abgelöst und in 5 ml 1x PBS aufgenommen. Je 150 μ l Zellsuspension wurden mit 150 μ l 0,4 % Trypanblaulösung (Sigma, München) vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde ein Aliquot des Färbeansatzes in

einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt und der prozentuale Anteil an toten Zellen bestimmt.

3.2.2.7. Verfahren zur Fluoreszenzmarkierung zellulärer Proteine

Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Oberflächenexpression von PrP^c unter Behandlung mit STI571 wurde unter anderem mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dieses Verfahren erlaubt im Gegensatz zur Immunfluoreszenz auch quantitative Aussagen. Da die Zellen weder fixiert noch permeabilisiert werden, können tote Zellen durch Anfärbung der DNA detektiert und von der Quantifizierung ausgeschlossen werden. PrP^c wurde zunächst durch einen spezifischen Antikörper markiert und dann mit Hilfe eines Fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpers detektiert.

Im Durchflusszytometer werden die Zellen im Probenstrom von einem Hüllstrom umgeben. Auf den Probenstrom wird Laserlicht mit $\lambda = 488 \text{ nm}$ fokussiert, welches gestreut wird, sobald es auf einen Partikel (Zelle) trifft. Wird das gestreute Licht von Fluoreszenzfarbstoffen an dieser Zelle absorbiert, so wird es mit niedrigerer Wellenlänge wieder emittiert. Diese Veränderungen des Anregungslichts (Streuwinkel, Wellenlänge etc.) werden von verschiedenen Photomultipliern im Gerät erfasst, was dann Aussagen über Größe, Oberflächenbeschaffenheit und Granulation des Partikels (Zelle) zulässt. Außerdem können bis zu vier Fluoreszenzsignale erfasst werden.

Für die Untersuchung wurden $1,25 \times 10^5$ Zellen in 5 ml auf einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit $10 \mu\text{M}$ STI571 behandelt. Als Kontrolle dienten mock-behandelte Zellen. Nach 72 Stunden wurden die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen, mit 1 ml 1x PBS/1mM EDTA abgelöst und mit 5 ml FACS-Puffer gemischt. Sämtliche nun folgenden Inkubationen erfolgten auf Eis, die Zentrifugationen bei 4°C . 1 ml der Suspension wurde in ein FACS-Probenröhrchen überführt und zum Blocken für 5 Minuten inkubiert. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 1.200 UpM wurden die Zellen in $100 \mu\text{l}$ Erstantikörperlösung resuspendiert (Anti-PrP Antikörper A7 1:100 in FACS-Puffer) und für 45 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von $500 \mu\text{l}$ FACS-Puffer wurde erneut für 2 Minuten bei 1.200 UpM zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit je $500 \mu\text{l}$ FACS-Puffer gewaschen, nach dem letzten Zentrifugationsschritt in $100 \mu\text{l}$ Zweitantikörperlösung (FITC-markiertes Ziege Anti-

Kaninchen IgG, 1:100 in FACS-Puffer) resuspendiert und erneut für 45 Minuten inkubiert. Danach wurden wiederum 500 µl FACS-Puffer hinzugegeben, der Ansatz für 2 Minuten bei 1.200 UpM zentrifugiert und die Zellen erneut zweimal mit je 500 µl FACS-Puffer gewaschen. Für die Anfärbung toter Zellen wurden die Zellen nach der letzten Zentrifugation in 500 µl FACS-Puffer mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid (2 µg/ml) resuspendiert. Als Negativ-Kontrolle dienten Zellen, die nur in Zweitantikörperlösung inkubiert worden waren. Die Messung erfolgte am FACSCalibur Gerät (Becton Dickinson, Heidelberg). Von jeder Probe wurden 10.000 lebende Zellen analysiert.

Material:

FACS-Puffer 2,5 % (v/v) fötales Kälberserum
 0,05 % (w/v) Natriumazid
 in 1x PBS

Indirekter Immunfluoreszenztest und konfokale Mikroskopie

Im Gegensatz zur Durchflusszytometrie, bei der die Proteinfärbung in einer flüssigen Phase durchgeführt wird, werden bei dem Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz die Zellen nicht abgelöst, sondern auf Deckgläschen ausgesät, auf denen sie dann *in situ* gefärbt werden.

Zunächst wurden $1,25 \times 10^5$ Zellen in 5 ml in 6 cm Zellkulturschalen auf mit Poly-L-Lysin gecoateten Deckgläschen (Marienfeld, Bad Mergentheim) ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit 10 µM STI571 behandelt. Nach 72 Stunden wurden die Zellen gefärbt. Als Kontrolle dienten mock-behandelte Zellen.

Sämtliche Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wurden die Deckgläschen einmal mit 1x PBS gewaschen und die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd in 1x PBS für 30 Minuten fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit 1x PBS gewaschen und für je 10 Minuten mit Quench-Lösung behandelt, dann mit 0,3 % Triton X-100 in 1x PBS permeabilisiert und schließlich zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in 0,2 % Gelatine in 1x PBS inkubiert. Zwischen jeder Behandlung wurden die Zellen je dreimal mit 1x PBS gewaschen.

Für die Antikörperinkubationen wurden die Deckgläschen mit 25 µl Antikörperlösung inkubiert. Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, fanden beide Antikörperinkubationen in einer feuchten Kammer statt.

Für die Färbung des lysosomalen Membranproteins Lamp1 wurden die Zellen mit Anti-CD107a (Lamp-1) Antikörper inkubiert (1:100 in 1x PBS). Die Zweitantikörperinkubation wurde nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS mit Texas Red-markiertem Esel Anti-Ratte IgG (1:100 in 1x PBS) durchgeführt.

Für die Oberflächenfärbung von PrP wurden die Deckgläschen (Anti-PrP Antikörper A7, 1:100 in 1x PBS) für 1 Stunde mit Erstantikörperlösung auf Eis inkubiert. Erst danach wurden die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen, in 4 % Paraformaldehyd für 30 Minuten fixiert und wie oben beschrieben weiter behandelt. Nach der Inkubation in 0,2 % Gelatine fand direkt die Zweitantikörperinkubation in FITC-markiertem Ziege Anti-Kaninchen IgG (1:100 in 1x PBS) statt.

Zum Eindecken wurden die Zellen dreimal mit 1x PBS gewaschen und mit dem Zellrasen nach unten in Eindeckmedium (Histogel, Linaris, Wertheim-Bettingen) auf Objektträgern (Marienfeld, Bad Mergentheim) eingedeckt und bei 4° C getrocknet. Nach 24 Stunden wurde das Ergebnis mit einem Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop dokumentiert (Leica TNCsNT/DMIRB Confocal System, Herbrugg, Schweiz).

Material:

Quench-Lösung: 50 mM NH₄Cl
20 mM Glycin
in 1x PBS

3.2.2.8. Metabolische Radiomarkierung zellulärer Proteine

Die Radio-Markierung lebender Zellen ist ein sehr sensibles Verfahren, um die Biogenese und den Metabolismus zellulärer Proteine zu untersuchen. Die Zellen werden zunächst für 1 Stunde in Mangelmedium, ohne die Aminosäuren Cystein und Methionin, gehalten („Aushungern“), dem danach ³⁵S-markierte Aminosäuren (Methionin, Cystein) zugegeben werden. Die radioaktiv markierten Aminosäuren werden durch das Aushungern noch effizienter bei der Translation in entstehende Proteine eingebaut. Je nach untersuchtem Protein (PrP^c, PrP^{Sc}) beträgt die Markierungszeit zwischen 1 und 16 Stunden. Vom Versuch abhängig werden die Zellen nach dem Markieren zum Herstellen postnukleärer Extrakte entweder direkt lysiert (Untersuchung der Protein-Neubildung) oder nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS

in normalem Kulturmedium für bis zu 24 Stunden weiterkultiviert (Untersuchung der Halbwertszeit).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit diesem Verfahren der Einfluß von STI571 auf die Halbwertszeit und die Neubildung von PrP^{Sc} untersucht.

Zunächst wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 5 ml Medium auf 6 cm Zellkulturschalen ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 1 Stunde in 1 ml RPMI-Mangelmedium inkubiert. Nach Zugabe von 800 $\mu\text{Ci/ml}$ L-[³⁵S]Met/Cys (Promix, Amersham, Freiburg) zum RPMI-Mangelmedium wurden die Zellen für weitere 16 Stunden inkubiert.

Für die Untersuchung der Neubildung von PrP^{Sc} wurden die Zellen während des Hungerns und der Markierung mit 10 μM STI571 oder 200 $\mu\text{g/ml}$ Suramin behandelt. Als Kontrolle dienten mock-behandelte Zellen. Nach der Markierung wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und mit 1 ml PN-Lyse-Puffer für 10 Minuten auf Eis lysiert.

Für die Halbwertszeitversuche wurden die Zellen nach dem Markieren zweimal mit warmen 1x PBS gewaschen und für bis zu 24 Stunden in 5 ml Kulturmedium weiterkultiviert. Im Gegensatz zu den Untersuchungen der Neubildung von PrP^{Sc} fand die Markierung ohne Behandlung statt und erst jetzt wurde dem Medium 20 μM STI571 zugegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen je einer Zellkulturschale zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und mit 1 ml PN-Lyse-Puffer für 10 Minuten auf Eis lysiert. Die Lyse zum Zeitpunkt „0“ fand ohne vorherigen Mediumswechsel direkt nach dem Markieren statt.

Für die Untersuchungen mit dem Protease-Inhibitor Pepstatin A wurde dem Medium bereits während des Hungerns und der Markierung 10 μM Pepstatin A (bzw. als Negativ-Kontrolle 5 μM Marimastat) beigelegt. Nach der Markierung wurden die Zellen dann zweimal mit warmen 1x PBS gewaschen und für bis zu 24 Stunden in 5 ml Kulturmedium weiterkultiviert. Hierbei wurden sie entweder mit 20 μM STI571, mit 10 μM Pepstatin A oder jeweils in Kombination (bzw. als Negativ-Kontrolle mit 20 μM STI571 und 5 μM Marimastat) behandelt. Als Kontrolle dienten jeweils mock-behandelte Zellen. Nach 0, 12 und 24 Stunden wurden Zellen je einer Zellkulturschale zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und mit 1 ml PN-Lyse-Puffer auf Eis lysiert. Die Lyse zum Zeitpunkt „0“ fand ohne vorherigen Mediumswechsel direkt nach dem Markieren statt.

Für alle Untersuchungen wurden die Lysate nach der zehnmütigen Lyse auf Eis für 1 Minute bei 14.000 UpM in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und die postnukleären Extrakte zunächst einem Proteinase K-Verdau (siehe 3.2.3.3.) und anschließend einem Löslichkeits-Assay (siehe 3.2.3.4.) unterworfen. Das nach der Ultrazentrifugation des Löslichkeits-Assays entstandene Präzipitat wurde in 100 µl IP-Puffer resuspendiert und für eine Immunpräzipitation von PrP (siehe 3.2.3.6.) eingesetzt.

Die Sepharose wurde nach der Immunpräzipitation wie unter 3.2.3.6. beschrieben fünfmal mit kaltem IP-Puffer gewaschen und in 20 µl 0,1M β-Mercaptoethanol/0,5 % SDS für 10 Minuten auf 95° C inkubiert. Diese Behandlung führte zur Dissoziation gebundener Antikörper/Protein-Komplexe von der Sepharose. Die Proben wurden 1 Minute auf Eis abgekühlt und für 3 Minuten bei 14.000 UpM abzentrifugiert. Die das immunpräzipitierte PrP enthaltenden Überstände wurden in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 20 µl Deglycosylierungs-Mix gemischt und über Nacht bei 37° C inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl 3x SDS-Probenpuffer wurden die Proben für 10 Minuten bei 95° C aufgeköcht, kurz auf Eis abgekühlt und einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen (siehe 3.2.3.7.). Das Gel wurde auf einem Geltrockner (Unigeldryer 4050, UniEquip, Martinsried) getrocknet und ein Autoradiogramm angefertigt. Die Signale wurden mittels Exposition des getrockneten Gels auf einem Phosphor Imaging Screen und Detektion an einem Storm Phosphor Imager (Amersham, Freiburg) quantifiziert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageQuant (Amersham, Freiburg).

Material:

RPMI-Mangelmedium	RPMI 1640 mit L-Glutamin/-Met; -Cys 1 % fötales Kälberserum 100 IU/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
PN-Lyse-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5 100 mM NaCl 10 mM EDTA 0,5 % (v/v) Triton X-100 0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholsäure
IP-Puffer	0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholsäure 0,5 % (v/v) Triton X-100 1 % (w/v) SDS

in 1x PBS

Deglycoslierungs-Mix (pro Ansatz) 0,25 µl PNGaseF (1U/µl)

2,5 µl 1 % (w/v) Pefabloc

17,25 µl PN-Lyse-Puffer

3.2.2.9. *Verfahren zum Nachweis von in vivo Tyrosin-Phosphorylierungen zellulärer Proteine*

Um zu untersuchen, ob PrP in Zellen an Tyrosin-Resten phosphoryliert ist, wurden von zu etwa 80 % konfluenten 10 cm Zellkulturschalen das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen. Um bestehende Tyrosin-Phosphorylierungen anzureichern, wurden die Zellen für 2 Stunden in Kulturmedium mit 1 mM Natriumorthovanadat (Na_3VO_4) inkubiert. Na_3VO_4 inhibiert zelluläre Tyrosin-Phosphatasen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Dann wurde das Medium von den Zellen entfernt, der Zellrasen zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und durch Lyse der Zellen mit 1 ml Phospho-PN-Puffer für 10 Minuten auf Eis postnukleäre Extrakte hergestellt. Nach einminütigem Abzentrifugieren bei 14.000 UpM und 4° C wurden vergleichbare Proteinmengen in 500 µl Volumen in frische 1,5 ml Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und zur Trennung von PrP^c und PrP^{Sc} einem Löslichkeits-Assay unterzogen (siehe 3.2.3.4.). Darauf wurden sowohl die Überstände als auch die Präzipitate der Ultrazentrifugation wie in 3.2.3.6. beschrieben in einer Immunpräzipitation mit einem Anti-PrP-Antikörper eingesetzt, wobei beim Waschen der Sepharose dem IP-Puffer zusätzlich 200 µM Na_3VO_4 zugesetzt wurde. Die spätere Analyse der Proben fand mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.2.3.7.) und Western Blot (3.2.3.8.), einmal mit einem Anti-PrP-Antikörper und einmal mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper, statt.

Material:

Natriumorthovanadat (Na_3VO_4) 1 mM Stocklösung in H_2O

Phospho-PN-Lyse-Puffer 10 mM Tris/HCl pH 7,5

100 mM NaCl

10 mM EDTA

200 µM Na_3VO_4

0,5 % (v/v) Triton X-100

0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholsäure

3.2.3. Biochemische Methoden

3.2.3.1. Herstellung von Proteinextrakten

Herstellung von postnukleären Extrakten

Zur Detektion von PrP in Zellen wurden postnukleäre Extrakte hergestellt. Hierfür wurde das Medium von den zu erntenden Zellkulturschalen abgenommen und die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen. Sollten die Extrakte später einer Immunpräzipitation (3.2.3.6.) unterzogen werden, wurden sämtliche Inkubationen auf Eis bzw. bei 4° C durchgeführt, ansonsten erfolgten sämtliche Arbeitsschritte bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden mit 1 ml PN-Lysispuffer (für 6 cm und 10 cm Zellkulturschalen) für 10 Minuten lysiert, das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 Minute bei 14.000 UpM abzentrifugiert. Der Überstand (ohne Kerne usw.) wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Wurde der Extrakt nicht sofort verwendet, konnte er bei -20° C gelagert werden.

Material:

PN-Lyse-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5
	100 mM NaCl
	10 mM EDTA
	0,5 % (v/v) Triton X-100
	0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholsäure

Herstellung von Gesamtzellextrakten

Für die Detektion von c-Abl in Zellen wurden Gesamtzellextrakte hergestellt. Hierzu wurde das Medium von der Zellkulturschale der zu lysierenden Zellen abgenommen und der Zellrasen einmal mit 1x PBS gewaschen. Für eine nachfolgende Immunpräzipitation (siehe Abschnitt 3.2.3.6.) von c-Abl und Einsatz des Enzyms im Kinase-Assay (siehe Abschnitt 3.2.3.9.), wurden die Zellen mit 1,5 ml (10 cm Zellkulturschale) bzw. 500 µl (6 cm Zellkulturschale) RIPA-Puffer für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 15 Minuten bei 14.000 UpM und 4° C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches

1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und entweder sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

Sollte das Lysat sowohl auf die Expression von c-Abl im Western Blot (siehe Abschnitt 3.2.3.8.) als auch auf den Gehalt an PrP^{Sc} mittels Proteinase K-Verdau (siehe Abschnitt 3.2.3.3.) untersucht werden, so wurden die Zellen mit 500 μl Abl-LP-Puffer für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 15 Minuten bei 14.000 UpM und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde immer sofort verwendet.

Material:

RIPA-Puffer	150 mM NaCl
	10 mM Tris/HCl pH 7,5
	1 mM EDTA
	1 % (v/v) Triton X-100
	1 % (w/v) Natriumdeoxycholsäure
frisch dazu	2 mM Natriumorthovanadat
	10 mM NaF
	0,1 mM Aprotinin
	1 mM Phenylmethylsulfonyl Fluorid
Abl-LP-Puffer	150 mM NaCl
	10 mM Tris/HCl pH 7,5
	25 mM β -Glycerophosphat
	2 mM EDTA
	2 mM EGTA
	10 % (v/v) Glycerin
	0,5 % (v/v) Triton
	0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholsäure

3.2.3.2. *Proteinbestimmung nach Bradford*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G-250 bei Bindung an Protein von $\lambda = 465\text{ nm}$ zu $\lambda = 595\text{ nm}$ in saurer Lösung, die photometrisch gemessen werden kann. Als Standard wurde BSA in Konzentrationen von 0,0 – 1,0 mg/ml verwendet. Um immer vergleichbare Proteinmengen in der SDS-Polyacrylamid-

Gelelektrophorese einsetzen zu können, wurde der Proteingehalt der zellulären Proteinextrakte bestimmt und die Auftragsmengen angeglichen.

Für die Messungen wurden von den Proteinextrakten 1:10 Verdünnungen in H₂O hergestellt. In einer Microtiterplatte wurden je 5 µl der Proteinstandards mit 250 µl des Farbreagenzes vermischt und nach zehnminütiger Inkubation die Absorption am Sunrise ELISA Reader (Tecan, Maennedorf, Schweiz) bei $\lambda = 595$ nm gemessen. Aus den gemessenen Extinktionen des Proteinstandards ließ sich eine Eichkurve erstellen, woraus sich unter Berücksichtigung der Verdünnungen die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmen ließen.

Material:

Farbreagenz Coomassie Protein Assay Reagent, Pierce, Bonn

3.2.3.3. Proteinase K-Verdau postnukleärer Extrakte

Eine Eigenschaft von PrP^{Sc} ist seine relative Resistenz gegenüber dem Verdau mit Proteinase K. In einem Lysat infizierter Zellen, das sowohl PrP^c als auch PrP^{Sc} enthält, ist nach einem Proteinase K-Verdau im Western Blot nur noch PrP^{Sc} zu detektieren, da PrP^c vollständig degradiert wird und somit nicht mehr nachweisbar ist. Daher ist der Proteinase K-Verdau eine gängige Methode, um PrP^{Sc} von PrP^c zu unterscheiden.

Hierfür wurden postnukleäre Zellextrakte (3.2.3.3.) verwendet. Sollte nicht die gesamte Probe mit Proteinase K verdaut werden, so wurde der Extrakt zu gleichen Teilen in zwei 15 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Hälfte, die nicht mit Proteinase K verdaut werden sollte, wurde sofort mit 0,04 % Pefabloc SC versetzt. Die Probe wurde sorgfältig mit 5x Volumen 100 % Methanol vermischt und die Proteine über Nacht bei -20° C gefällt. Die zweite Hälfte des Extraktes wurde mit 20 µg/ml Proteinase K gemischt und für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurde der Verdau durch Zugabe von 0,04 % Pefabloc SC gestoppt, der Ansatz zur Proteinfällung mit 5x Volumen 100 % Methanol vermischt und über Nacht bei -20° C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Fällungen für 25 Minuten bei 3.500 UpM und 4° C in einer Sigma 4K15 Laborzentrifuge abzentrifugiert und die Proteinpräzipitate nach dem Trocknen (ihrer Größe entsprechend) in TNE-Puffer resuspendiert. Hierbei wurde das Proteinpräzipitat der nicht mit Proteinase K verdauten Hälfte des Extraktes in der doppelten Menge an TNE-Puffer aufgenommen als die Proteinase K-verdaute Extrakthälfte. Die Proben wurden dann in 3x SDS-Probenpuffer aufgekocht, mittels SDS-Polyacrylamid-

Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.2.3.7.) und im darauf folgenden Western Blot (siehe 3.2.3.8.) analysiert.

Sollte der Extrakt nicht nur auf Proteinase K-Resistenz, sondern auch auf die Löslichkeit in nicht-ionischen Detergenzien hin untersucht werden, so wurde im Anschluß an den Proteinase K-Verdau ein Löslichkeits-Assay (3.2.3.4.) durchgeführt. Hierfür wurde der Extrakt in zwei Hälften auf zwei Ultrazentrifugationsröhrchen verteilt. Die Extrakthälfte, die nicht mit Proteinase K verdaut werden sollte, wurde mit 0,04 % Pefabloc SC versetzt und auf Eis gestellt. Die andere Hälfte des Extraktes wurde wie oben beschrieben mit Proteinase K verdaut. Nach Abstoppen des Verdau mit 0,04 % Pefabloc SC wurden beide Extrakthälften einem Löslichkeits-Assay unterzogen (siehe 3.2.3.4.).

Material

Proteinase K-Stocklösung	1 % (w/v) in H ₂ O
Pefabloc SC-Stocklösung	1 % (w/v) in H ₂ O
TNE-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl 5 mM EDTA

3.2.3.4. Löslichkeits-Assay

Eine weitere Eigenschaft in der sich PrP^{Sc} von PrP^c unterscheidet ist das Löslichkeitsverhalten in nicht-ionischen Detergenzien. Wird ein Lysat Prion-infizierter Zellen in 1 % Sarkosyl bei 100.000 g für 1 Stunde zentrifugiert, so präzipitiert das unlösliche PrP^{Sc} am Boden des Gefäßes, während PrP^c im Überstand zu detektieren ist. Der Löslichkeits-Assay stellt somit nicht nur eine Methode dar, um PrP^c von PrP^{Sc} zu unterscheiden, sondern über ihn lassen sich auch PrP^c und PrP^{Sc} in einem Lysat separieren und getrennt untersuchen. Zudem kann man durch Kombination von Proteinase K-Verdau und Löslichkeits-Assay eine noch genauere Unterscheidung zwischen den beiden Isoformen erzielen.

Für den Assay wurden postnukleäre Zellextrakte (3.2.3.1.) verwendet. Hierfür wurden die Extrakte mit 0,04 % Pefabloc Sc und 1 % Sarkosyl versehen und für 1 Stunde bei 100.000 g und 4° C in einer Beckman TL-100 Tischultrazentrifuge (TLA-45 Rotor) zentrifugiert. Sollte im Anschluss an den Löslichkeits-Assay eine Immunpräzipitation folgen, so wurde mit den Proben verfahren wie unter 3.2.3.6. beschrieben. Ansonsten

wurden die Überstände der Ultrazentrifugation in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und die Proteine durch sorgfältiges Vermischen mit 5x Volumen 100 % Methanol über Nacht bei -20° C gefällt. Am nächsten Tag wurden die gefällten Überstände für 25 Minuten bei 3.500 UpM und 4° C in einer Sigma 4K15 Laborzentrifuge abzentrifugiert und das getrocknete Proteinpellet (je nach Größe) in 50 – 100 µl TNE-Puffer resuspendiert. Die unlöslichen Präzipitate der Ultrazentrifugation wurden entsprechend ihrer Größe in 25-50 µl TNE-Puffer resuspendiert. Hierbei wurden die Proteine aus der Fällung des Ultrazentrifugations-Überstands immer in doppelt soviel TNE aufgenommen als die Präzipitate aus der Ultrazentrifugation. Wurde zudem noch ein Proteinase K-Verdau (3.2.3.3.) dem Löslichkeits-Assay vorangestellt, so wurden die gefällten Überstände bzw. die Ultrazentrifugationspräzipitate der nicht verdauten Extrakthälfte in doppelt soviel TNE aufgenommen als die gefällten Überstände bzw. Ultrazentrifugationspräzipitate aus der Proteinase K-verdauten Extrakthälfte.

Nach der Resuspension in TNE-Puffer wurden die Proben in 3x SDS-Probenpuffer für 10 Minuten bei 95° C aufgeköcht und einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 3.2.3.7.) mit anschließendem Western Blot (siehe 3.2.3.8.) unterzogen.

Material:

Sarkosyl- (N-Lauroylsarkosin-) Stocklösung	10 % (w/v) in H ₂ O
Pefabloc SC-Stocklösung	1 % (w/v) in H ₂ O
TNE-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl 5 mM EDTA

3.2.3.5. Verdau mit PIPLC (*Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C*)

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

Am Tage des Verdaus sollten die Zellen zu etwa 80 % konfluent sein. Das Medium der zu untersuchenden Zellen wurde abgenommen und der Zellrasen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Je 6 cm Zellkulturschale wurden 2 ml Kulturmedium ohne Kälberserum auf die Zellen gegeben. Waren die Zellen bisher einer bestimmten Behandlung unterzogen worden (beispielsweise mit STI571), so wurden die Zellen auch während des Verdaus mit der Substanz behandelt. Dem Medium wurden 200 mU PIPLC (Sigma, München) beigelegt und die Zellen für 4 Stunden weiterkultiviert. Als Kontrolle für den Verdau dienten Zellen, deren Medium kein Enzym zugegeben worden war. Als Kontrolle für die Behandlung mit STI571 dienten mock-behandelte Zellen. Danach wurde das Medium in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Um eventuell mitgeführte Zellen und Zelltrümmer zu entfernen wurde das Medium jeweils für 5 Minuten bei 1.000 UpM bzw. 3.500 UpM in einer Sigma 4K15 Laborzentrifuge zentrifugiert, wobei jedes Mal der Überstand der Zentrifugation in ein frisches 15 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Schließlich wurde das Medium sorgfältig mit 5x Volumen 100 % Methanol vermischt und die Proteine über Nacht bei -20° C gefällt.

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und wie unter 3.2.3.1. beschrieben zur Herstellung postnukleärer Extrakte lysiert. Die Extrakte wurden sofort mit 5x Volumen 100 % Methanol über Nacht bei -20° C gefällt. Die Fällungen wurden für 25 Minuten bei 3.500 UpM und 4° C in einer Sigma 4K15 Laborzentrifuge abzentrifugiert und die Proteinpräzipitate nach dem Trocknen in TNE-Puffer resuspendiert. Hierbei wurden die aus dem Medium gefällten Proteine in 20 µl TNE-Puffer und die Proteine aus den Fällungen der postnukleären Überstände in 100 µl TNE-Puffer resuspendiert. Nach Aufkochen der Proben in 3x SDS-Probenpuffer wurden sie mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.2.3.7.) und darauf folgenden Western Blot (3.2.3.8.) analysiert.

Material:

Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C (PIPLC) Sigma, München

TNE-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5
	150 mM NaCl
	5 mM EDTA

3.2.3.6. Immunpräzitationen

Immunpräzitation von PrP aus postnukleären Zellextrakten

Für die Immunpräzitationen von PrP wurden postnukleäre Zellextrakte verwendet. Zuvor wurden PrP^c und PrP^{Sc} in einem Löslichkeits-Assay (3.2.3.4.) separiert, so dass eine Probe entweder nur PrP^c oder nur PrP^{Sc} enthielt. Im Falle der metabolischen Radiomarkierungs-Experimente wurde nur das PrP^{Sc}-enthaltende Ultrazentrifugations-Präzipitat in der Immunpräzitation eingesetzt.

Für die Immunpräzitation wurden die Ultrazentrifugations-Präzipitate in 100 µl IP-Puffer resuspendiert und zusammen mit den Überständen aus der Ultrazentrifugation für 10 Minuten bei 95° C aufgeköcht. Danach wurden die Proben für 2 Minuten auf Eis abgekühlt und die resuspendierten Ultrazentrifugations-Präzipitate mit 100 µl 10 % Sarkosyl (Endkonzentration 1 %) und 800 µl PN-Lyse-Puffer versetzt. Zu allen Proben wurden schließlich jeweils 3 µl Anti-PrP Antikörper A7 (1:330) und 20 µl 1 % Pefabloc SC gegeben und die Ansätze über Nacht bei 4° C in einem Überkopf-Mischer inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Protein-A-Sepharose (50 %, äquibriert in PN-Lyse-Puffer) wurden die Ansätze für weitere 1,5 Stunden bei 4° C in einem Überkopf-Mischer inkubiert. Darauf wurden die Proben für 2 Minuten bei 14.000 UpM und 4° C abzentrifugiert. Die Sepharose mit den gebundenen Protein/Antikörper-Komplexen wurde fünfmal mit je 500 µl IP-Puffer gewaschen. Sämtliche Schritte fanden auf Eis statt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Proben entweder wie unter 3.2.2.8. (metabolische Radiomarkierung) beschrieben weiterbehandelt oder die Sepharose wurde in 30 µl 3x SDS-Probenpuffer aufgeköcht. Nach zweiminütigem Abkühlen auf Eis wurden je 10 µl Probe einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 3.2.3.7.) unterzogen und mittels anschließendem Western Blot (siehe 3.2.3.8.) analysiert.

Material:

IP-Puffer	0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholsäure
	0,5 % (v/v) Triton X-100
	1 % (w/v) SDS
	in 1x PBS
PN-Lyse-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5
	100 mM NaCl

	10 mM EDTA
	0,5 % (v/v) Triton X-100
	0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholsäure
Pefabloc SC-Stocklösung	1 % (w/v) in H ₂ O
Protein-A-Sepharose	50 % in PN-Lyse-Puffer (Amersham, Freiburg)
Sarkosyl- (N-Lauroylsarkosin-) Stocklösung	10 % (w/v) in H ₂ O

Immunpräzipitation von c-Abl aus Gesamtzellextrakten

Die unter 3.2.3.1. hergestellten Gesamtextrakte wurden direkt in die Immunpräzipitation von c-Abl eingesetzt. Vergleichbare Proteinmengen wurden in 500 µl Volumen mit 440 µl HNTG-Puffer und 5 µl Anti-Abl-Antikörper 8E9 (1:200) gemischt und nach Zugabe von 60 µl vorbereiteter Protein-G-Sepharose (50 % in HNTG) für 3 Stunden bei 4° C in einem Überkopf-Mischer inkubiert. Als Negativ-Kontrolle für die Immunpräzipitation diente ein Ansatz ohne Antikörper. Danach wurde die Sepharose mit den gebundenen Antikörper/Protein-Komplexen für 3 Minuten bei 14.000 UpM und 4° C abzentrifugiert und anschließend zunächst zweimal mit HNTG-Puffer und dann zweimal mit Kinasen-Basis-Puffer gewaschen. Dazwischen wurde jeweils wie zuvor zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugations-Schritt wurde der Überstand vollständig abgenommen und die Sepharose-gebundene Kinase sofort im *in vitro* Kinase-Assay eingesetzt. (siehe 3.2.3.9.)

Material:

HNTG-Puffer	50 mM HEPES pH 7,5
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	10 % (v/v) Glycerin
	0,1 % (v/v) Triton X-100
frisch dazu	10 mM NaF
	0,1 mM Aprotinin
	1 mM Phenylmethylsulfonyl Fluorid
Basis-Kinase-Puffer:	30 mM Tris/HClpH 7,5
	15 mM MgCl ₂
	1 mM MnCl ₂
	15 µM Na ₃ PO ₄
frisch dazu	1,5 mM DTT
Protein-G-Sepharose	50 % in HNTG-Puffer (Amersham, Freiburg)

3.2.3.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteinproben wurden in einer diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Lämmli, 1970).

Die Proteingele bestehen aus zwei Teilen, dem oberen Sammelgel, das etwa ein Fünftel der Gelgröße einnimmt und dem unteren Trenngel. Aufgrund der pH-Wert- und Ionenverhältnisse werden die Proteine im Sammelgel in einer scharfen Bande fokussiert, während sie später im Trenngel der Größe nach aufgetrennt werden. Um die Oberfläche des Trenngels zu glätten, wurde es nach dem Gießen mit 2-Propanol überschichtet. Je nach Größe des zu detektierenden Proteins wurden im Acrylamid-Gehalt unterschiedlich prozentige Trenngele gegossen (für PrP 12,5 %, für c-Abl 7,5 %).

Vor dem Auftragen wurden die Proben für 10 Minuten in 3x SDS-Probenpuffer aufgekocht. Es wurden stets vergleichbare Proteinmengen aller Proben aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in Midiproteingelkammern der Firma Peqlab, Erlangen, bei 45 mA in SDS-Laufpuffer.

Material:

4x Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8		
	0,4 % (w/v) SDS		
4x Trenngel-Puffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8		
	0,4 % (w/v) SDS		
Sammelgel 5% (16 ml)	9,1 ml H ₂ O		
	4 ml Sammelgelpuffer		
	2,7 ml Protogel		
	168 µl 10 % (w/v) APS		
	30 µl TEMED		
Trenngel (62 ml)	<u>12,5 %</u>	<u>7,5 %</u>	
	20,4 ml	30,7 ml	H ₂ O
	15,5 ml		Trenngel-Puffer
	25,8 ml	15,5 ml	Protogel
	<u>12,5 %</u>	<u>7,5 %</u>	
	192 µl		10 % (w/v) APS
	90 µl		TEMED
3x SDS-Probenpuffer	83 mM Tris/HCl pH 6,8		

	33 % (v/v) Glyzerin
	6,7 % (w/v) SDS
	16,6 % (v/v) β -Mercaptoethanol
	0,0015 % (w/v) Bromphenolblau
1x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris
	86 mM Glycin
	0,1 % (w/v) SDS

3.2.3.8. *Western Blot*

Für den Nachweis von Proteinen in Proteinextrakten wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Vergleichbare Mengen von Zellextrakten wurden zusammen mit einem Rainbow-Protein-Größenmarker (Amersham, Freiburg) einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.2.3.7.) unterworfen. Das Blotten wurde in einer Semidry-Blot-Apparatur der Firma Biorad, München, durchgeführt. Hierfür wurden zunächst sechs Whatman-Filterpapiere und eine PVDF-Membran (Hybond-P, Amersham, Freiburg) exakt auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und das Gel von den Glasplatten entfernt. Die Membran wurde zunächst kurz in Methanol und dann für 5 Minuten in H₂O inkubiert. Die Filterpapiere, die gewässerte Membran und das Gel wurden in Transferpuffer getränkt. Beim gesamten Blotaufbau wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen verblieben. Drei Filterpapiere wurden nacheinander auf der Anode platziert. Auf diese wurden zunächst die Membran und danach das Gel gelegt. Schließlich wurden weitere drei Filterpapiere auf das Gel platziert und restliche Luftblasen entfernt. Nach Aufsetzen der Kathode erfolgte das Blotten bei 2,5 mA/cm² für 45 Minuten, bzw. bei sehr großen Proteinen (c-Abl) für 2 Stunden bei 0,8 mA/cm² ohne Kühlung.

Nach dem Transfer wurde die Membran zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen in TBST/5 % (w/v) Magermilchpulver für mindestens 45 Minuten inkubiert. Diese und alle weiteren Inkubationen erfolgen unter stetigem Schwenken.

Die nachfolgende Inkubation in Erstantikörperlösung wurde entweder für 5 Stunden bei Raumtemperatur (Anti-Abl Antikörper 8E9) oder über Nacht bei 4° C (Anti-PrP Antikörper 3F4 und 4H11, Anti-Phospho-Tyr 4G10) durchgeführt. Die Anti-PrP-Antikörper 3F4 und 4H11 wurden 1:10.000 (3F4) bzw. 1:5.000 (4H11) in TBST verdünnt. Für die Antikörper 8E9 (Anti-Abl) und 4G10 (Anti-Phospho-Tyr) wurden die

Verdünnungen 1:200 (8E9) bzw. 1:1.000 (4G10) in TBST/1 % (w/v) Magermilchpulver angesetzt. Nach der Erstantikörper-Inkubation wurde die Membran einmal kurz mit TBST gespült und dann sechsmal für 5 Minuten bei Raumtemperatur in TBST gewaschen. Als Zweitantikörper wurden Peroxidase-markiertes Schaf Anti-Maus-IgG 1:7.500 in TBST verdünnt und damit die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran nach kurzem Schwenken in TBST achtmal für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen.

Die Detektion der spezifischen Proteinbanden erfolgte mit dem ECL Plus Western Blotting Detection Kit (Amersham, Freiburg). Hierfür wurde die Membran in H₂O geschwenkt, kurz zwischen zwei Whatman-Filterpapieren getrocknet und für 5 Minuten in frisch gemischtem ECL Plus Detection Reagenz (Reagenz A:Reagenz B im Verhältnis 40:1 gemischt) inkubiert. Nach erneutem Trocknen zwischen zwei Filterpapieren wurde die Membran in Haushaltsfolie eingeschlagen und auf einem Röntgenfilm (Kodak, Optimax, Amersham, Freiburg) zunächst für eine Minute exponiert und der Film mit einem Typon Optimax X-Ray Filmentwickler entwickelt. Je nach Signalstärke wurden dann weitere Expositionszeiten gewählt.

Material

Transfer Puffer:	25 mM Tris
	68 mM Glycin
	20 % (v/v) Methanol
TBST	10 mM Tris/HCl pH 8,0
	150 mM NaCl
	0,05 % (v/v) Tween-20

3.2.3.9. *In vitro* Kinase-Assays

Im *in vitro* Kinase-Assay wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivität der Tyrosin-Kinase c-Abl gemessen. Als Substrat wurde sowohl kommerzielles c-Abl Substrat (New England Biolabs, Darmstadt) als auch rekombinantes PrP (freundlicherweise von Frau Dr. Hammerschmidt zur Verfügung gestellt) verwendet. Der Assay-Puffer enthält (³²P)- γ -ATP, so dass durch die Phosphorylierung radioaktiv markiertes Substrat entsteht. Die Reaktion wird nach dem Abstoppen auf Filterpapier getropft, das dann intensiv gewaschen wird, um sämtliche nicht an das Substrat gebundene Radioaktivität zu

entfernen. Somit spiegelt die am Szintillationszähler gemessene Radioaktivität die Aktivität der im Assay getesteten Kinase wieder.

Die wie unter 3.2.3.6. beschrieben immunpräzipitierte Tyrosin-Kinase c-Abl wurde direkt im *in vitro* Kinase-Assay eingesetzt. Nach Zugabe von 20 µl Basis-Kinase-Puffer zu der Sepharose-gebundenen Kinase wurden die Proben für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden jeweils 20 µl 2x Assay-Puffer mit spezifischem c-Abl-Substrat (100 µM Endkonzentration) bzw. rekombinantem PrP (1,6 µM bzw. 10 µM Endkonzentration) zugegeben und der Ansatz für 20 Minuten bei 30° C im Thermomixer unter ständigem leichtem Schütteln inkubiert. Hierbei wurde neben der Kontrolle bei einigen Ansätzen dem Assay-Puffer auch unterschiedliche Konzentrationen an STI571 zugesetzt, um die inhibitorische Wirkung von STI571 auf c-Abl zu dokumentieren. Als Negativ-Kontrolle diente eine Reaktion ohne Substrat. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 100 mM EDTA pH 8,0 gestoppt und die Probe kurz abzentrifugiert. Jeweils 20 µl Ansatz wurden auf P91 Filterpapier getropft und für 6 Minuten getrocknet. Danach wurden die Filter zehnmal für 15 Minuten in 0,75 % (v/v) Phosphorsäure gewaschen. Nach kurzem Schwenken in Aceton und sechsminütigem Trocknen wurden die Filter in Szintillationsprobenröhrchen gegeben, in Szintillationsflüssigkeit eingedeckt und am Liquid-Szintillationszähler (LS 6500, Beckman Coulter, Krefeld) ausgemessen.

Material:

Basis-Kinase-Puffer: 30 mM Tris/HCl pH 7,5

15 mM MgCl₂

1 mM MnCl₂

15 µM Na₃PO₄

frisch dazu 1,5 mM DTT

2x Assay-Puffer: 4 µM kaltes ATP

1,5 µCi (³²P)-γ-ATP

200 µM c-Abl-Substrat / 3,2 µM rek. Maus-PrP / 20 µM rek.

Maus-PrP in Basis-Kinase-Puffer

3.2.3.10. Test auf eine Wirkung von STI571 auf PrP^{Sc} in toten Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen vor allem durch einen Verdau mit Proteinase K (3.2.3.3.) auf das Vorhandensein von PrP^{Sc} getestet. Dieser Test fiel

negativ aus, sobald die Zellen mit 10 μM STI571 behandelt wurden. Um sichergehen zu können, dass dieser Effekt auf zellulärer Ebene liegt, musste ausgeschlossen werden, dass STI571 mit PrP^{Sc} interagiert. Diese Interaktion könnte dann über die Lyse der Zellen hinaus bestehen und später im Verdau dafür sorgen, dass PrP^{Sc} sensitiver für den Proteinase K-Verdau ist. Das würde bedeuten, dass STI571 keinen Effekt auf den zellulären Abbau von PrP^{Sc} hätte, sondern lediglich den Verdau von PrP^{Sc} mit Proteinase K vereinfachen würde. Hierfür wurde von zwei konfluenten 10 cm Zellkulturschalen das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen, in jeweils 1 ml 1x PBS mittels eines Zellschabers geerntet und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im 37° C warmen Wasserbad wurden die Zellen lysiert. Die Lysate wurden für 5 Minuten bei 14.000 UpM und 4° C abzentrifugiert und die Überstände (1 ml) in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 10 μM STI571 bzw. im Falle der Negativ-Kontrolle von entsprechender Menge DMSO, wurden die Proben bei 4° C über Nacht inkubiert. Dann wurden die Proben wie in 3.2.3.3. beschrieben einem Proteinase K-Verdau unterzogen, in Methanol gefällt und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.2.3.7.) und anschließendem Western Blot (3.2.3.8.) analysiert.

3.2.3.11. Test auf proteolytische Aktivität in Zell-Lysaten

Um die Frage zu beantworten, ob durch die Behandlung von Zellen mit STI571 deren proteolytische Aktivitäten verstärkt werden, sollte mittels Lysaten aus behandelten und mock-behandelten Zellen ein möglicher Unterschied in der proteolytischen Aktivität dieser Zellen gegenüber PrP^{Sc} untersucht werden. Hierfür wurden N2a-Zellen zunächst drei Tage lang mit 10 μM STI571 bzw. der entsprechenden Menge an DMSO (mock-) behandelt. Dann wurde das Medium von den Zellkulturschalen abgenommen, die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und in 750 μl LP-Mes-Puffer für 10 Minuten auf Eis lysiert. Nach einer Zentrifugation für 20 Minuten bei 14.000 UpM und 4° C wurden die Überstände zu je 500 μl in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Als Test-Extrakt wurden postnukleäre Extrakte aus sechs 10 cm Zellkulturschalen ScMHM2-Zellen verwendet. Diese waren wie in 3.2.3.1. beschrieben hergestellt und über Nacht in 5x Volumen Methanol gefällt und abzentrifugiert worden. Die Proteinpräzipitate wurden zur Herstellung von postnukleären Mes-Extrakten je Zellkulturschale in 750 μl RX-Mes-Puffer resuspendiert und zur Herstellung eines Gesamt-Extraktes gleicher

Proteinmenge vermischt. Dann wurde zu den zuvor aliquotierten LP-Mes-Lysaten der STI571- bzw. mock-behandelten N2a-Zellen je 500 μ l des postnukleären Mes-Extraktes der ScMHM2-Zellen gegeben, die Proben gut gemischt und über Nacht bei 37° C inkubiert. Hierbei wurde je LP-Mes-Lysat auch eine Probe mitgeführt, die den Proteasen-Inhibitor Pepstatin A (100 μ M) enthielt. Dann wurden die Proben wie in 3.2.3.3. beschrieben einem Proteinase K-Verdau unterzogen, in Methanol gefällt und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.2.3.7.) und nachfolgendem Western Blot (3.2.3.8.) analysiert. Als Kontrolle war aus zwei weiteren ScMHM2-Schalen (einmal STI571-, einmal mock-behandelt) zusammen mit den Zellen für den Test-Extrakt wie oben beschrieben postnukleäre Extrakt hergestellt, in Methanol gefällt und abzentrifugiert worden. Die Proteinpräzipitate wurden zur Herstellung von postnukleärem Mes-Extrakt in 500 μ l LP-Mes und 500 μ l RX-Mes resuspendiert und einem Proteinase K-Verdau unterworfen (siehe 3.2.3.3.). Schließlich wurden die Proben wie oben beschrieben analysiert.

Material:

LP-Mes (pH 5,4)	50 mM Mes
	1 % (v/v) Triton
	100 mM NaCl
RX-Mes (pH 5,4)	50 mM Mes
	30 mM MgCl ₂
	2 mM MnCl ₂

4. Ergebnisse

4.1. Vorbemerkung

Da in mehreren Publikationen über eine Rolle von PrP^c in der zellulären Signaltransduktion berichtet wurde, lag die Vermutung nahe, dass auch im Prozess der Konversion von PrP^c zu seiner pathogenen Isoform PrP^{Sc} Signaltransduktionskaskaden beteiligt sein könnten. Diese könnten entweder direkt PrP^c oder ein Intermediat der Konversion als Ziel haben und diese für eine Konversion „aktivieren“ oder auch „inaktivieren“. Oder sie könnten indirekt über die Beeinflussung eines bislang nicht identifizierten Kofaktors der Konversion an dieser beteiligt sein. Aus diesem Grund wurde beschlossen, Prion-infizierte Zellen mit einer Reihe von Substanzen zu behandeln, von denen eine inhibitorische Wirkung auf spezifische Signaltransduktionskaskaden bekannt ist. Die Substanzen wurden von der Firma Axxima in Martinsried im Rahmen einer Kollaboration zur Verfügung gestellt. Das Screening geschah aus patentrechtlichen Gründen blind. Die Substanzen waren durchnummeriert und weder Namen noch die Wirkungen der verschiedenen Substanzen waren uns bekannt gegeben worden. Nur von einzelnen Substanzen wurden uns später der Name oder das molekulare Target mitgeteilt. Deshalb können wir an dieser Stelle keine Aussagen über die restlichen bisher nicht näher untersuchten Substanzen machen.

4.2. STI571 reduziert PrP^{Sc} in Prion-infizierten Zellen

Von vielen Substanzen konnte bisher ein anti-Prion Effekt in Zellkultur nachgewiesen werden. Diese Chemikalien gehören den unterschiedlichsten Substanzklassen an und führen in Prion-infizierten Zellen zu einer Reduktion von PrP^{Sc}. Der Wirkungsmechanismus ist dabei zum großen Teil noch völlig unklar. Da schon mehrere Arbeitsgruppen eine Rolle von PrP^c in der zellulären Signaltransduktion postuliert haben, stellte sich die Frage, ob die Konversion von PrP^c zu PrP^{Sc} durch einen Eingriff in spezielle Signaltransduktionskaskaden der Zelle beeinflusst werden könnte. Zu Beginn wurde ein Screening mit 50 verschiedenen Substanzen in Prion-infizierten Neuroblastom-Zellen (ScMHM2) durchgeführt. Jede der eingesetzten Substanzen

inhibiert spezifische intrazelluläre Signaltransduktionswege. Ziel des Screenings war es, Substanzen herauszufinden, die in die Konversion von PrP^c zu seiner pathogenen Isoform PrP^{Sc} eingreifen und zu einer Reduktion von PrP^{Sc} führen. Die Zellen wurden hierfür drei Tage lang mit 10 µM der jeweiligen Substanz behandelt. Danach wurden postnukleäre Extrakte hergestellt und diese mit Proteinase K verdaut, um die Existenz von PrP^{Sc} im Zellextrakt zu untersuchen. Die Proben wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Abbildung 4.2.1. zeigt eine schematische Darstellung des Screenings.

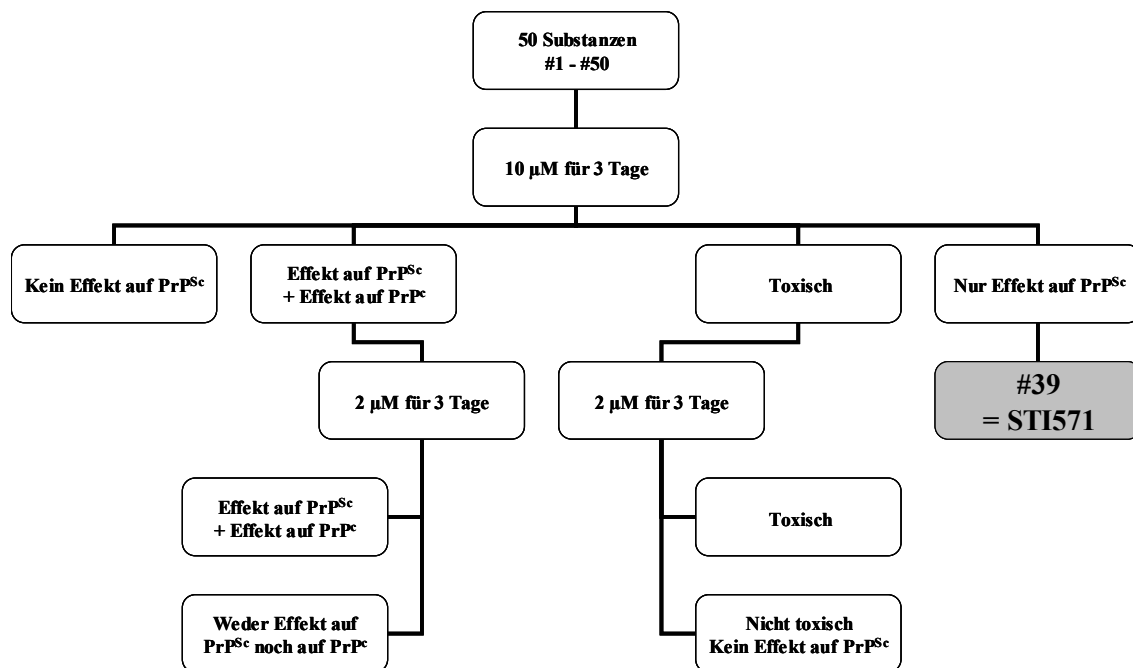


Abb. 4.2.1. Schematische Darstellung des Substanz-Screenings. ScMHM2-Zellen wurden für drei Tage mit 10 µM der jeweiligen Substanz behandelt. Die Zellen wurden lysiert und die postnukleären Extrakte mittels Proteinase K-Verdau und Analyse im Western Blot auf ihren Gehalt an PrP^{Sc} hin untersucht. Je nach Ergebnis wurde die Behandlung auf 2 µM für drei Tage verändert oder die Substanz aus dem weiteren Screening herausgenommen. Die einzige Substanz, die am Ende nur einen Effekt auf PrP^{Sc} hatte, ohne eine Veränderung des PrP^c-Signals im Western Blot hervorzurufen, war die Substanz #39 = STI571.

Nach diesem ersten Screening ließen sich die Substanzen in verschiedene Kategorien aufteilen:

1. Substanzen ohne Effekt auf PrP^c und ohne Effekt auf PrP^{Sc}
2. Substanzen mit einem Effekt auf PrP^c und einem Effekt auf PrP^{Sc}
3. eindeutig toxische Substanzen
4. Substanzen ohne Effekt auf PrP^c, aber mit einem Effekt auf PrP^{Sc}

Ein Effekt auf PrP^c bedeutete in diesem Falle, dass im Western Blot eine Veränderung des Signals von PrP^c im Vergleich zur Kontrolle beobachtet wurde. Diese Veränderungen drückten sich im Glykosylierungsmuster oder in der Signalstärke aus.

Substanzen, die unter den gewählten Bedingungen keinen Effekt auf PrP^{Sc} hatten, wurden direkt aus dem Screening entfernt und nicht weiter getestet. Substanzen, die zunächst zytotoxisch wirkten oder einen Effekt auf PrP^{Sc} zeigten, allerdings auch stark das Signal für PrP^c im Western Blot veränderten, wurden weiter untersucht. Diese Substanzen wurden für drei Tage mit einer Konzentration von 2 µM auf den Zellen getestet. Danach hatten die meisten Substanzen weder einen Effekt auf PrP^{Sc} noch auf PrP^c. Sehr viele waren selbst in dieser geringen Konzentration noch toxisch für die Zellen und einige wenige Substanzen, die einen Effekt auf PrP^{Sc} hatten, beeinflussten auch PrP^c. Unter allen getesteten Substanzen war eine Substanz, die bei starker Reduktion von PrP^{Sc} keinen Effekt auf das PrP^c-Signal hatte. Diese Substanz, im Screening die Nummer 39, war der Tyrosin-Kinasen Inhibitor STI571 (Signaltransduktions-Inhibitor 571). Wegen dieses herausragenden Effekts im Screening wurde speziell diese Substanz in weiteren Versuchen näher untersucht.

Abbildung 4.2.2. zeigt die chemische Strukturformel von STI571.

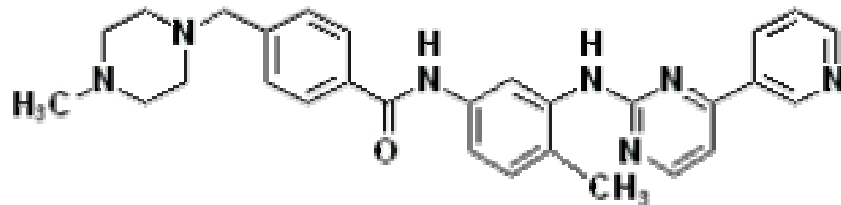


Abb. 4.2.2. Chemische Strukturformel von STI571.

Nach einer dreitägigen Behandlung von ScMHM2-Zellen mit 10 µM STI571 konnte im Western Blot nach Proteinase K-Verdau der postnukleären Extrakte kein Signal für PrP^{Sc} mehr detektiert werden (Abbildung 4.2.3., Spur 4), während in den Kontroll-Zellen noch deutlich PrP^{Sc} vorhanden war (Abbildung 4.2.3., Spur 2). Auch die Behandlung anderer Prion-infizierter Zelllinien führte dazu, dass kein PrP^{Sc} in den Proteinase K-verdauten Extrakten mehr vorhanden war. ScGT1-Zellen wurden für drei Tage mit 5 µM STI571 behandelt, SMBs15-Zellen für 10 Tage mit 10 µM.

Die Western Blot Analysen der Proteinase K-verdauten postnukleären Extrakte der mock- bzw. STI571-behandelten ScGT1- bzw. SMBs.15-Zellen sind ebenfalls in

Abbildung 4.2.3. dargestellt. Während in den mock-behandelten Zellen Signale für PrP^{Sc} zu sehen sind (Spur 6 bzw. 10), ist in den STI571-behandelten Zellen kein Proteinase K-resistentes PrP mehr vorhanden (Spur 8 bzw. 12).

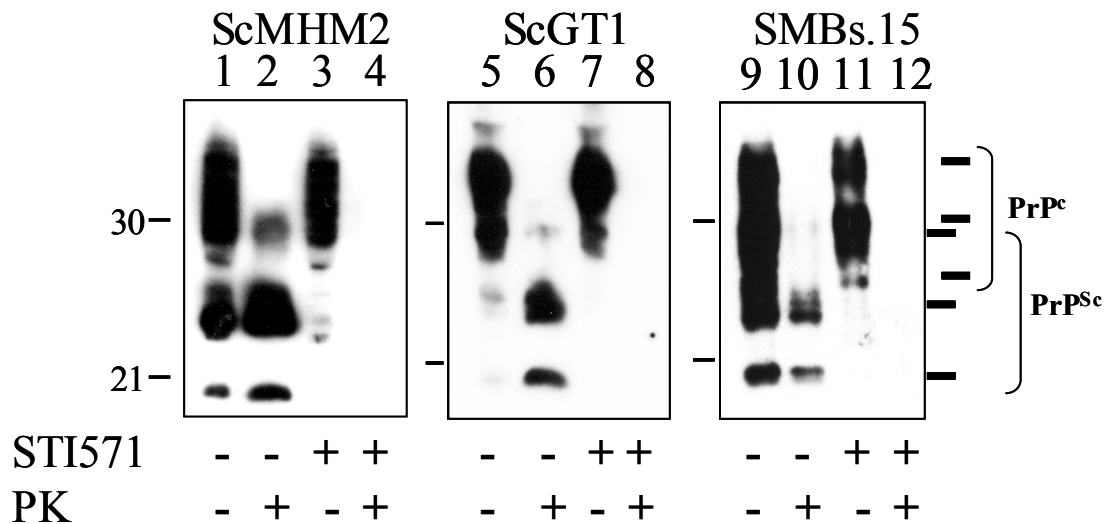


Abb. 4.2.3. Reduktion von PrP^{Sc} in Prion-infizierten Zellen durch STI571. ScMHM2- (Spuren 1 – 4), ScGT1- (Spuren 5 – 8) und SMBs.15- (Spuren 9 – 12) Zellen wurden 3 Tage mock- (-STI571) mit 10 µM (ScMHM2), 5 µM (ScGT1) bzw. 10 Tage mit 10 µM (SMBs.15) STI571 (+STI571) behandelt. Die postnukleären Extrakte wurden halbiert, die eine Hälfte mit Proteinase K verdaut (+ PK), die andere Hälfte direkt gefällt (- PK). Die Proben wurden auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot mit den Antikörpern 3F4 (Spuren 1 – 4) bzw. 4H11 (Spuren 5 – 12) analysiert. Die Balken an der rechten Seite repräsentieren die drei Banden für nicht-, einfach- und zweifach-glykosyliertes PrP^c bzw. PrP^{Sc}.

STI571 wird von der Firma Novartis (Zürich, Schweiz) unter dem Namen Glivec® als Medikament zum Beispiel gegen Chronisch Myeloische Leukämie (CML) und Akute Lymphoblastische Leukämie (ALL) vertrieben, Krebsarten, die durch das Produkt der t(9/22) Philadelphia Chromosom Translokation Bcr-Abl verursacht werden. STI571 ist ein sehr spezifischer Inhibitor und die einzigen bislang bekannten Zielstrukturen sind die c-Kit-Kinase, der PDGF-Rezeptor (Platelet Derived Growth Factor Rezeptor) und die c-Abl-Kinase. Wegen ihres herausragenden Effekts auf PrP^{Sc} ohne erkennbaren Einfluss auf PrP^c wurde beschlossen, diese Substanz in weiteren Zellkultur-Experimenten einzusetzen, um ihre molekulare Wirkungsweise näher zu untersuchen. Hierfür wurden ScMHM2-Zellen gewählt, da diese ein etabliertes *in vitro* Modellsystem für die Prioninfektion darstellen.

4.3. Effekte von STI571 auf Prion-infizierte Zellen

4.3.1. STI571 weist keine Zytotoxizität auf

Während des Substanz-Screenings konnte kein sichtbarer Effekt auf die Zellvitalität mit STI571 behandelter Zellen festgestellt werden. Um allerdings auch eine geringe Zytotoxizität ausschließen zu können, wurden Zytotoxizitäts-Assays durchgeführt. Zunächst wurde die Zellvitalität mittels Trypan Blau-Färbung bestimmt. Trypan Blau ist ein Membran impermeabler Stoff. Somit werden nur tote Zellen bzw. Zellen angefärbt, deren Plasmamembran schwer beschädigt ist. Hierfür wurden ScMHM2-Zellen drei Tage lang mock- bzw. mit 10 μM STI571 behandelt und die Anzahl toter Zellen durch Auszählen der blau gefärbten Zellen bestimmt (vergleiche hierzu Abschnitt 3.3.2.6.). Es wurde jeweils von sechs voneinander unabhängigen Ansätzen der prozentuale Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt.

Die graphische Darstellung in Abbildung 4.3.1.1. gibt die Mittelwerte und die Standardabweichungen wieder. Der Darstellung ist zu entnehmen, dass in der Trypan Blau-Färbung keine Zytotoxizität für STI571 nachgewiesen werden konnte.

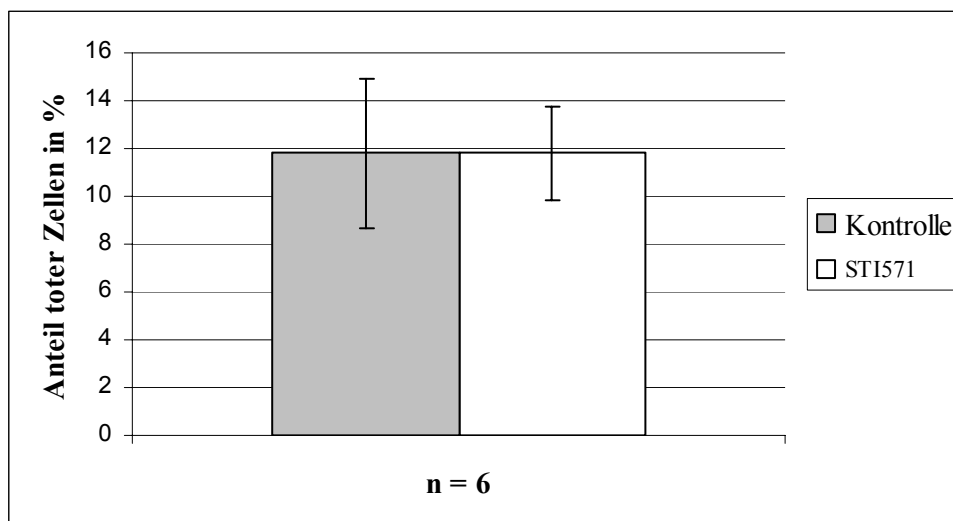


Abb. 4.3.1.1. Zytotoxizitätstest von STI571 mittels Trypan Blau-Färbung. ScMHM2-Zellen wurden 3 Tage lang mit 10 μM STI571 (STI571) bzw. mock- (Kontrolle) behandelt. Dann wurden die Zellen von der Schale abgelöst und mit Trypan Blau gefärbt. Die Auszählung der gefärbten toten Zellen erfolgte in einer Zell-Zählkammer unter dem Mikroskop. Die Darstellung gibt den prozentualen Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl an und zeigt die Mittelwerte aus jeweils 6 Zellkulturschalen (n = 6) und die dazu gehörenden Standardabweichungen.

Trypan Blau ist jedoch stark zytotoxisch, was bei längerer Einwirkung zu einer Beschädigung der Plasmamembran der Zellen führt. Das hat dann zur Folge, dass eigentlich lebende Zellen im Assay angefärbt und als „tot“ mitgezählt werden. Um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden, muss daher bei der Trypan Blau Färbung relativ schnell gefärbt und ausgezählt werden. Deshalb wurde neben der Trypan Blau-Färbung auch ein MTT-Assay durchgeführt. Da in diesem Assay die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt wird, ist er zudem aussagekräftiger als die Trypan-Blau-Färbung. Der MTT-Assay beruht auf der Reduktion des gelben Tetrazoliums Salzes MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid), was zur Bildung von lila Formazankristallen führt. Da diese Reduktion von der Aktivität zellulärer mitochondrialer Dehydrogenasen abhängt, ist die Reaktion direkt proportional zur Zellzahl und spiegelt die Vitalität der Zellen wieder. Im Gegensatz zur Trypan Blau-Färbung werden hier also nicht die toten Zellen bestimmt, sondern die lebenden. Nach Auflösung der Kristalle kann die entstandene Formazanlösung photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 550 - 600$ nm bestimmt werden (vergleiche hierzu Abschnitt 3.2.2.6.). Als Positiv-Kontrolle dienten Zellen, die drei Tage mit $10 \mu\text{M}$ einer Substanz, die im anfänglichen Substanz-Screening eine deutliche Zytotoxizität aufwies, behandelt worden waren.

Die graphische Darstellung ist in Abbildung 4.3.1.2. zu sehen. Für die mock- bzw. STI571-behandelten Zellen wurden jeweils zehn voneinander unabhängige Ansätze gemessen, für die Positiv-Kontrolle nur zwei. Der Mittelwert der gemessenen Absorptionen der mock-behandelten Zellen wurde als 100 % gesetzt und die Mittelwerte der Absorptionen der STI571-behandelten Zellen bzw. der Positiv-Kontrolle dazu in Beziehung gesetzt. Demnach gibt die Graphik den jeweiligen Mittelwert der prozentualen Anteile überlebender Zellen mit dazugehöriger Standardabweichung wieder. Wie sich der Darstellung entnehmen lässt, konnte auch im MTT-Assay keine Zytotoxizität für STI571 unter diesen experimentellen Bedingungen festgestellt werden. Im Gegenteil, es erschien hier sogar, als würden die Zellen durch die Behandlung mit STI571 vitaler, was durchaus mit der Reduktion von PrP^{Sc} in diesen Zellen zusammenhängen kann.

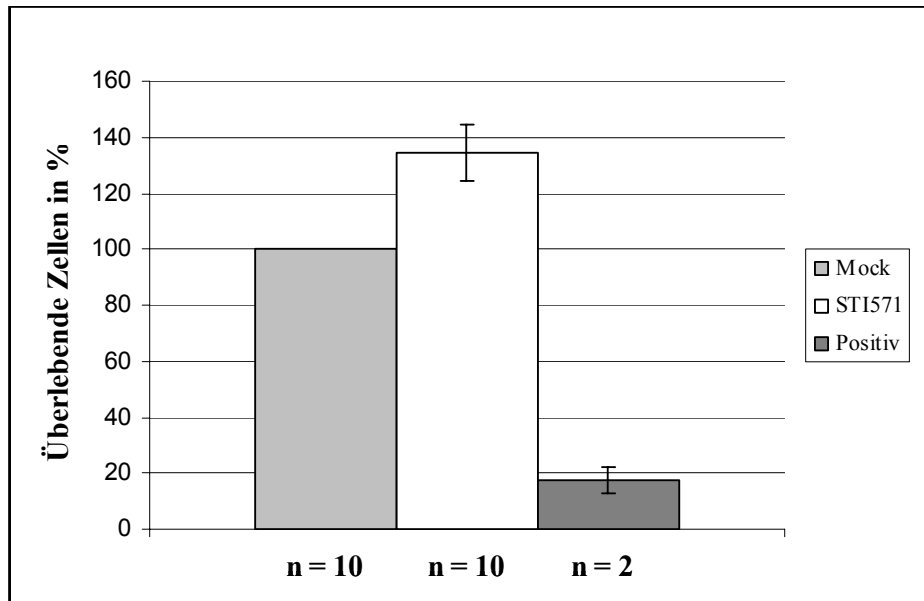


Abb. 4.3.1.2. Zytotoxizitätstest von STI571 mittels MTT-Assay. ScMHM2-Zellen wurden 3 Tage lang mock- (Mock) bzw. mit 10 μ M STI571 (STI571) behandelt. Als Positiv-Kontrolle diente eine im anfänglichen Screening als zytotoxisch eingestufte Substanz, mit der die Zellen ebenfalls drei Tage mit 10 μ M behandelt wurden (Positiv). Dann wurde die Zellvitalität mittels MTT-Assay ermittelt. Für die mock- bzw. STI571-Behandlung wurden 10 voneinander unabhängige Ansätze ausgewertet, für die Positiv-Kontrolle nur 2. Der Mittelwert der Absorptionen der mock-behandelten Zellen wurde als 100 % gesetzt. Die Mittelwerte der Absorptionen der STI571-behandelten Zellen bzw. der Positiv-Kontrolle beziehen sich darauf. Angegeben wird somit jeweils der Mittelwert des prozentualen Anteils überlebender Zellen mit der dazugehörigen Standardabweichung.

Beide Zytotoxizitätstest zeigten, dass eine Behandlung von Zellen mit 10 μ M STI571 über drei Tage keine erkennbaren zytotoxischen Auswirkungen auf die Zelle hat.

4.3.2. Die Reduktion von PrP^{Sc} durch STI571 ist Zeit- und Dosis-abhängig

Da die Behandlung Prion-infizierter Zellen zu einer starken Reduktion von PrP^{Sc} führte, sollte in einer Zeitkinetik festgestellt werden, wie schnell dieser Effekt eintritt. Das Zeitkinetik-Experiment wurde in zwei verschiedenen Ansätzen über einen maximalen Behandlungszeitraum von drei Tagen durchgeführt.

- (1) Bei den Zellen wurde nacheinander an drei aufeinander folgenden Tagen mit der Behandlung begonnen und die Zellen aller Zellkulturschalen gemeinsam am vierten Tag lysiert.

- (2) Bei den Zellen wurde am gleichen Tag mit der Behandlung begonnen. Dann wurde je eine Zellkulturschale STI571- bzw. mock-behandelter Zellen nach einem Tag, nach zwei Tagen und schließlich nach drei Tagen lysiert.

Diesen beiden Ansätzen liegen unterschiedliche Voraussetzungen für die Behandlung zugrunde. Werden die Zellen nacheinander mit STI571 behandelt (1), so hat man unterschiedliche Ausgangsbedingungen für die Behandlung, d.h. mit jedem Tag steigt sowohl die Zellzahl als auch der Gehalt der Zellen an PrP^{Sc}, was bedeutet, dass an jedem Folgetag mit der gleichen Menge an STI571 mehr Zellen mit mehr PrP^{Sc} behandelt werden. Wird die Behandlung der Zellen am gleichen Tag begonnen (2), so ist die Ausgangssituation gleich. Das bedeutet, dass zu Behandlungsbeginn in allen Zellen die Ausgangsmenge an PrP^{Sc} gleich ist. Allerdings ist an den drei aufeinander folgenden Tagen, an denen die Zellen lysiert werden, die jeweilige Zellzahl unterschiedlich, im Gegensatz zum Ansatz (1), bei dem alle Zellen am gleichen Tag lysiert werden.

Zunächst wurden ScMHM2-Zellen auf 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und am Folgetag mit den Zeitkinetik-Experimenten begonnen. Die Behandlung fand in allen Fällen mit einer Konzentration von 10 μ M STI571 statt. Der Nachweis von PrP^{Sc} erfolgte über einen Proteinase K-Verdau der postnukleären Extrakte und Analyse der Proben im Western Blot. Hierbei war der Proteingehalt der Proben angeglichen worden, um Unterschiede in der Zellzahl auszugleichen.

Das Ergebnis des Experimentes nach Ansatz (1) ist in Abbildung 4.3.2.1. (A) zu sehen. Wurden die Zellen an drei aufeinander folgenden Tagen behandelt und am vierten Tag gemeinsam lysiert, so konnte man nach einer eintägigen Behandlung der Zellen mit 10 μ M STI571 noch keinen Effekt auf PrP^{Sc} im Vergleich mit dem mock-behandelten Zellen entdecken (vergleiche Spur 2 mit Spur 4). Nach zwei Tagen ließ sich bereits ein deutlicher Effekt auf PrP^{Sc} beobachten (vergleiche Spur 2 mit Spur 6) und nach drei Tagen Behandlung mit STI571 war kein Signal für PrP^{Sc} mehr zu detektieren (Spur 8).

Abbildung 4.3.2.1. (B) zeigt das Ergebnis des Zeitkinetik-Experiments nach Ansatz (2). Wurde die Behandlung der Zellen am gleichen Tag begonnen und die Zellen dann an drei aufeinander folgenden Tagen lysiert, so war bereits nach einem Tag kein PrP^{Sc} mehr im postnukleären Extrakt vorhanden (vergleiche Spur 2 mit Spur 4). Die Ursache dafür, dass die eintägige Behandlung nach Ansatz (1) keinen Effekt hatte (Abbildung 4.2.3.1. (A), Spur 4), liegt sehr wahrscheinlich in der oben beschriebenen veränderten

Ausgangssituation der Behandlung. Wie man sehen kann, wächst der Gehalt an PrP^{Sc} über die drei Tage an (vergleiche Spur 2, Spur 6 und Spur 10), obwohl gleiche Proteinmengen aufgetragen worden waren. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Zellen ständig PrP^c zu PrP^{Sc} konvertieren, d.h. die Menge an PrP^{Sc} schneller zunimmt als die Zellzahl. Auch das Signal von PrP^c wird etwas stärker, was unseren Beobachtungen im Labor entspricht, dass die Zellen mit zunehmender Konfluenz mehr PrP^c exprimieren (Dr. Christian Spielhauer, persönliche Mitteilung und Spielhauer & Schätzl, 2001).

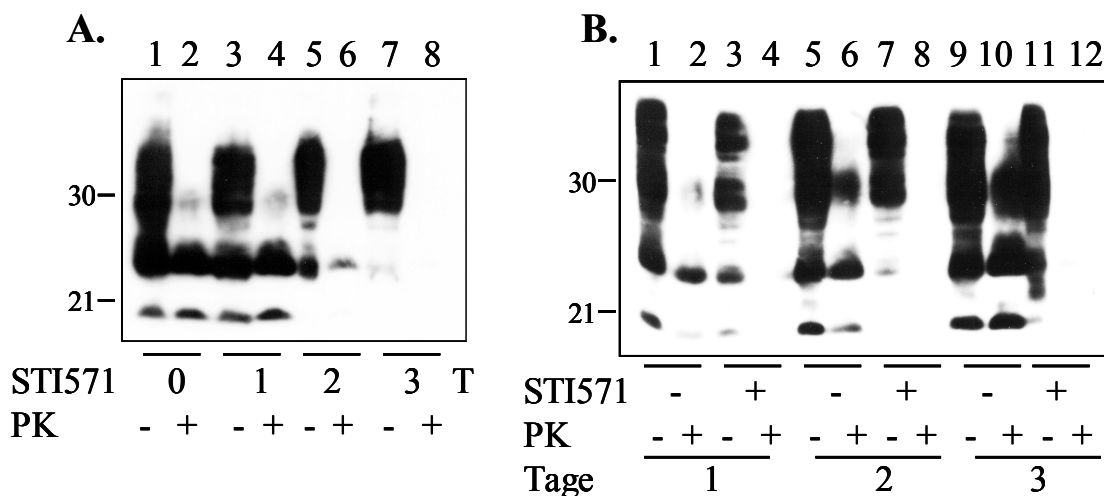


Abb. 4.3.2.1. Zeitabhängigkeit des Effekts von STI571 auf ScMHM2-Zellen. (A): ScMHM2-Zellen wurden 1, 2 oder 3 Tage mit 10 μ M STI571 (+STI571) bzw. 3 Tage mock (-STI571) behandelt. Mit der Behandlung wurde an drei aufeinander folgenden Tagen begonnen und die Zellen wurden am vierten Tag gemeinsam lysiert. (B): ScMHM2-Zellen wurden 1, 2 oder 3 Tage mit 10 μ M STI571 (+STI571) bzw. 1, 2 oder 3 Tage mock- (-STI571) behandelt. Mit der Behandlung wurde am selben Tag begonnen und die Zellen wurden an drei aufeinander folgenden Tagen lysiert. (A) + (B): Die postnukleären Extrakte wurden halbiert, eine Hälfte mit Proteinase K verdaut (+ PK), die andere Hälfte direkt gefällt (- PK). Die Proben wurden auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western Blot mit den Antikörpern 3F4 (A) bzw. 4H11 (B) analysiert.

Nach der zeitlichen Untersuchung des Effekts von STI571 auf Prion-infizierte Zellen sollte auch eine Dosis-Titration durchgeführt werden. Die Durchführung des Experiments wurde an die Dosis-Titration von Quinacrin (Korth *et al.* 2001) angelehnt. Dafür wurden ScMHM2-Zellen über sechs Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen von STI571 behandelt. Über diesen Zeitraum wurde das Medium täglich gewechselt und STI571 jedes Mal frisch dazu gegeben. Dann wurden die Zellen durch Proteinase K-Verdau der postnukleären Extrakte auf ihren Gehalt an PrP^{Sc} hin untersucht.

Abbildung 4.3.2.2. zeigt nur die Proteinase K-verdauten Extrakte. Wie zu erkennen ist, ist bei einer Konzentration von 1 μ M eine drastische Reduktion von PrP^{Sc} zu

beobachten. Somit lässt sich die Konzentration an STI571, die benötigt wird, um eine 50 %ige Reduktion von PrP^{Sc} (IC₅₀) herbeizuführen auf < 1 µM festlegen.

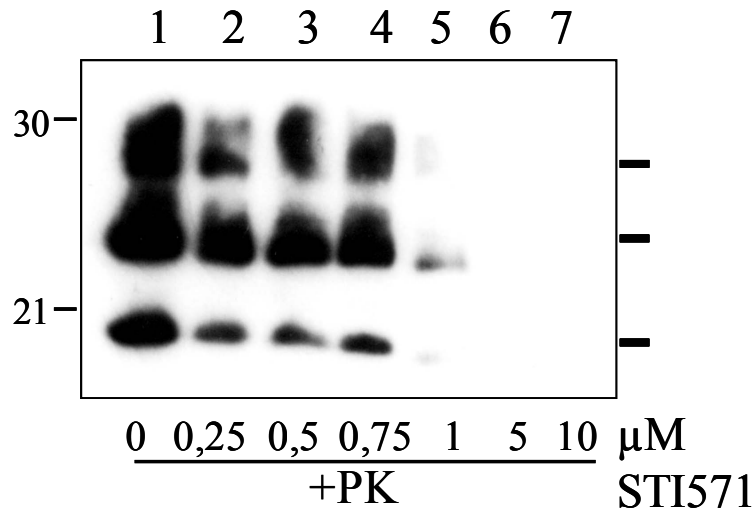


Abb. 4.3.2.2. Dosisabhängigkeit des durch STI571 hervorgerufenen Effekts auf PrP^{Sc}. ScMHM2-Zellen wurden über sechs Tage mock- (0 µM STI571) bzw. mit unterschiedlichen Konzentrationen an STI571 (0,25; 0,5; 0,75; 1; 5; 10 µM STI571) behandelt. Die postnukleären Extrakte wurden mit Proteinase K verdaut, auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot mit 4H11 Antikörper analysiert. Die Balken an der rechten Seite repräsentieren die erwarteten 3 Banden für nicht-, einfach- und zweifach-glykosyliertes PrP^{Sc}.

Durch diese Experimente konnte demnach gezeigt werden, dass der durch STI571 hervorgerufene anti-Prion Effekt sowohl zeit- als auch dosisabhängig ist.

4.3.3. Wie stabil ist der Effekt von STI571 auf PrP^{Sc}?

In den bisherigen Experimenten konnte eine starke Reduktion von PrP^{Sc} durch die Behandlung Prion-infizierter Zellen mit STI571 beobachtet werden. Diese Beobachtung veranlasste zu der Frage, wie nachhaltig diese anti-Prion Wirkung ist, d.h. ob PrP^{Sc} vollständig eliminiert wurde oder ob es in den Zellen wieder zu detektieren ist, wenn die Zellen nach erfolgter Behandlung ohne Zugabe von STI571 weiterkultiviert werden. Für diese Fragestellung wurden ScMHM2-Zellen zehn Tage lang mit 10 µM STI571 behandelt. Dann wurde die Behandlung beendet und die Zellen für 30 Tage weiterkultiviert. Als Kontrolle wurden mock-behandelte Zellen mitgeführt. Alle 10

Tage wurde je eine Test-Zellkulturschale zur Herstellung postnukleärer Extrakte lysiert und die Extrakte mittels Proteinase K-Verdau und anschließendem Western Blot auf das Vorhandensein von PrP^{Sc} getestet.

Das Ergebnis ist in Abbildung 4.3.3.1. gezeigt. Die Spuren 1 – 4 zeigen die Zell-Extrakte direkt nach der zehntägigen Behandlung, um zu dokumentieren, dass kein PrP^{Sc} mehr in den behandelten Zellen zu detektieren war (vergleiche Spur 2 mit Spur 4). Sowohl von den Kontroll-Zellen als auch von den STI571-behandelten Zellen wurden je zwei Schalen weiterkultiviert. Nach weiteren zehn Tagen wurde hiervon wieder eine Schale auf PrP^{Sc} getestet, die andere zur Weiterführung des Versuchs passagiert.

Wie in Abbildung 4.3.3.1. zu sehen ist, konnte selbst nach 30 Tagen ohne Zugabe von STI571 in den zuvor behandelten Zellen kein PrP^{Sc} mehr nachgewiesen werden (Spuren 8, 12 und 16). Dies bedeutet, dass die Zellen soweit von PrP^{Sc} befreit worden waren, dass keine Konversion mehr stattfinden konnte. In den Kontrollzellen hingegen war nach wie vor ein PrP^{Sc}-Signal zu sehen (Spuren 6, 10 und 14).

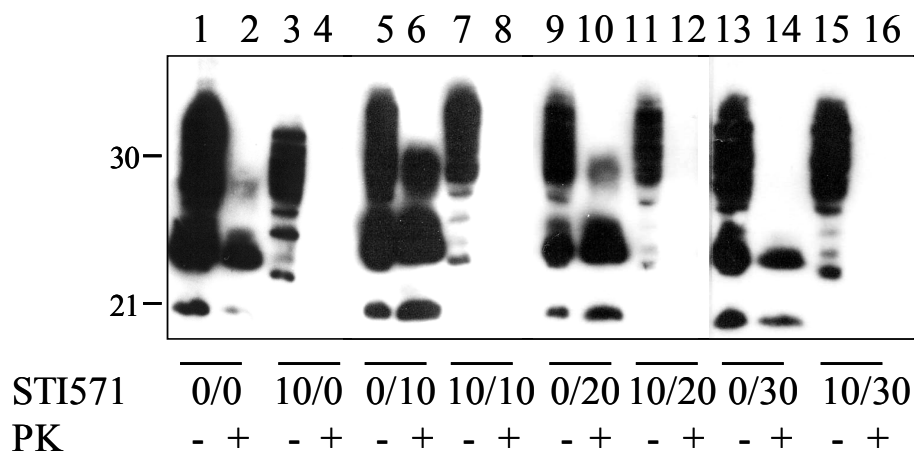


Abb. 4.3.3.1. Die Nachhaltigkeit der Wirkung von STI571 auf ScMHM2-Zellen. ScMHM2-Zellen wurden 10 Tage lang mit 10 μ M STI571 (10/0) bzw. mock-(0/0) behandelt. Dann wurde STI571 entfernt und die behandelten bzw. unbehandelten Zellen für 10 (10/10) bzw. (0/10), 20 (10/20) bzw. (0/20) und 30 (10/30) bzw. (0/30) Tage weiter kultiviert. Die postnukleären Extrakte wurden halbiert, eine Hälfte mit Proteinase K verdaut (+PK), die andere Hälfte direkt gefällt (-PK). Die Analyse der Proben erfolgte mittels Auftrennung auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel und Western Blot mit dem Antikörper 4H11.

Da durch die Behandlung mit STI571 auch nach dessen Wegnahme PrP^{Sc} als Template für die Konversion aus den Zellen entfernt worden und somit die Konversion von PrP^c zu PrP^{Sc} gestoppt worden war, konnten die Zellen als „geheilt“ angesehen werden.

4.3.4. Was geschieht mit PrP^c unter der Behandlung mit STI571?

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Behandlung Prion-infizierter Zellen mit STI571 zu einer starken Reduktion von PrP^{Sc} führt und dass dieser anti-Prion Effekt irreversibel ist. Tierexperimente haben gezeigt, dass für eine Infektion die Expression von PrP^c in Zellen wichtig ist. Allerdings wurde auch beschrieben, dass für eine PrP^{Sc}-Bildung ebenfalls die vorausgehende Lokalisierung von PrP^c an der Plasmamembran notwendig ist (Gilch *et al.* 2001; Nunziante *et al.*, 2003; Gilch & Schätzl, 2003). Daher stellte sich die Frage, ob der Effekt auf PrP^{Sc} durch STI571 auf eine Beeinflussung der Expression, der biochemischen Eigenschaften und/oder der Lokalisierung von PrP^c zurückzuführen war. Im Ausgangs-Screening und in den bisher mit der Substanz STI571 durchgeführten Experimenten konnte kein Effekt auf das Signal von PrP^c im Western Blot beobachtet werden. Sowohl das Glykosylierungsmuster als auch die Signalstärke blieben im Vergleich zur Kontrolle unverändert (vergleiche hierzu Abbildung 4.2.3.). Um jedoch sicher aussagen zu können, dass PrP^c nicht von der Behandlung durch STI571 beeinflusst wird, müssen auch die biochemischen Eigenschaften und vor allem die Lokalisierung von PrP^c unter diesen Bedingungen genau untersucht werden.

Die Löslichkeit von PrP^c in 1 % Sarkosyl unter der Behandlung mit STI571

Die Löslichkeit von PrP^c in nicht-ionischen Detergenzien stellt eine seiner wichtigsten biochemischen Eigenschaften dar. Nach einer Ultrazentrifugation in nicht-ionischem Detergenz bleibt das lösliche PrP^c im Überstand, während PrP^{Sc} unlösliche Aggregate bildet und im Präzipitat zu finden ist. Da Veränderungen in der Faltung oder im Aggregations-Verhalten von PrP^c oftmals von einer Veränderung seiner Löslichkeit begleitet werden, wurde ein Löslichkeits-Assay mit postnukleären Extrakten STI571- bzw. mock-behandelter Zellen (drei Tage, 10 µM) durchgeführt.

Abbildung 4.3.4.1. zeigt die Analyse der Proben im Western Blot. In den mock-behandelten Zellen kann man das Signal von PrP^c im Überstand (Spur 1) und ein deutliches PrP^{Sc}-Signal im Präzipitat (Spur 2) der Ultrazentrifugation entdecken. Nach der Behandlung der Zellen mit STI571 lässt sich kein Unterschied für das Signal von PrP^c feststellen. PrP^c ist immer noch löslich und lässt sich im Überstand detektieren (Spur 3). PrP^{Sc} hingegen ist aus dem Präzipitat verschwunden, was nach Behandlung mit STI571 zu erwarten war (Spur 4).

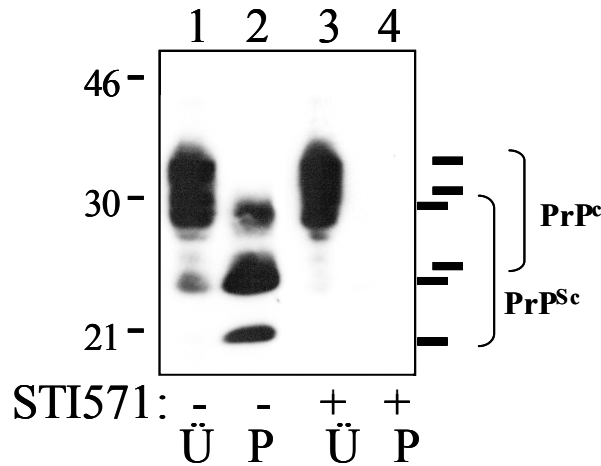


Abb. 4.3.4.1. Löslichkeits-Assay mock- bzw. STI571 behandelter ScMHM2-Zellen. ScMHM2-Zellen wurden 3 Tage mit 10 μ M STI571 (+STI571) bzw. mock- (-STI571) behandelt. Die postnukleären Extrakte wurden für 1 Stunde bei 100.000 g in 1 % Sarkosyl ultrazentrifugiert und Überstände (Ü) bzw. Präzipitate (P) auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot mit dem Antikörper 4H11 analysiert.

Damit konnte gezeigt werden, dass PrP^c nach der Behandlung mit STI571 immer noch löslich ist und keine unlöslichen Aggregate bildet.

Die Lokalisierung von PrP^c an der Zelloberfläche unter der Behandlung mit STI571

Um die Lokalisierung von PrP^c an der Zelloberfläche zu untersuchen, wurde zunächst ein Verdau von STI571- bzw. mock-behandelten Zellen mit dem Enzym PIPLC (Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C) durchgeführt. Dieses Enzym spaltet spezifisch GPI-verankerte Proteine von der Zelloberfläche ab, so dass diese dann ins Medium übertreten. Werden Zellen nach einem Verdau mit diesem Enzym lysiert, so lassen sich Proteine, die an der Plasmamembran über einen GPI-Anker befestigt waren, nicht mehr im Zell-Extrakt nachweisen. Stattdessen sind sie im Medium zu detektieren. N2a- und ScMHM2-Zellen wurden nach dreitägiger Behandlung mit STI571 für vier Stunden einem Verdau mit PIPLC unterzogen. Dann wurde das Medium abgenommen und die darin enthaltenen Proteine gefällt. Die Zellen wurden zur Herstellung postnukleärer Extrakte lysiert und die Lysate ebenfalls gefällt (vergleiche hierzu Abschnitt 3.2.3.5.). Die Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

Abbildung 4.3.4.2. zeigt links das Ergebnis für ScMHM2- rechts das für N2a-Zellen. Bei den ScMHM2-Zellen sind immer Zell-Extrakt und das dazugehörige Medium nacheinander aufgetragen, für die N2a-Zellen links die Zell-Extrakte und rechts die Mediumfraktionen. In den mock-behandelten Kontroll-Zellen ist ohne PIPLC ein deutliches Signal für PrP^c im Zellextrakt zu sehen (Spur 1 bzw. Spur 9), das nach dem Verdau der Zellen stark abnimmt (Spur 3 bzw. Spur 10). Gleichzeitig tritt ein PrP^c-Signal nach dem Verdau mit PIPLC im Medium auf (Spur 4 bzw. Spur 14), das ohne PIPLC nicht zu detektieren ist (Spur 2 bzw. 13). Die gleiche Beobachtung wurde auch nach der Behandlung der Zellen beider Linien mit STI571 gemacht. Ohne den Verdau mit PIPLC lässt sich ein starkes Signal für PrP^c im Zell-Extrakt nachweisen (Spur 5 bzw. Spur 11), während kaum etwas im Medium auftaucht (Spur 6 bzw. Spur 15). Durch den Verdau mit PIPLC ist weniger PrP^c im Zell-Extrakt nachweisbar (Spur 7 bzw. Spur 12), dafür jedoch mehr im Medium (Spur 8 bzw. Spur 16). Dies bedeutet, dass PrP^c auch unter STI571-Behandlung an die Zelloberfläche transportiert und dort über einen GPI-Anker an der Plasmamembran verankert wird. Bei den STI571-behandelten ScMHM2-Zellen konnte zudem das Verschwinden der für PrP^{Sc} spezifischen Banden im Zell-Extrakt beobachtet werden.

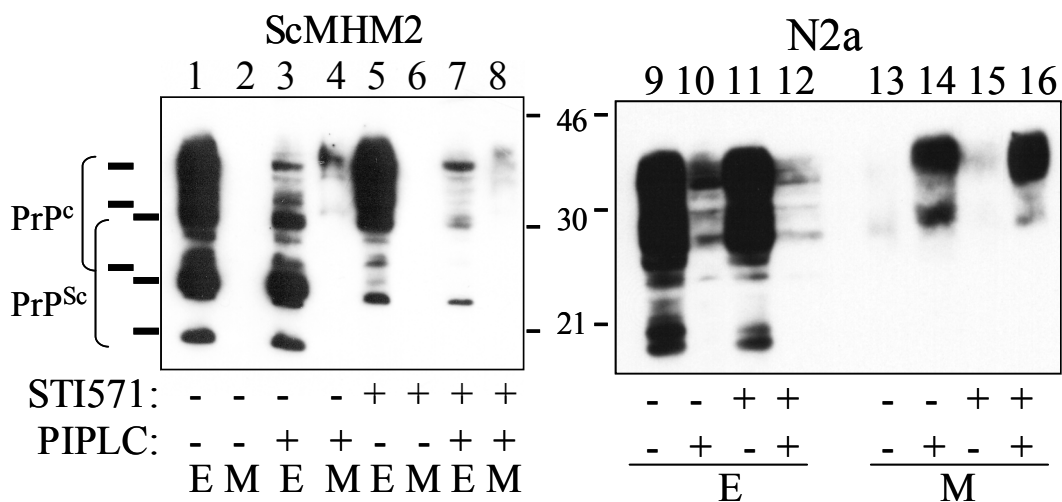


Abb. 4.3.4.2. PIPLC-Studie mock- bzw. STI571-behandelter ScMHM2- bzw. N2a-Zellen. ScMHM2- bzw. N2a-Zellen wurden 3 Tage mock- (-STI571) bzw. mit 10 μ M STI571 (+STI571) behandelt. Nach einem vierstündigen Verdau mit PIPLC (+/- PIPLC) wurden Medium (M) und postnukleäre Extrakte (E) gefällt und die Proben auf einem 12,5 % SDS-Poylacrylamidgel aufgetrennt. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot mit 3F4 (Spuren 1 – 8) bzw. 4H11 Antikörper (Spuren 9 – 16). Die Balken auf der linken Seite repräsentieren die Banden der drei Glykoformen von PrP^c und PrP^{Sc}.

Die im PIPLC-Verdau gezeigte unveränderte Oberflächen-Expression von PrP^c konnte auch mittels konfokaler Mikroskopie (Abbildung 4.3.4.3.) und Durchflusszytometrie (Abbildung 4.3.4.4.) bestätigt werden. Für die konfokale Mikroskopie waren 3F4-PrP überexprimierende N2a-Zellen drei Tage lang mit 10 μ M STI571 behandelt und nach Fixierung und Permeabilisierung immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen PrP gefärbt worden (vergleiche hierzu Abschnitt 3.2.2.7.).

In Abbildung 4.3.4.3. lassen sich keine Unterschiede in der PrP-Färbung zwischen den mock- und den STI571-behandelten Zellen erkennen. In beiden Fällen ist PrP^c in gleichem Maße sowohl an der Zelloberfläche als auch in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert.

3F4-N2a

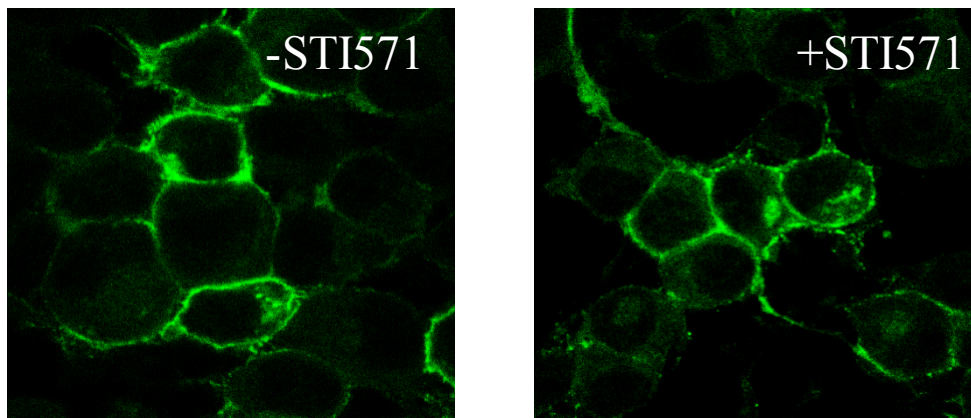


Abb. 4.3.4.3. Immunhistochemische Anfärbung von PrP in mock- bzw. STI571-behandelten 3F4-N2a-Zellen. 3F4-N2a Zellen wurden 3 Tage mock- (-STI571) bzw. mit 10 μ M STI571 (+STI571) behandelt. Die Färbung von PrP fand durch Inkubation der Zellen mit dem Antikörper A7 und darauf folgender Inkubation mit FITC-markiertem Anti-Kaninchen IgG statt. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laser-Mikroskop.

Zur weiteren Untersuchung der Oberflächen-Expression von PrP^c wurden Oberflächen-Durchflusszytometrie Studien durchgeführt. Hierfür wurden 3F4-N2a drei Tage lang mock- bzw. mit 10 μ M STI571 behandelt. Die abgelösten Zellen wurden zunächst mit einem Antikörper gegen PrP inkubiert und dann mit FITC-markiertem Anti-Kaninchen IgG gefärbt. Als Kontrolle wurden tote Zellen mit Propidiumjodid gefärbt, so dass nur lebende Zellen ausgezählt wurden. Zusätzlich wurde ein Ansatz mitgeführt, der nicht mit PrP-Antikörper inkubiert worden war (Ko).

Die graphische Darstellung der Auswertung ist in Abbildung 4.3.4.4. zu sehen. Die Werte auf der Ordinate geben die Fluoreszenzintensität wieder, auf der Abszisse sind

die Anzahl der Zellen aufgetragen. Insgesamt wurden je Ansatz 10.000 lebende Zellen ausgezählt. Den Graphen ist zu entnehmen, dass die Inkubation mit STI571 keine Auswirkung auf die Expression von PrP^c an der Zelloberfläche hatte. Dies geht vor allem aus dem Overlay im dritten Bild hervor.

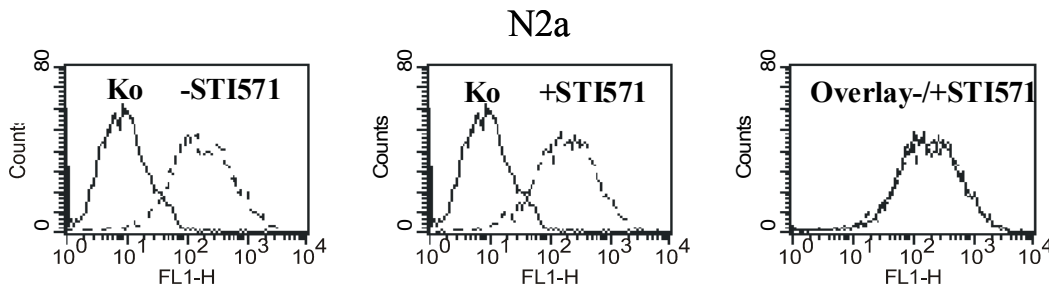


Abb. 4.3.4.4. Durchflusszytometrische Analyse der PrP-Oberflächenexpression mock- bzw. STI571-behandelter N2a-Zellen. 3F4-N2a Zellen wurden 3 Tage mock- (-STI571) bzw. mit 10 μ M STI571 (+STI571) behandelt. Die Färbung von Oberflächen-PrP erfolgte durch Inkubation der abgelösten Zellen mit dem Antikörper A7 und darauf folgender Inkubation mit FITC-markierten Anti-Kaninchen IgG. Als Kontrolle (Ko) wurde der Erstantikörper weg gelassen. Von jeder Probe wurden 10.000 lebende Zellen ausgezählt. Das rechte Bild gibt einen Overlay von mock- und STI571-behandelten Zellen wieder.

Demnach konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit STI571 eine starke Reduktion von PrP^{Sc} bewirkt, aber keinen Einfluss auf die Expression, die Löslichkeit oder die subzelluläre Lokalisierung von PrP^c hat.

4.3.5. Liegt eine Verfälschung des PrP^{Sc}-Nachweises durch Bindung von STI571 an PrP^{Sc} vor?

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass STI571 einen starken, irreversiblen Effekt auf PrP^{Sc} in Prion-infizierten Zellen hatte, ohne dabei die zelluläre Isoform PrP^c zu beeinflussen. Ein sehr wichtiger Aspekt war aber, dass die Zellen immer über die Resistenz gegenüber Proteinase K-Verdau bzw. über die Löslichkeit in 1 % Sarkosyl auf das Vorhandensein von PrP^{Sc} getestet wurden. Hierbei könnte nun die Möglichkeit bestehen, dass STI571 an PrP^{Sc} bindet und diese Interaktion eine Veränderung dieser Eigenschaften bedingt, so dass PrP^{Sc} jetzt sensitiver gegen Proteinase K bzw. löslich in 1 % Sarkosyl wäre. Dann wäre PrP^{Sc} zwar noch in den Zellen vorhanden, aber nicht

mehr über unsere Methoden nachweisbar. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden nicht lebende Zellen sondern ein Lysat von ScMHM2-Zellen über Nacht mit 10 μM STI571 inkubiert. Dann wurde ein Proteinase K-Verdau durchgeführt und die Proben nach Fällung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert (vergleiche hierzu Abschnitt 3.2.3.10.).

In Abbildung 4.3.5.1. kann man sehen, dass die *in vitro*-Inkubation von bereits gewonnenem postnukleärem Extrakt mit STI571 keinen Effekt auf PrP^{Sc} hatte. Das Signal für PrP^{Sc} in der Proteinase K-verdauten Probe ist im STI571-behandelten Extrakt genauso stark wie im mock-behandelten Extrakt.

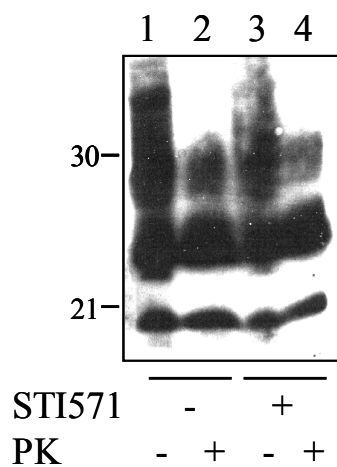


Abb. 4.3.5.1. Test auf eine *in vitro*-Wirkung von STI571 auf PrP^{Sc}. Postnukleäre Extrakte von ScMHM2-Zellen wurden über Nacht bei 4° C mock- (-STI571) bzw. mit 10 μM STI571 (+STI571) inkubiert. Die Ansätze wurden halbiert, jeweils eine Hälfte der Extrakte wurde mit Proteinase K verdaut (+PK) die andere Hälfte direkt gefällt (-PK). Die Proben wurden auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western Blot mit 3F4 Antikörper analysiert.

Damit konnte gezeigt werden, dass für einen anti-Prion Effekt von STI571 lebende Zellen notwendig sind. Das Fehlen PrP^{Sc}-spezifischer Banden nach Proteinase K-Verdau im Western Blot kommt nicht dadurch zustande, dass STI571 an PrP^{Sc} bindet und dieses dadurch sensitiver gegenüber Proteinase K macht. Weiterhin offen bleibt aber die Möglichkeit, dass STI571 intrazellulär (*intra vitam*) an PrP^{Sc} bindet und es dadurch zugänglicher für die zelluläre Degradation macht, wie es beispielsweise für die RNA-Aptamere gezeigt werden konnte (Proske *et al.*, 2002).

Alle diese Versuche bewiesen, dass die Behandlung Prion-infizierter Zellen mit STI571 eine starke Reduktion von PrP^{Sc} verursacht und unter Umständen auch eine Heilung der Zellen herbeiführen kann. Zudem wurde gezeigt, dass die zelluläre Isoform PrP^c von STI571 nicht beeinflusst wird und der Effekt auf PrP^{Sc} damit nicht in einer Veränderung der Eigenschaften von PrP^c, dem Substrat der Konversion, begründet ist. Daneben konnte im letzten Versuch verdeutlicht werden, dass für den Effekt von STI571 auf PrP^{Sc} lebende Zellen benötigt werden: Dies bedeutet, dass zelluläre Prozesse für den anti-Prion Effekt verantwortlich sind.

4.4. Der molekulare Wirkungsmechanismus von STI571

4.4.1. STI571 hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Neubildung von PrP^{Sc}

Da bisher beobachtet werden konnte, dass durch die STI571-Behandlung PrP^{Sc} eliminiert wird und dieser Effekt durch zelluläre Mechanismen verursacht werden muss, sollten diese Mechanismen näher untersucht werden. Eine interessante Frage war der Angriffspunkt von STI571 in der Konversion (vergleiche hierzu Abbildung 2.6.1.). Beeinflusst STI571 den Konversionsprozess, d.h. inhibiert es in irgendeiner Weise die Neubildung von PrP^{Sc} oder wirkt es direkt auf PrP^{Sc}, das Endprodukt und Template der Konversion? Um die Neubildung von PrP^{Sc} unter STI571-Behandlung zu untersuchen, wurden metabolische Radiomarkierungs-Experimente durchgeführt (vergleiche hierzu Abschnitt 3.2.2.8.). In diesen Experimenten werden Prion-infizierte Zellen über einen Zeitraum radioaktiv markiert, der von der Zelle benötigt wird, um neu gebildetes, markiertes PrP^c in PrP^{Sc} zu konvertieren und zu akkumulieren. Während dieser Zeit werden die Zellen mit der zu testenden Substanz behandelt. Direkt nach der Markierung werden die Extrakte auf den Gehalt an PrP^{Sc} untersucht. Lassen sich Unterschiede in der Signalstärke im Vergleich zu mock-behandelten Kontroll-Zellen nachweisen, so hatte die Substanz einen Effekt auf die Neubildung von PrP^{Sc}. Bestehen hingegen keine Unterschiede, so bleibt die Neubildung von der jeweiligen Substanz unbeeinflusst.

Hierfür wurden ScMHM2-Zellen über Nacht radioaktiv markiert und gleichzeitig entweder mit 10 μ M STI571 oder mock-behandelt. Als Positiv-Kontrolle für einen Effekt auf die Neubildung von PrP^{Sc} wurde zudem eine Zellkulturschale mit Suramin behandelt, von dem bekannt ist, dass es die Neubildung von PrP^{Sc} inhibiert (Gilch *et al.* 2001, Gilch *et al.* 2004). Dann wurden die postnukleären Extrakte mit Proteinase K verdaut und die Präzipitate aus dem daran angeschlossenen Löslichkeits-Assay gegen PrP immunpräzipitiert (vergleiche hierzu Abschnitt 3.2.2.8.).

Abbildung 4.4.1.1. zeigt eine Autoradiographie der SDS-Gelelektrophorese der deglykosylierten Proben. Die Banden repräsentieren PrP, das im Markierungszeitraum gebildet worden war. Links sind die nicht Proteinase K-verdauten Proben aufgetragen (Spuren 1 – 3, -PK), rechts die Proben, die mit Proteinase K verdaut wurden (Spuren 4 – 6, +PK). In den Kontroll-Zellen sieht man bei 19 kDa (unterer Balken) ein Signal für PrP^{Sc} sowohl in den Proteinase K-verdauten (Spur 4) als auch in den unverdauten Proben der Kontroll-Zellen (Spur 1). Gleiches lässt sich für die STI571-behandelten Zellen beobachten (Spur 3 bzw. Spur 7), was bedeutet, dass STI571, im Gegensatz zu Suramin, nicht die Neubildung von PrP^{Sc} inhibieren konnte. In den mit Suramin behandelten Zellen ist kein Signal für PrP^{Sc} mehr zu detektieren. Weder in der mit Proteinase K verdauten (Spur 5), noch in der nicht verdauten Probe (Spur 2). Stattdessen taucht in dem Extrakt, der nicht mit Proteinase K verdaut wurde, bei 27 kDa (oberer Balken) unlösliches PrP^c der vollen Länge auf (Spur 2), das allerdings Proteinase K-sensitiv ist und in Spur 5 somit nicht mehr nachweisbar ist. Die Entstehung von unlöslichem, Proteinase K-sensitivem PrP^c ist darin begründet, dass die Suramin-Behandlung zur Aggregation von PrP^c im Trans-Golgi-Netzwerk führt. Dieses aggregierte PrP^c ist in 1 % Sarkosyl unlöslich (Gilch *et al.* 2001; Gilch *et al.*, 2004).

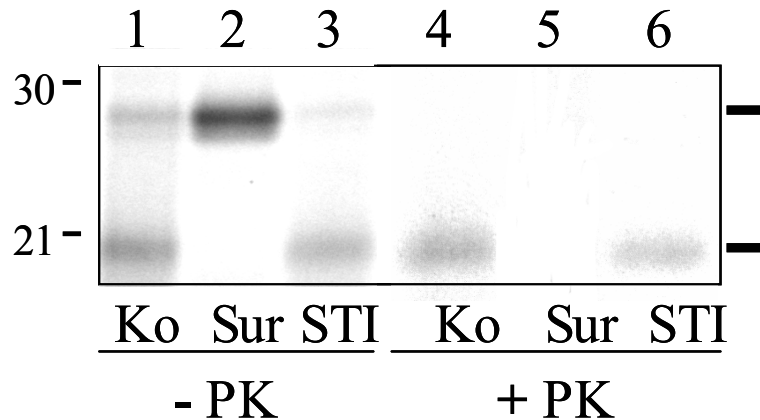


Abb. 4.4.1.1. Metabolisches Radiomarkierungsexperiment: Kein Einfluss von STI571 auf die Neubildung von PrP^{Sc}. ScMHM2-Zellen wurden für 16 Stunden mit ³⁵S markiert. Währenddessen wurden sie entweder mock- (Ko), mit 10 µM STI571 (STI) oder mit 200 µg/ml Suramin (Sur) behandelt. Dann wurden die Zellen lysiert und nach einem Proteinase K-Verdau der einen Hälfte (+PK) der postnukleären Extrakte wurde beide Extrakt hälften (+PK und -PK) einem Löslichkeits-Assay unterworfen. Die Präzipitate daraus wurden in einer Immunpräzipitation mit dem Antikörper A7 eingesetzt. Immunpräzipitiertes PrP wurde von der Sepharose eluiert, deglykosyliert und auf ein 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Trocknen des Gels wurden Autoradiographien angefertigt.

Dieses Experiment zeigte, dass trotz Zugabe von STI571 zum Medium PrP^{Sc} gebildet worden war. Dies bedeutet, dass STI571 im Gegensatz zu Suramin keinen wesentlichen Effekt auf die Neubildung von PrP^{Sc} hat. Folglich muss der Effekt von STI571 auf PrP^{Sc} direkt, d.h. PrP^{Sc} selbst das Ziel des anti-Prion Effekts sein.

4.4.2. STI571 reduziert die Halbwertszeit von PrP^{Sc} in Prion-infizierten Zellen

Im vorigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass STI571 direkt auf PrP^{Sc} wirken muss. Um diese These zu bestärken, sollten Untersuchungen zur Halbwertszeit von PrP^{Sc} durchgeführt werden. Dies geschah erneut mit Hilfe von metabolischen Radiomarkierungs-Experimenten. Der Unterschied zum Markierungsexperiment aus dem vorangegangenen Kapitel besteht darin, dass hier nicht die Neubildung eines Proteins analysiert wird, sondern dessen Abbau. Dazu markiert man Zellen metabolisch mit ³⁵S („pulse“), setzt einen Zeitpunkt „0“, an dem die Markierung beendet wird, kultiviert die Zellen weiter und nimmt über einen bestimmten Zeitraum hinweg in verschiedenen Abständen Proben („chase“), die dann durch Immunpräzipitation auf das

Vorhandensein des zu analysierenden Proteins untersucht werden. Durch die beobachtete Abnahme des Signals, die den Abbau des Proteins durch die Zelle wiedergibt, lässt sich die Halbwertszeit des Proteins bestimmen. Will man nun den Effekt einer Substanz auf die Halbwertszeit eines Proteins untersuchen, so gibt man sie ab dem Zeitpunkt „0“ zum Kulturmedium und vergleicht die unter der Behandlung der Zellen mit dieser Substanz ermittelte Halbwertszeit mit der Halbwertszeit des Proteins in den mock-behandelten Kontroll-Zellen.

Da die Halbwertszeit von PrP^{Sc} in ScMHM2-Zellen bei etwa ≥ 24 Stunden liegt (Borchelt *et al.*, 1992), wurden die Zellen nach dem Markieren über einen Zeitraum von 24 Stunden mock- bzw. mit 20 μ M STI571 behandelt, Innerhalb dieser Zeit wurden zu verschiedenen Zeitpunkten je eine Zellkulturschale Kontroll-Zellen und eine Schale STI571-behandelte Zellen lysiert und die Proteinase K-verdauten postnukleären Extrakte einem Löslichkeits-Assay unterzogen. Nach einer Immunpräzipitation der Präzipitate mit einem Anti-PrP Antikörper wurden die eluierten Immunkomplexe deglykosyliert und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Die Autoradiographie des SDS-Polyacrylamidgels ist in Abbildung 4.4.2.1. (A) zu sehen. Die Lyse zum Zeitpunkt „0“ fand direkt nach dem Markieren statt und gibt den Ausgangsgehalt an PrP^{Sc} wieder. Die Signale repräsentieren PrP^{Sc}, das während der Markierung gebildet wurde (in Abbildung 4.2.2.1. (A) durch einen Pfeil gekennzeichnet). Auf den ersten sechs Spuren sind die Extrakte der Kontroll-Zellen aufgetragen auf den Spuren 7 – 12 die Extrakte der Zellen, die nach dem Markieren mit STI571 behandelt worden waren. Das Signal für PrP^{Sc} in den Kontroll-Extrakten weist keine Veränderungen zwischen den einzelnen Zeitpunkten auf, die Signalstärke bleibt durchgehend gleich (Spuren 1 – 6). Betrachtet man jedoch die Extrakte der STI571-behandelten Zellen, so lässt sich eine Abnahme der Signalstärke über die Zeit hinweg feststellen (Spuren 7 – 12). Dies bedeutet, dass PrP^{Sc} allmählich degradiert wird. Abbildung 4.4.2.1. (B) zeigt eine graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung dreier voneinander unabhängiger Experimente. In ihr ist zu erkennen, dass die Halbwertszeit von PrP^{Sc} bei über 24 Stunden liegt. In den Zellen, die mit STI571 behandelt wurden, dagegen liegt die Halbwertszeit deutlich darunter, nämlich bei weniger als neun Stunden.

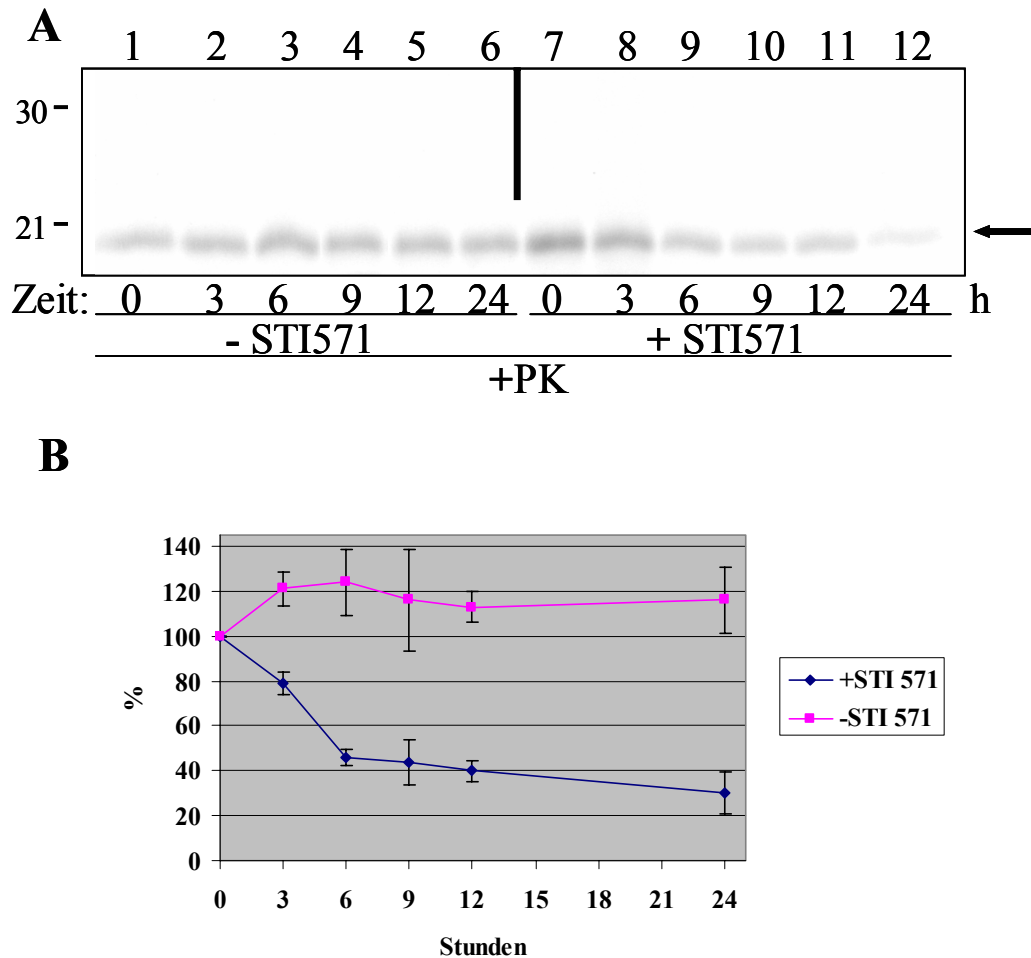


Abb. 4.2.2.1. Metabolische Radiomarkierung: Halbwertszeit-Studien von PrP^{Sc}. ScMHM2-Zellen wurden 16 Stunden mit ³⁵S markiert. Dann wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 0, 3, 6, 9, 12 bzw. 24 Stunden mit 20 μM STI571 (+STI571) bzw. ohne STI571 (-STI571) weiterkultiviert. Die postnukleären Extrakte wurden mit Proteinase K verdaut und die Präzipitate des darauf folgenden Löslichkeits-Assays mit pAk A7 immunpräzipitiert. Nach der Elution von der Sepharose wurden die Proben deglykosyliert und auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. (A): Vom getrockneten Gel wurden Autoradiographien angefertigt (B): Densitometrische Auswertung dreier voneinander unabhängiger Experimente, Exposition der Gele auf einem Phospho-Screen und Auswertung am Phosphor-Imager. Der Wert zum Zeitpunkt „0“ der Kontrollzellen wurde gleich 100 % gesetzt, die übrigen Werte beziehen sich darauf.

Die leichte Verstärkung des Signals für PrP^{Sc}, die sich im Kontroll-Extrakt zum Zeitpunkt „3“ (Spur 2) im Vergleich zum Zeitpunkt „0“ detektieren lässt, hat ihre Ursache in der Tatsache, dass zwischen Zeitpunkt „0“ und Zeitpunkt „3“ ein gewisser Teil von markiertem PrP^c zu PrP^{Sc} konvertiert wird. Da gleichzeitig aber kein PrP^{Sc} abgebaut wird, steigt die Menge an PrP^{Sc} geringfügig an.

Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass STI571 nicht die Neubildung von PrP^{Sc} verhindert, sondern dass es den zellulären Abbau von vorhandenem PrP^{Sc} beschleunigt, so dass die Halbwertszeit von PrP^{Sc} um mehr als 50 % reduziert wird.

4.4.3. Welche Degradationsmechanismen werden von STI571 aktiviert?

Da demonstriert werden konnte, dass STI571 die zelluläre Degradierung von bereits in der Zelle vorhandenem PrP^{Sc} aktiviert, sollten weitere Experimente helfen, die zugrunde liegenden Degradations-Mechanismen zu identifizieren. In der Zelle existieren vornehmlich zwei Degradations-Wege: zum einen der lysosomale Weg, zum anderen der Abbau über das Proteasom. Da postuliert wird, dass die Konversion von PrP^c zu PrP^{Sc} an der Plasmamembran oder in den frühen Vesikeln des endozytotischen Weges stattfindet und die Vesikel der zellulären Endozytose sehr eng mit dem lysosomalen Abbauweg in Verbindung stehen, wurde sich im Folgenden auf den lysosomalen Degradationsmechanismus konzentriert. Durch Hemmung der lysosomalen Degradierung sollte untersucht werden, ob damit dem Effekt von STI571 auf den Abbau von PrP^{Sc} entgegen gewirkt werden kann. Lysosomen sind zelluläre Vesikel, in denen ein sehr saures Milieu herrscht und die mit einer Vielzahl an Enzymen ausgestattet sind, die zur Aufspaltung und Degradierung großer Moleküle benötigt werden. Der saure pH-Wert ist zum einen für eine initiale Aufhebung von Wechselwirkungen zwischen den Molekülen wichtig und zum anderen sind die lysosomalen Enzyme nur bei niedrigem pH-Wert aktiv. Durch Chemikalien, die den pH-Wert in den Lysosomen ändern, lässt sich der lysosomale Abbau unspezifisch inhibieren, da es zum totalen Erliegen der lysosomalen Degradierung kommt. Um die am Abbau eines bestimmten Proteins beteiligten Proteasenfamilien einzugrenzen, kann man durch spezielle Inhibitoren spezifisch einzelne Proteasen oder Proteasenfamilien hemmen. Hierbei bleibt der Großteil der Proteasen weiter aktiv und der lysosomale Abbau wird weitgehend weiter vollzogen.

Um zunächst die Beteiligung von Lysosomen an dem Abbau von PrP^{Sc} unter der Einwirkung von STI571 zu untersuchen, wurden die Zellen mit Ammoniumchlorid (NH₄Cl) behandelt. NH₄Cl führt zur Anhebung des lysosomalen pH-Werts und damit zur Inaktivierung des lysosomalen Abbauwegs in der Zelle.

ScMHM2-Zellen wurden für einen Tag mit 10 μM STI571 vorbehandelt. Dann wurde zur Inhibierung der Lysosomen neben 10 μM STI571 auch 10 mM NH_4Cl zum Medium gegeben. Nach 24 Stunden wurden postnukleäre Extrakte hergestellt und durch einen Verdau mit Proteinase K auf den Gehalt an PrP^{Sc} hin untersucht.

In Abbildung 4.4.3.1. ist der Western Blot der gefällten und gelelektrophoretisch aufgetrennten Proben zu sehen. Als Kontrolle dienten zum einen mock-behandelte Zellen (Spuren 1 + 2) bzw. Zellen, die zwei Tage nur mit STI571 (Spuren 3 + 4) oder einen Tag nur mit NH_4Cl (Spuren 7 + 8) behandelt worden waren. Wie in Spur 4 zu sehen ist, war durch die Behandlung mit STI571 kein PrP^{Sc} mehr in den Zellen vorhanden. Wurde jedoch die lysosomale Aktivität durch Zugabe von NH_4Cl gehemmt, so war im Western Blot wieder ein deutliches Signal für PrP^{Sc} zu detektieren (Spur 6).

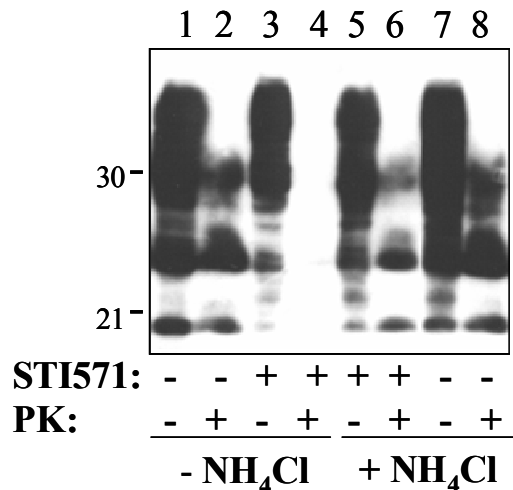


Abb. 4.4.3.1. Die Untersuchung der Auswirkung einer Inhibition von Lysosomen auf die Degradation von PrP^{Sc} in mock- und STI571-behandelten ScMHM2-Zellen. ScMHM2-Zellen wurden insgesamt 2 Tage mock- (-STI571) bzw. mit 10 μM STI571 (+STI571) behandelt, wobei zu je einem mock- bzw. STI571-Ansatz am zweiten Tag zusätzlich 10 mM NH_4Cl (+ NH_4Cl) zugegeben wurde. Zusätzlich wurde je ein mock- bzw. STI-Ansatz ohne NH_4Cl als Kontrolle mitgeführt (- NH_4Cl). Die postnukleären Extrakte wurden jeweils halbiert, die eine Hälfte mit Proteinase K verdaut (+PK), die andere direkt gefällt (-PK). Die Proben wurden auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot mit 4H11 Antikörper analysiert.

Interessanterweise ließ sich durch die alleinige Behandlung mit NH_4Cl eine leichte Verstärkung des PrP^{Sc} -Signals feststellen, was darauf hindeuten könnte, dass der lysosomale Abbau auch bei der physiologischen Degradierung von PrP^{Sc} in der Zelle eine Rolle spielt.

Da bei der spezifischen Inhibition einzelner Proteasen kein so deutlicher Effekt zu erwarten ist wie bei einer totalen Hemmung des lysosomalen Abbaus, wurden metabolische Radiomarkierungs-Experimente durchgeführt. In diesen Versuchen wird nur eine kleine, markierte Subpopulation von PrP^{Sc} analysiert, weswegen sich auch geringe Effekte detektieren lassen sollten.

Abbildung 4.4.3.2. zeigt die Autoradiographie des Experimentes. Als Inhibitor wurde Pepstatin A verwendet. Pepstatin A ist ein spezifischer Inhibitor von Aspartat-Proteasen wie zum Beispiel der HIV-Protease, Cathepsin D, Renin oder Pepsin. ScMHM2-Zellen wurden über Nacht radioaktiv markiert. Hierbei wurden die Zellen mit 10 µM Pepstatin A vorbehandelt, um die Proteasen bereits vor Zugabe von STI571 zu inhibieren und so einen eventuell vorhandenen Effekt zu verstärken. Wie in den Studien zur Halbwertszeit von PrP^{Sc} wurde nach dem Markieren das Medium gewechselt und die Zellen für 12 bzw. 24 Stunden weiterkultiviert. Hierbei wurden die Zellen sowohl mit 10 µM Pepstatin A als auch zusätzlich mit 20 µM STI571 (STI+Pep) behandelt. Als Kontrollen dienten mock-behandelte Zellen (Kontrolle) bzw. Zellen, die nur mit Pepstatin A (Pep) oder nur mit STI571 (STI) behandelt wurden. Die Lyse zum Zeitpunkt „0“ fand direkt nach dem Markieren statt und gibt die Menge an PrP^{Sc} wieder, die über diesen Zeitpunkt gebildet worden war. Nach dem Proteinase K-Verdau der Extrakte wurden die Präzipitate des Löslichkeits-Assays mit einem Anti-PrP Antikörper immunpräzipitiert und die Proben vor der gelelektrophoretischen Auftrennung deglykosyliert.

Wie in Abbildung 4.4.3.2. zu sehen ist, führte die Behandlung der Zellen mit STI571 im Vergleich zu dem Kontroll-Extrakt 24 Stunden nach der Markierung zu einer Reduktion von PrP^{Sc} (vergleiche Spur 3 mit Spur 5). Wurden die Zellen jedoch zusätzlich mit Pepstatin A behandelt, so wurde das 24 Stunden Signal für PrP^{Sc} wieder leicht stärker (Spur 8). Somit war auch Pepstatin A in der Lage, die durch STI571 verursachte Degradierung von PrP^{Sc} zu inhibieren. Als Negativ-Kontrolle war Marimastat, ein Inhibitor von Metallo-Matrix-Proteasen, analog zu Pepstatin eingesetzt worden. Er hatte wie erwartet keinen Effekt auf die Wirkung von STI571 (Spur 13).

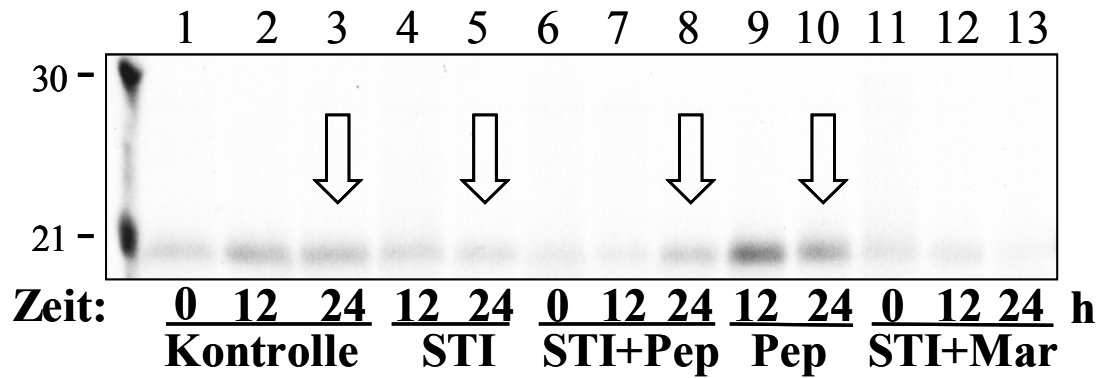


Abb. 4.4.3.2. Die Auswirkung von Pepstatin A auf die Degradation von PrP^{Sc} in mock- bzw. STI-behandelten ScMHM2-Zellen. ScMHM2-Zellen wurden 16 Stunden mit ³⁵S markiert und gleichzeitig mock- bzw. mit 10 µM Pepstatin A vorbehandelt. Dann wurde das Medium gewechselt und die Zellen 12, bzw. 24 Stunden entweder mock- (Kontrolle), mit 20 µM STI571 (STI), mit 20 µM STI571 und 10 µM Pepstatin A (STI+Pep) oder 10 µM Pepstatin A (Pep) behandelt. Als Negativ-Kontrolle für einen Effekt auf die von STI571 hervorgerufene Degradierung von PrP^{Sc} diente der Metallo-Matrix-Proteasen-Inhibitor Marimastat (STI+Mar). Nach dem Löslichkeits-Assay der postnukleären Extrakte wurden die Präzipitate mit pAk A7 immunpräzipitiert. Die von der Sepharose eluierten Proben wurden deglykosyliert und auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Autoradiographie des Gels analysiert. Die 24 Stunden-Proben sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Zudem wies das Signal für PrP^{Sc} im Extrakt der Zellen, die mit Pepstatin A alleine behandelt worden waren, eine stärkere Intensität auf als in den Kontroll-Zellen (vergleiche Spuren 2 + 3 mit Spuren 9 + 10). In Analogie zum vorangegangenen Versuch mit NH₄Cl weist dies darauf hin, dass die mit Pepstatin A inhibierten Proteasen in der physiologischen Degradierung von PrP^{Sc} in der Zelle eine wichtige Rolle spielen. Anhand der Ergebnisse dieser beiden Experimente konnte demonstriert werden, dass durch die Behandlung Prion-infizierter Zellen mit STI571 die lysosomale Degradierung von PrP^{Sc} aktiviert wird und dass die Lysosomen auch am physiologischen Abbau von PrP^{Sc} in der Zelle beteiligt sind.

4.4.4. Die Lysosomen unter der Behandlung mit STI571

Die vorangegangenen Versuche hatten gezeigt, dass STI571 die lysosomale Degradierung von PrP^{Sc} aktiviert bzw. verstärkt. Eine Aktivierung der lysosomalen Degradierung könnte über mehrere Wege zustande kommen. Einmal bereits auf DNA-Ebene, durch eine veränderte Expression lysosomaler Enzyme. Zum anderen könnte auch die Bildung

von Lysosomen in der Zelle verstärkt werden. Schließlich kann auch eine Beeinflussung des Transports von Vesikeln in der Zelle zu einer veränderten Degradierung führen. Um die Morphologie der Lysosomen unter STI571-Behandlung zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenz-Versuche durchgeführt. Von Interesse waren hierbei vor allem Veränderungen in der Anzahl oder der Größe der Lysosomen. Hierfür wurden die Lysosomen mock- und STI571-behandelter ScMHM2- und N2a-Zellen mit einem Antikörper gegen das lysosomale Membranprotein Lamp-1, einem spezifischen Marker für Lysosomen, inkubiert und mit Texas Red-markiertem Zweitantikörper gefärbt.

Abbildung 4.4.4.1. zeigt Aufnahmen der Färbung mit dem konfokalen Laser-Mikroskop. Aus ihnen wird eine Veränderung sowohl in der Größe als auch in der Anzahl der Lysosomen nach Behandlung der Zellen mit STI571 ersichtlich.

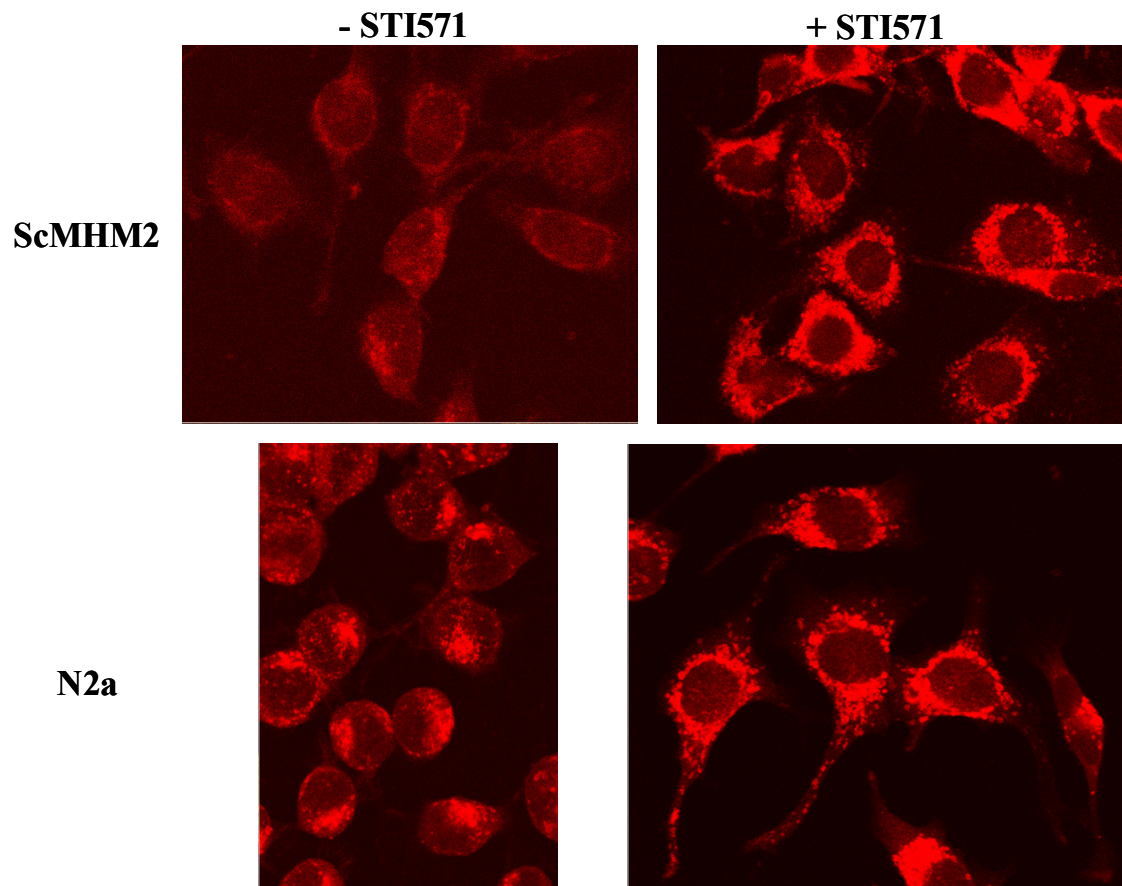


Abb. 4.4.4.1. Immunfluoreszenz-Färbung der Lysosomen mock- bzw. STI571-behandelter ScMHM2- bzw. N2a-Zellen. ScMHM2- und N2a-Zellen wurden 3 Tage mock- bzw. mit 10 μ M STI571 behandelt. Dann wurden die fixierten und permeabilisierten Zellen zunächst mit dem Antikörper Anti-CD107a gegen Lamp-1 inkubiert und mit Texas-Red-markierten Esel Anti-Ratte IgG gefärbt. Die Auswertung der eingedeckten Zellen erfolgte am konfokalen Laser-Mikroskop.

Dieses Ergebnis unterstützte die bisher gemachten Beobachtungen, dass der durch STI571 verursachte Abbau von PrP^{Sc} über einen Effekt dieser Substanz auf die Lysosomen hervorgerufen wird.

4.4.5. Haben Lysate STI571-behandelter Zellen eine erhöhte proteolytische Aktivität?

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass bei dem durch die Behandlung mit STI571 hervorgerufenen Abbau von PrP^{Sc} die zellulären Lysosomen eine Rolle spielen. Im nächsten Versuch sollte Lysat STI571-behandelter Zellen auf eine verstärkte proteolytische Aktivität hin untersucht werden. Dafür wurden mock- bzw. STI571-behandelte N2a-Zellen in einem sauren, den Lysosomen ähnlichen Milieu, lysiert und zusammen mit postnukleären Extrakten von ScMHM2-Zellen inkubiert. Zusätzlich wurden auch Reaktionsansätze mit dem Proteasen-Inhibitor Pepstatin A mitgeführt, um Inhibitions-Versuche einzuschließen (vergleiche hierzu Abschnitt 3.2.3.11). Wäre die proteolytische Aktivität des Lysats STI571-behandelter Zellen erhöht, so sollte sich nach der Inkubation im Vergleich zu dem Reaktionsansatz mit Lysat aus den mock-behandelten Kontroll-Zellen ein Unterschied im PrP^{Sc}-Gehalt ergeben. Die Proteinase K-verdauten Reaktionsansätze wurden nach der Fällung gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

Das Ergebnis hierzu ist in Abbildung 4.4.4.1. zu sehen. Als Kontrollen dienten Proteinase K-Verdaus von Extrakten mock- bzw. STI571-behandelter Zellen, die unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden. Statt der Inkubation mit N2a-Zell-Lysat waren diese Extrakte nur mit dem entsprechenden Lyse-Puffer inubiert worden (Spuren 1 – 4, -N2a-Lysat). Wie den Spuren 6 und 10 zu entnehmen ist, ließ sich kein Unterschied im PrP^{Sc}-Gehalt zwischen den Reaktionsansätzen mit Lysat aus STI571-behandelten N2a-Zellen und Lysat aus den Kontroll-N2a-Zellen feststellen. Auch die Inkubation mit Pepstatin A hatte in beiden Fällen keinen Effekt (Spur 8 bzw. 12).

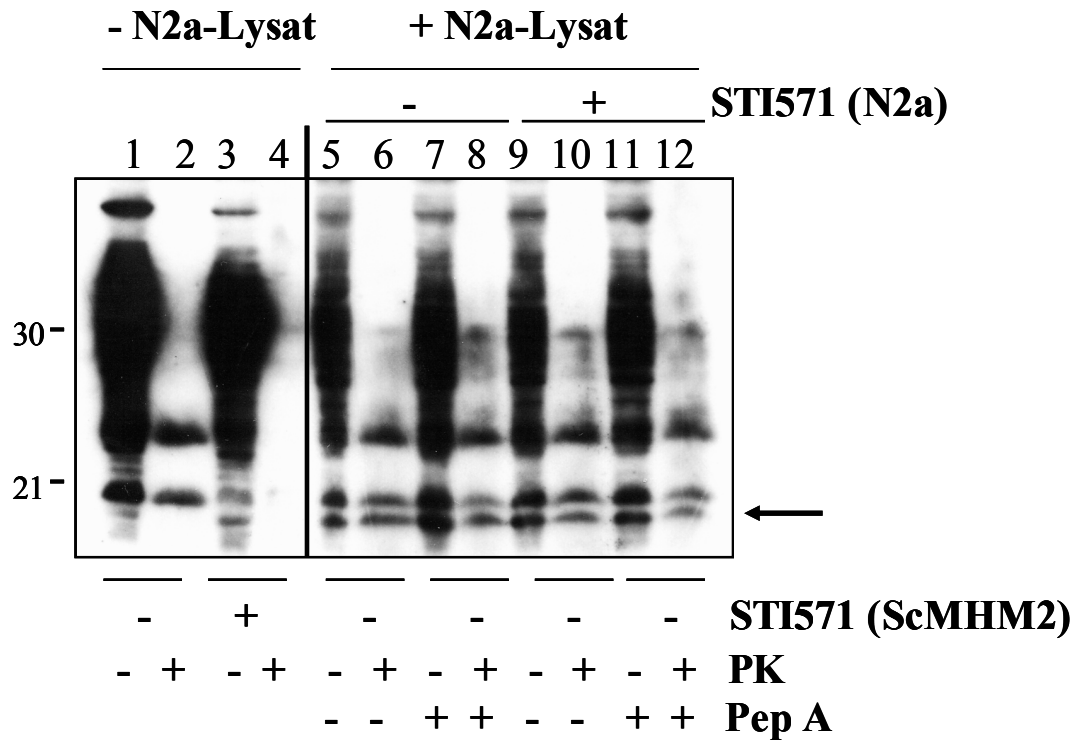


Abb. 4.4.5.1. Test auf proteolytische Aktivität im Lysat von mock- bzw. STI571-behandelten N2a-Zellen. Mes-Lysat von N2a-Zellen, die drei Tage mock- (-STI571 (N2a)) bzw. mit 10 μ M STI571 (+STI571 (N2a)) behandelt worden waren, wurde mit postnukleärem Mes-Extrakt von ScMHM2-Zellen inkubiert (-STI571 (ScMHM2)). Um eine Inhibition eventueller Degradationsprozesse zu untersuchen, wurde jeweils zu jedem Ansatz (+/- STI571 (N2a)) auch ein Ansatz mit 100 μ M Pepstatin A mitgeführt. Jede Reaktion wurde dann halbiert, eine Hälfte mit Proteinase K verdaut, die andere Hälfte direkt gefällt. Als Kontrolle für den ursprünglichen PrP^{Sc}-Gehalt im postnukleären Mes-Extrakt der ScMHM2-Zellen wurden ScMHM2-Zellen mock- (-STI571 (ScMHM2)) bzw. mit 10 μ M STI571 (+STI571 (ScMHM2)) behandelt. Die postnukleären Mes-Extrakte dieser Zellen wurden halbiert, die eine Hälfte im gleichen Puffer mit Proteinase K verdaut, die andere Hälfte direkt gefällt. Sämtliche Proben wurden nach der Fällung auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western Blot mit dem Antikörper 4H11 analysiert. Der Pfeil kennzeichnet eine zusätzliche Bande, die in den mit Mes-Extrakt behandelten Proben auftaucht.

Vergleicht man allerdings die PrP^{Sc}-Signale aus den Reaktionsansätzen (Spuren 6, 8, 10 und 12) mit dem PrP^{Sc}-Gehalt im Test-Extrakt (Spur 2), kann man bei etwa 15 kDa das Auftauchen einer zusätzlichen Proteinase K-resistenten Bande im PrP-Signal unterhalb der nicht-glykosylierten PrP^{Sc}-Bande beobachten (in der Abbildung durch einen Pfeil gekennzeichnet). Diese Bande taucht bereits in den nicht mit Proteinase K-verdauten Extrakten auf, so dass man davon ausgehen kann, dass die Spaltung durch die Inkubation mit dem N2a-Lysat entstanden ist. Die Inkubation über Nacht im sauren Milieu alleine kann diese Spaltung nicht hervorgerufen haben, da diese zweite Bande in den Kontroll-Extrakten nicht auftaucht (Spuren 1 – 4, - N2a-Lysat). Dies bedeutet, dass die Zugabe von N2a-Lysat der Grund dafür sein muss. Eine denkbare Erklärung wäre,

dass der PrP^{Sc}-Gehalt durch die Zugabe von zusätzlichem Extrakt nicht-infizierter Zellen zum einen verdünnt wird und zum anderen mit zusätzlicher proteolytischer Aktivität konfrontiert wird, was zu einer teilweisen Spaltung von PrP^{Sc} führen könnte. Da nur ein Spaltprodukt zu sehen ist und im sonstigen Muster von PrP^{Sc} keine Veränderungen auftauchen, wäre es denkbar, dass die Spaltung nur die nicht-glykosylierte Form betrifft und das Spaltprodukt (~ 4 kDa) im Gel nicht mehr auftaucht. Einen weiteren Hinweis auf eine proteolytische Aktivität im N2a-Extrakt gibt das Signal von PrP^c, das in den Kontroll-Extrakten (Spuren 1 – 4) stärker ist als in den Reaktionsansätzen (Spuren 5 – 12), obwohl vergleichbare Proteinnengen aufgetragen worden waren. Zusätzlich war ursprünglich in den +N2a-Lysat Reaktionsansätzen (Spuren 9 – 12) durch die Zugabe von zusätzlichem Zell-Extrakt mehr PrP^c vorhanden als in den Kontroll-Ansätzen (-N2a-Lysat). Demnach scheint auch PrP^c von dieser Proteolyse durch den N2a-Extrakt betroffen zu sein. Auch bei dieser proteolytischen Spaltung zeigen PrP^c und PrP^{Sc} Unterschiede. PrP^c zeigt eine komplette Degradierung, PrP^{Sc} ist relativ resistent dagegen. Die Tatsache, dass nach einer Inkubation über Nacht immer noch relativ viel PrP^c im Extrakt zu detektieren ist und von PrP^{Sc} nicht die komplette nicht-glykosylierte Form gespalten wurde, kann zwei Gründe haben. Entweder die proteolytische Aktivität ist nicht sehr stark, oder aber sie ist nur für kurze Zeit sehr stark aktiv und wird dann sehr schnell schwächer.

Diese Versuche zeigten, dass eine proteolytische Aktivität in N2a-Zelllysaten vorhanden ist. Da diese proteolytische Aktivität aber unabhängig von einer vorangegangenen Inkubation der Zellen mit STI571 ist und zudem auch PrP^c davon betroffen ist, hat sie allem Anschein nach nichts mit dem durch STI571 hervorgerufenen anti-Prion Effekt zu tun, sondern gibt einfach die physiologisch in den Zellen vorhandene Aktivität von Proteasen wieder. Die Beobachtung, dass eine vorausgegangene Behandlung der Zellen mit STI571 keinen Einfluss auf die proteolytische Aktivität des Lysats hatte, könnte darauf hinweisen, dass die Reduktion von PrP^{Sc} durch STI571 nicht in einer generellen Aktivierung der proteolytischen Aktivität der Zellen begründet ist.

Die Ergebnisse aller dieser Experimente demonstrieren, dass durch die Behandlung Prion-infizierter Zellen mit STI571 nicht die Neubildung von PrP^{Sc} inhibiert wird.

Stattdessen wird die lysosomale Degradierung von PrP^{Sc} in den Zellen aktiviert, so dass die Halbwertszeit von PrP^{Sc}, die in ScMHM2-Zellen länger als 24 Stunden ist, auf weniger als 9 Stunden reduziert wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Lysosomen auch beim physiologischen Abbau von PrP^{Sc} in der Zelle eine wichtige Rolle spielen. Der letzte Versuch könnte zudem ein Hinweis darauf sein, dass die Wirkungsweise von STI571 im anti-Prion Effekt seine Ursache nicht in einer generellen Aktivierung der proteolytischen Aktivität der behandelten Zellen hat. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um einen spezifischen Effekt von STI571 auf die Degradation von PrP^{Sc} handelt.

4.5. Das molekulare Target von STI571 im anti-Prion Effekt

STI571 ist ein sehr spezifischer Tyrosin-Kinasen Inhibitor. Die einzigen bisher bekannten Targets sind c-Abl, der PDGF-Rezeptor (Platelet Derived Growth Factor Rezeptor) und die c-Kit-Kinase (Buchdunger *et al.*, 1996; Heinrich *et al.*, 2000). Um den im anti-Prion Effekt durch STI571 beeinflussten Signaltransduktionsweg enger eingrenzen zu können, sollte herausgefunden werden, welche der drei Kinasen inhibiert werden muss, um eine Reduktion von PrP^{Sc} herbeizuführen.

4.5.1. PDGF-Rezeptor und c-Kit

Für den PDGF-Rezeptor und die c-Kit-Kinase existiert ein weiterer sehr spezifischer Inhibitor: CT52923. Trotz starker Inhibition dieser beiden Kinasen hat CT52923 keinen Effekt auf die Aktivität von c-Abl (Yu *et al.*, 2001). In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass mit 100 nM CT52923 die Autophosphorylierung des PDGF-Rezeptors und mit 200 nM die von c-Kit inhibiert wird (Yu *et al.*, 2001). Weitere Studien in Zellkultur, die die zellulären Antworten auf eine Aktivierung des PDGF-Rezeptors untersuchten, beschrieben eine IC₅₀ von CT52923 für die Zellproliferation von 280 nM und für die Zellwanderung von 64 nM (Yu *et al.*, 2001).

Mit diesem Inhibitor wurden ScMHM2-Zellen behandelt und mittels Proteinase K-Verdau in Western Blot Analysen auf ihren Gehalt an PrP^{Sc} hin untersucht. Als Positiv-Kontrolle dienten mit STI571 behandelte ScMHM2-Zellen.

Wie Abbildung 4.5.1.1. zu entnehmen ist, führte die dreitägige Behandlung von ScMHM2-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von CT52923 zu keiner Reduktion von PrP^{Sc} (Vergleiche Spur 6 mit Spur 2). Hierbei waren 30 μ M die Konzentration, die noch einsetzbar war. Alle Konzentrationen darüber erwiesen sich als toxisch. Im Gegensatz dazu war nach der dreitägigen Behandlung mit STI571 kein PrP^{Sc} mehr im Extrakt nachzuweisen (Spur 8). Auch eine sechstägige Behandlung mit 10 μ M CT52923, bei der alle zwei Tage Medium und Substanz erneuert wurden, zeigte im Gegensatz zu einer entsprechenden Behandlung mit STI571 keine Verringerung des PrP^{Sc}-Gehalts in ScMHM2-Zellen (nicht gezeigt).

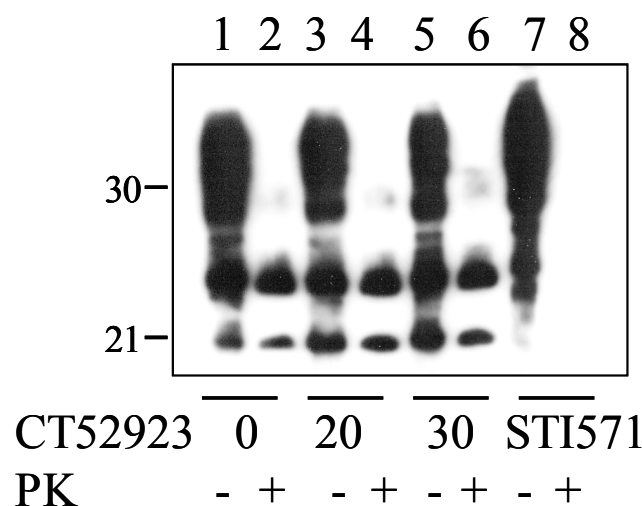


Abb. 4.5.1.1. Westernblot-Analyse des Effekts von CT52923 auf PrP^{Sc} in ScMHM2-Zellen. ScMHM2-Zellen wurden 3 Tage lang mock- (0), mit den angegebenen Konzentrationen an CT52923 (20 bzw. 30) bzw. mit 10 μ M STI571 (STI571) behandelt. Die postnukleären Extrakte wurden halbiert, die eine Hälfte mit Proteinase K verdaut (+PK) und die anderen Hälfte direkt gefällt (-PK). Die Proben wurden auf ein 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und im Western Blot mit 4H11 Antikörper analysiert.

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von c-Kit und dem PDGF-Rezeptor keine Auswirkung auf den PrP^{Sc}-Gehalt von Prion-infizierten Zellen hat und dass der durch die Behandlung mit STI571 hervorgerufene anti-Prion Effekt demnach die Inhibierung einer anderen Kinase zur Ursache haben muss.

4.5.2. c-Abl

Die dritte Kinase, von der bekannt ist, dass sie durch STI571 inhibiert wird, ist die Kinase c-Abl. Im Gegensatz zum PDGF-Rezeptor und zur c-Kit Kinase ist diese Kinase noch relativ unerforscht. Dementsprechend gibt es neben STI571 noch keinen weiteren Inhibitor, der spezifisch die Tyrosin-Kinase c-Abl inhibiert. Aus diesem Grund mussten andere Methoden zur Inhibition von c-Abl in den Zellen angewandt werden.

Inhibition der Aktivität von c-Abl über eine Transdominant-Negativ-Mutante

Zunächst wurde versucht, die Aktivität von c-Abl in Prion-infizierten Zellen durch die Überexpression einer Transdominant-Negativ-Mutante von c-Abl zu hemmen. Hierfür wurden ScMHM2-Zellen transient mit der cDNA für eine Mutante von c-Abl transfiziert, die, wenn sie überexprimiert wird, zur Hemmung der Aktivität der endogenen c-Abl Kinase führt. Bei der Mutante ist das Lysin an Stelle 271 zu einem Methionin-Rest mutiert worden. Diese Mutation liegt innerhalb der ATP-Bindungsstelle des Enzyms, so dass die Kinase zwar noch ATP binden, aber nicht mehr spalten kann. Dies führt nicht nur dazu, dass die Mutante nicht aktiv ist, sondern durch die Konkurrenz um ATP auch die Inaktivierung der endogenen Kinase zur Folge hat (Kharbanda *et al.*, 1995; Yuan *et al.*, 1996).

Für den Versuch wurden ScMHM2-Zellen vier Tage nach der Transfektion lysiert und postnukleäre Extrakte hergestellt. Diese wurden mittels Proteinase K-Verdau und Western Blot auf ihren Gehalt an PrP^{Sc} hin untersucht. Als Kontrollen dienten nicht- und mock-transfizierte Zellen und ScMHM2-Zellen, die für 3 Tage mit 10 µM STI571 behandelt worden waren. Hierbei wurde mit der STI571-Behandlung am ersten Tag nach der Transfektion begonnen.

Die in Abbildung 4.5.2.1.1 erkennbare Reduktion des PrP^{Sc}-Signals in den mit der Mutante transfizierten Zellen im Vergleich zu den mock-transfizierten Zellen (vergleiche Spur 6 mit Spur 4) deutet darauf hin dass die Hemmung der endogenen Kinase durch die Transdominant-Negativ-Mutante zu einem anti-Prion Effekt ähnlich dem durch STI571 verursachten Effekt führt. Der Grund dafür, dass im Gegensatz zu dem Extrakt der mit STI571-behandelten Zellen (Spur 8) noch immer ein PrP^{Sc}-Signal zu detektieren ist, liegt wohl darin, dass es sich um eine Transfektion handelt und dabei immer auch ein Teil der Zellen nicht erfolgreich transfiziert wird. Eine leichte

Reduktion von PrP^{Sc} ist auch in den mock-transfizierten Zellen zu detektieren (vergleiche Spur 2 mit Spur 4). Wie in Abschnitt 3.2.2.4. beschrieben erfolgte die Transfektion der ScMHM2-Zellen mittels Lipofektion. Der anti-Prion Effekt von Liposomen auf PrP^{Sc} in prion-infizierten Zellen wurde mehrfach beschrieben. Seine Ursache ist bislang noch nicht ganz klar. Dieser Effekt hat aber zur Folge, dass man bei der Auswahl des Transfektionsreagenzes für die Transfektion Prion-infizierter Zellen einen Kompromiss zwischen Transfektionseffizienz und vertretbarer Reduktion von PrP^{Sc} treffen muss. Der hier sichtbare Effekt ist vergleichbar minimal und demnach vernachlässigbar.

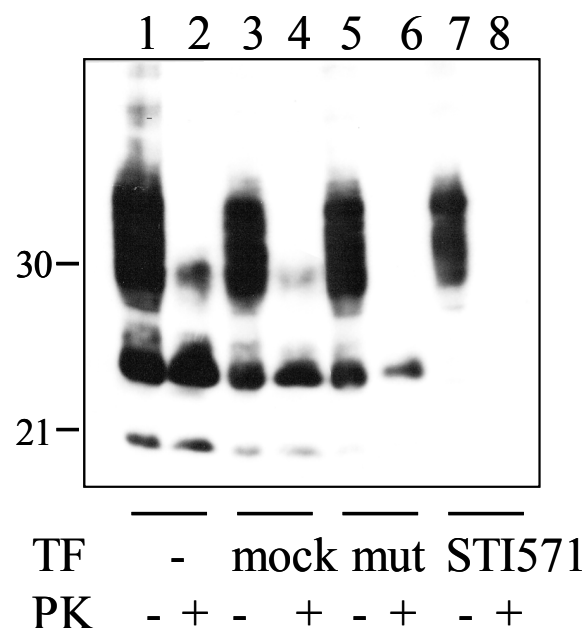


Abb. 4.5.2.1. Die Reduktion von PrP^{Sc} durch die Transfektion einer Transdominant-Negativ-Mutante von c-Abl. ScMHM2-Zellen wurden mit 2 µg pcDNA3.1. (mock) bzw. pcDNA3.1.VSVc-AblK271M (mut) transfiziert oder 3 Tage mock- (-) bzw. mit 10 µM STI571 (STI571) behandelt. 4 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die postnukleären Extrakte halbiert. Eine Hälfte wurde mit Proteinase K verdaut (+PK), die andere Hälfte direkt gefällt (-PK). Die Proben wurden auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot mit dem Antikörper 3F4 analysiert.

Als eine zusätzliche Kontrolle sollte auch der Effekt der Überexpression von Wildtyp-c-Abl untersucht werden. Jedoch führte diese Überexpression dazu, dass die Zellen zwei Tage nach erfolgter Transfektion das Wachstum stoppten und abstarben (nicht gezeigt). Diese Beobachtungen werden von Publikationen bestätigt, in denen von zytostatischen und zytotoxischen Effekten im Rahmen einer Überexpression von c-Abl berichtet wird (Goga *et al.*, 1995; Sawyers *et al.*, 1994; Wen, *et al.*, 1996).

Niederregulierung von c-Abl mittels RNAi

Eine weitere Methode, die Aktivität von c-Abl in Zellen zu hemmen, ist die Expression des Proteins selbst zu reduzieren. In den letzten Jahren hat sich eine neue Methode etabliert, die sich einen zellulären Prozess, der RNA Interferenz (RNAi) genannt wird, zunutze macht. Dieser Prozess führt zur Degradierung von mRNA, ausgelöst durch kurze, doppelsträngige und zu dieser mRNA komplementäre RNA-Moleküle (siRNA = small interfering RNA). Diese siRNA-Moleküle können entweder synthetisiert und direkt in die Zelle transfiziert werden oder man transfiziert die Zellen mit einem Plasmid für die Expression der siRNA in den Zellen. Letzterer Ansatz hat den Vorteil, dass man das Zielprotein über einen längeren Zeitraum herunter regulieren kann. In der vorliegenden Arbeit sollte durch die Reduktion der c-Abl-Expression ein möglicher Effekt auf PrP^{Sc} untersucht werden. Da ein Effekt wahrscheinlich frühestens 2 Tage nach einer Herunterregulierung von c-Abl sichtbar sein würde, wurden ScMHM2-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das für eine zur mRNA von c-Abl komplementäre siRNA kodierte. Nicht alle siRNA-Moleküle führen erfahrungsgemäß zu einer effizienten Niederregulierung des gewünschten Zielproteins. Deshalb wurden fünf Bereiche der mRNA von c-Abl für die Herstellung von verschiedenen siRNA-Molekülen ausgewählt (vergleiche hierzu Abschnitt 3.2.1.11). Drei Tage nach der Transfektion der ScMHM2-Zellen mit den Plasmiden wurden die Zellen unter Bedingungen lysiert, die sowohl einen Nachweis von c-Abl, als auch eine Untersuchung des PrP^{Sc}-Gehaltes über den Proteinase K-Verdau erlaubten (vergleiche hierzu Abschnitt 3.2.3.1.). Dazu wurden die Zellen lysiert und je eine Hälfte des Lysats mittels Western Blot auf die Effizienz der Niederrregulierung von c-Abl und die anderen Lysat-Hälfte durch Proteinase K-Verdau und Western Blot auf die Anwesenheit von PrP^{Sc} hin überprüft. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Plasmid transfiziert, das für eine Zufalls-siRNA kodierte, die keinen Effekt zeigen sollte. Abbildung 4.5.2.2. zeigt das Ergebnis des Versuchs. In Prion-infizierten Zellen, die mock- (K) bzw. mit dem Plasmid für die Zufalls-siRNA (#WZ) transfiziert wurden, war im Western Blot ein deutliches Signal für c-Abl zu detektieren (Abb. 4.5.2.2. oberer Blot, K und #WZ, durch einen Pfeil gekennzeichnet). Im Lysat dieser Zellen konnte auch ein deutliches Signal für PrP^{Sc} nachgewiesen werden (Abb. 4.5.2.2. unterer Blot, Spur 2 und Spur 4). Hierbei ließ sich weder für c-Abl noch für PrP^{Sc} ein Unterschied in der Signalstärke zwischen der Mock-Kontrolle und der Zufalls-siRNA-Kontrolle feststellen. Das bedeutet, dass die Zufalls-

siRNA wie erwartet keinen Einfluss auf c-Abl bzw. PrP^{Sc} hatte. Die Zellen, die mit den Plasmiden für die c-Abl-spezifischen siRNAs transfiziert worden waren, zeigten eine deutliche Niederregulation von c-Abl (oberer Blot, #2, #4a, #7a und #8), wobei die Effizienz der Herunterregulation zwischen den verschiedenen siRNAs unterschiedlich gut war. Wurden die Lysate auf den Gehalt an PrP^{Sc} hin untersucht, so konnte beobachtet werden, dass die Zellen mit weniger c-Abl auch ein schwächeres Signal für PrP^{Sc} aufwiesen. Auch hier wiesen die Effekte auf PrP^{Sc} Unterschiede zwischen den einzelnen siRNAs auf und reichten von einem sehr starkem Effekt (siRNA#2 und #8, unterer Blot, Spuren 6 und 12), über einen mäßigen Effekt (siRNA#4a, unterer Blot Spur 8) zu einem sehr geringen Effekt (siRNA#7a, unterer Blot, Spur 10). Diese Unterschiede können mehrere Ursachen haben, die ihren Ursprung in der generellen Problematik von Transfektionsexperimenten haben. So werden bei einer Lipofektion selten alle Zellen einer Zellkulturschale erfolgreich transfiziert und die Zellen, die transfiziert wurden, weisen Unterschiede in der Expressionsstärke auf. Betrachtet wird im Western Blot Experiment allerdings die gesamte Zellpopulation. Das Lysat einer Zellkulturschale (I), bei der sehr viele Zellen transfiziert wurden, diese Zellen aber nur eine mäßige Expression der siRNA zeigen, wird im Western Blot für c-Abl eine vergleichbare Herunterregulation zeigen, wie die Zellen einer Zellkulturschale (II), bei der zwar weniger Zellen transfiziert wurden, aber dafür die Expression höher ist. Da wir davon ausgehen, dass wir eine sehr starke Herunterregulation von c-Abl benötigen, um einen Effekt auf PrP^{Sc} beobachten zu können, wird bei der ersten Zellkulturschale (I) kein Effekt auf PrP^{Sc} nachzuweisen sein, während in der zweiten Zellkulturschale (II) das Signal für PrP^{Sc} im Vergleich zur Kontrolle abnehmen wird. Somit wäre das Ergebnis bei gleichem Gesamteffekt auf c-Abl (vergleiche zum Beispiel oberer Blot, #2 und #4a) ein unterschiedlicher Gesamt-Effekt auf PrP^{Sc} (unterer Blot, Spur 6 und Spur 8). Das erklärt auch die Tatsache, dass in den Wiederholungen des Versuchs die Ergebnisse für die c-Abl-spezifischen siRNAs variierten. Bei relativ gleich bleibender Effizienz in der Herunterregulation von c-Abl ließen sich zwischen den einzelnen Versuchen für jeweils eine siRNA Unterschiede im Effekt auf PrP^{Sc} beobachten. Im Falle der beiden Kontrollen dagegen, gab es keine Unterschiede in den Ergebnissen. Das bedeutet, dass in diesem Versuch die Ergebnisse für die einzelnen siRNAs nur mit den Kontrollen, nicht aber mit den Ergebnissen für die anderen siRNAs verglichen werden dürfen. Eine weitere mögliche Ursache für die Unterschiede besteht in der Tatsache, dass die höchste Expression der einzelnen siRNAs nicht für alle siRNAs zur

gleichen Zeit stattfindet. Da aber alle Zellen zur gleichen Zeit lysiert wurden, besteht die Möglichkeit, dass die Herunterregulation von c-Abl in der einen Zellpopulation bereits nach 48 Stunden sehr effizient geschieht, während für eine andere siRNA c-Abl erst 24 Stunden später maximal niederreguliert wird. Auch hier würde man zwar einen gleichen Effekt auf c-Abl beobachten können, hätte allerdings einen unterschiedlichen Effekt auf PrP^{Sc}. Um diese generellen Probleme bei transienten Transfektionen zu vermeiden, war versucht worden, mittels Selektion mit Hygromycin B die siRNA-exprimierenden Zellen anzureichern. Diese Selektion war bis zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit nicht erfolgreich.

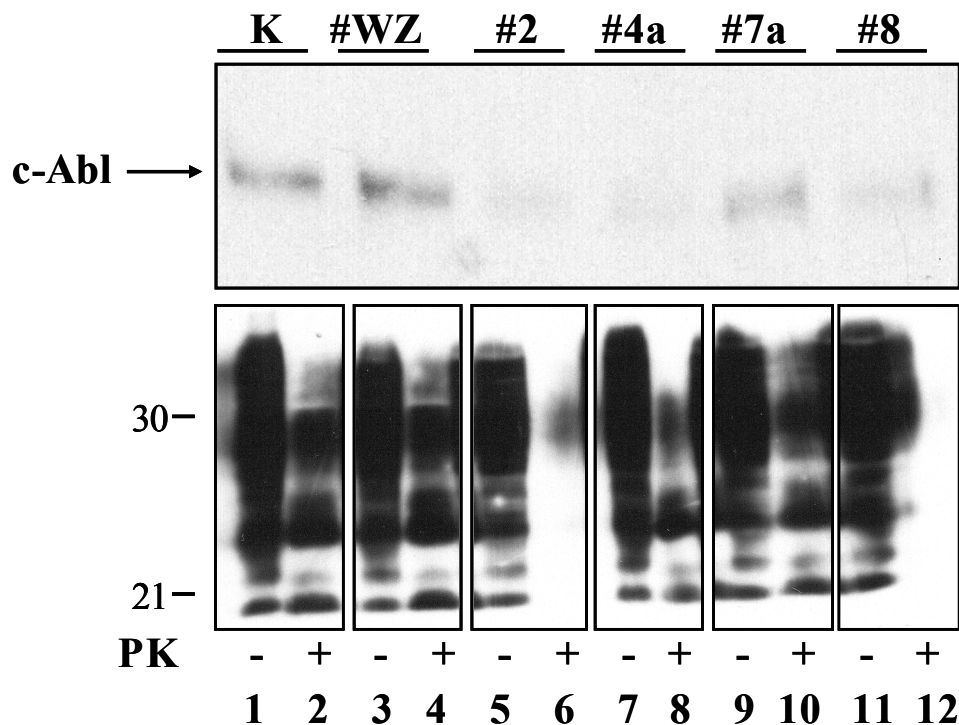


Abb. 4.5.2.2. Die Reduktion von PrP^{Sc} durch die Herunterregulierung von c-Abl mittels RNAi. ScMHM2-Zellen wurden mock- (K) bzw. mit verschiedenen Plasmiden für die Expression von einer Zufalls-siRNA (#WZ) bzw. c-Abl-spezifischen siRNAs (#2, #4a, #7a, #8) transfiziert. 3 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. Die eine Hälfte des Lysats wurde direkt auf einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot mit dem anti-c-Abl Antikörper 8E9 auf den Gehalt an c-Abl analysiert (oberer Blot). Die c-Abl spezifische Bande wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die andere Lysathälfte wurde halbiert und entweder direkt gefällt (-PK) oder mit Proteinase K verdaut (+PK). Die Analyse erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese auf einem 12,5 %igen Polyacrylamidgel und anschließendem Western Blot mit dem Antikörper 4H11 (unterer Blot).

Zusammengenommen bedeutet dies, dass die Herunterregulation von c-Abl mittels c-Abl-spezifischer siRNA, ebenfalls zu einer Reduktion von PrP^{Sc} in den Zellen führt.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass von den drei bekannten Kinasen, die von STI571 inhibiert werden, weder c-Kit noch der PDGF-Rezeptor verantwortlich für die beobachtete Reduktion von PrP^{Sc} in Prion-infizierten Zellen sind. Vielmehr führte sowohl die Inhibition der Aktivität von c-Abl mittels Transfektion einer Transdominant-Negativ-Mutante von c-Abl, als auch die Herunterregulation von c-Abl durch RNAi zu einer Abnahme von PrP^{Sc}. Das bedeutet, dass die Inhibition von c-Abl für den anti-Prion Effekt von STI571 verantwortlich ist.

4.6. Phosphorylierungs-Studien

4.6.1. *In vitro* Kinase-Assays

Im vorhergehenden Kapitel konnte gezeigt werden, dass von den drei Tyrosin-Kinasen, deren Aktivität von STI571 inhibiert wird, c-Abl am wahrscheinlichsten die Kinase ist, deren Inhibition für die Reduktion von PrP^{Sc} in Prion-infizierten Zellen verantwortlich ist. In *in vitro* Kinase-Assays sollte nun die Aktivität von c-Abl, das zuvor mittels Immunpräzipitation aus N2a- und ScMHM2-Zellen isoliert worden war, getestet werden (vergleiche hierzu Abschnitt 3.2.3.9.). Dazu wurde das an die Sepharose gebundene Enzym direkt in den Assay eingesetzt. Als Substrat wurde kommerziell erhältliches c-Abl-Substrat und als Phosphatgruppendonator (³²P)- γ -ATP verwendet. Dadurch wurde das Substrat bei erfolgter Phosphorylierung radioaktiv markiert und konnte somit am Liquid-Szintillationszähler gemessen werden. Hierbei war die Anzahl der gemessenen Zählereignisse („Counts“) pro Minute (cpm) ein Maß für die Aktivität der Kinase.

4.6.1.1. STI571 inhibiert c-Abl aus N2a- und ScMHM2-Zellen in vitro

Zunächst wurde untersucht, ob es Unterschiede in der Aktivität von c-Abl aus nicht-infizierten N2a- und Prion-infizierten ScMHM2-Zellen gibt. Zudem wurden verschiedene Konzentrationen von STI571 in den Kinase-Assays eingesetzt, um auch hier eventuelle Unterschiede in der Effizienz der Inhibition zu dokumentieren. Als Kontrollen diente eine Reaktion, bei der in der Immunpräzipitation durch Weglassen des Antikörpers keine Kinase immunpräzipitiert worden war (-AK) bzw. eine Reaktion, in der kein Substrat (- Substrat) eingesetzt wurde.

Abbildung 4.6.1.1.1. zeigt die graphische Darstellung der Auswertung. Wie daraus zu entnehmen ist, ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität von c-Abl zwischen nicht infizierten N2a- und Prion-infizierten ScMHM2-Zellen erkennen. Da gleiche Proteinmengen in der Immunpräzipitation eingesetzt worden waren, bedeutet das zudem nicht nur, dass kein Unterschied in der Aktivität besteht, sondern auch dass sich das Expressionslevel von c-Abl in nicht-infizierten N2a-Zellen nicht von dem in Prion-infizierten ScMHM2-Zellen unterscheidet. In beiden Negativ-Kontrollen konnte keine Kinase-Aktivität gemessen werden. Im Falle der Kontrolle, in der kein Substrat eingesetzt worden war (-Substrat), hätte eventuell eine Autophosphorylierung gemessen werden können. Wie viele Kinasen, hat auch c-Abl die Fähigkeit zur Autophosphorylierung (van Etten *et al.*, 1999). Da aber nur die Überstände der Reaktionen auf Filter getropft und gemessen worden waren, die Kinase aber an der Matrix gebunden blieb, hätte eine stattgefundene Autophosphorylierung in die Messung am Szintillationszähler nicht mit eingehen können. Des Weiteren konnte in der Dosistitration von STI571 gezeigt werden, dass mit steigender Konzentration an STI571 die Aktivität von c-Abl aus N2a- und c-Abl aus ScMHM2-Zellen in gleicher Weise inhibiert wird. Die IC_{50} lag in diesem Versuch bei etwa $0,1 \mu\text{M}$, was für einen spezifischen Inhibitor im Rahmen einer guten, im Kinase-Assay bestimmten, IC_{50} liegt.

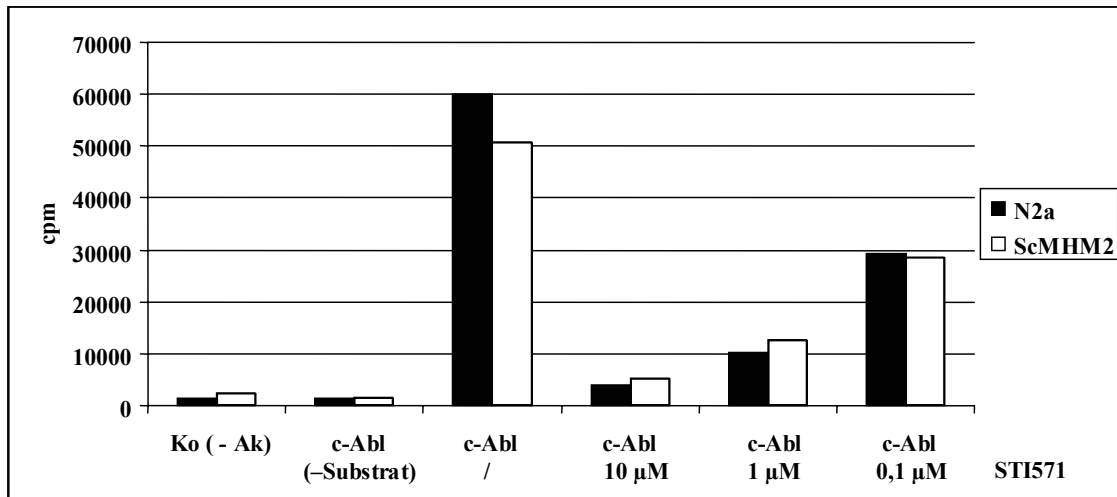


Abb. 4.6.1.1.1. Kinase-Assay mit c-Abl aus N2a- und ScMHH2-Zellen. Die Kinase c-Abl wurde mittels Immunpräzipitation aus Lysaten von N2a- und ScMHH2-Zellen isoliert und wurde in *in vitro* Kinase-Assays eingesetzt. Zur Dokumentation des Effekts von STI571 auf die Aktivität von c-Abl wurden verschiedene Konzentrationen an STI571 zur Kinase-Reaktion gegeben (10 µM, 1 µM bzw. 0,1 µM). Als Kontrollen dienten ein Ansatz, bei dem in der Immunpräzipitation der Antikörper weggelassen worden war (-Ak) und ein Ansatz ohne Substrat (-Substrat). Die Auswertung erfolgte am Liquid-Szintillationszähler. Die angegebenen cpm (Counts pro Minute) spiegeln die Aktivität der Kinase wieder.

4.6.1.2. Rekombinantes PrP wird *in vitro* nicht von c-Abl phosphoryliert

Da PrP mit großer Wahrscheinlichkeit in irgendeiner Weise an der Signaltransduktion der Zelle beteiligt ist, lag die Vermutung nahe, dass es phosphoryliert sein könnte. Es war auch bereits von einer *in vitro* Phosphorylierung von PrP durch die Kinasen Casein Kinase 2, Protein Kinase C und die beiden Src Tyrosin Kinasen Lyn und c-Fgr berichtet worden (Negro *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wurde im Folgenden untersucht, ob PrP *in vitro* von c-Abl phosphoryliert werden würde. Dafür wurde rekombinantes, in *E. coli* exprimiertes murines PrP als Substrat in die Reaktion eingesetzt. Hierbei wurde zum einen analog zu Negro *et al.*, 2000 eine Konzentration von 1,6 µM und zum anderen die wesentlich höhere Konzentration von 10 µM eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle diente wieder eine Reaktion ohne Kinase (- AK).

Die graphische Darstellung der Auswertung am Liquid-Szintillationszähler ist in Abbildung 4.6.1.2.1. zu sehen. Aus ihr wird ersichtlich, dass im Gegensatz zum c-Abl-Substrat, das hier als Positiv-Kontrolle eingesetzt worden war (+Substrat.), keine Phosphorylierung von PrP gemessen werden konnte (+ PrP). Das bedeutet, dass PrP im *in vitro* Assay kein Substrat von c-Abl darstellt.

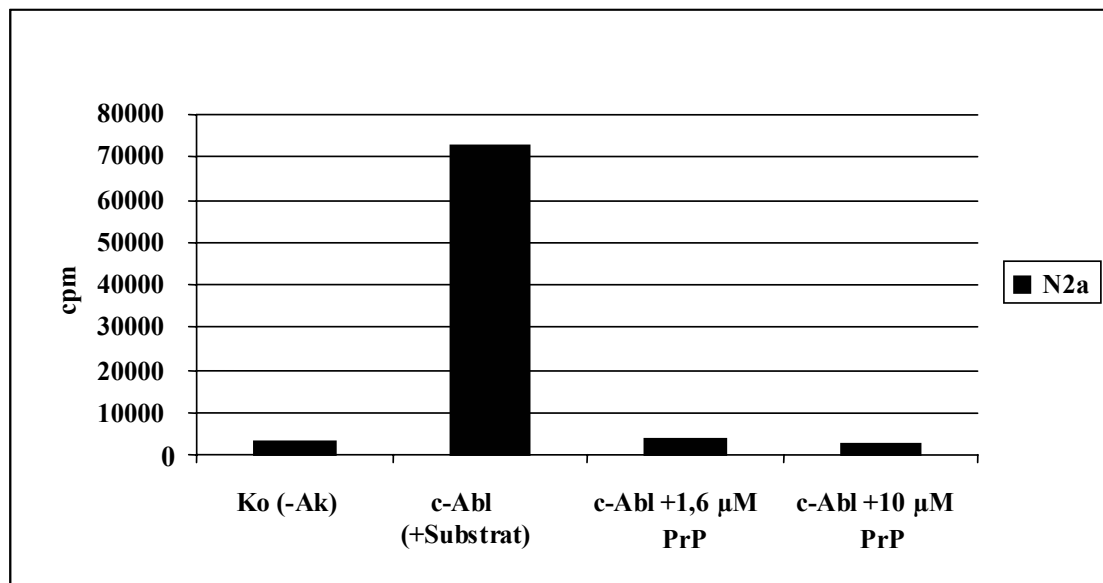


Abb. 4.6.1.2.1. *In vitro* Kinase Assay mit c-Abl aus N2a-Zellen und rekombinatem PrP als Substrat. Die Kinase c-Abl wurde mittels Immunpräzipitation aus Lysat von N2a-Zellen isoliert und im *in vitro* Kinase-Assay eingesetzt. Als Substrat wurde einmal 1 µM und einmal 10 µM rekombinantes murines PrP verwendet. Als Kontrolle diente eine Reaktion, bei der in der Immunpräzipitation der Antikörper weggelassen worden war. Die Auswertung erfolgte am Liquid-Szintillationszähler. Die gemessenen cpm geben die Aktivität der Kinase wieder.

4.6.2. Wird PrP *in vivo* an Tyrosinresten phosphoryliert?

Nachdem im *in vitro* Kinase-Assay mit c-Abl keine Phosphorylierung von rekombinatem PrP nachgewiesen werden konnte, sollte untersucht werden, ob PrP *in vivo* an Tyrosinresten phosphoryliert wird. Hierfür wurden PrP^c und PrP^{Sc} aus dem Lysat von N2a- und ScMHM2-Zellen, die zuvor zur Inhibition von Tyrosinphosphatasen für zwei Stunden mit Natriumorthovanadat (Na₃VO₄) behandelt worden waren, mittels Löslichkeits-Assay voneinander separiert, immunpräzipitiert und im Western Blot auf Tyrosin-Phosphorylierungen hin analysiert (vergleiche hierzu Abschnitt 3.2.2.9.).

Abbildung 4.6.2.1. zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. Im oberen Western Blot für PrP sind deutliche Signale für PrP^c (Spuren 1 und 2 bzw. 5 und 6) und PrP^{Sc} (Spuren 3 und 4) zu sehen. Dies bedeutet, dass die Separation von PrP^c von PrP^{Sc} und die Immunpräzipitation beider Isoformen erfolgreich gewesen waren. Dagegen lassen sich im Western Blot gegen Phospho-Tyrosinreste (unterer Blot) keine spezifischen Signale,

weder für phosphoryliertes PrP^c noch für phosphoryliertes PrP^{Sc}, nachweisen (Spuren 1 – 8). Als Positiv-Kontrolle für den Antikörper gegen Phospho-Tyrosinreste wurde Lysat aus stimulierten A431-Zellen (20 µg) verwendet.

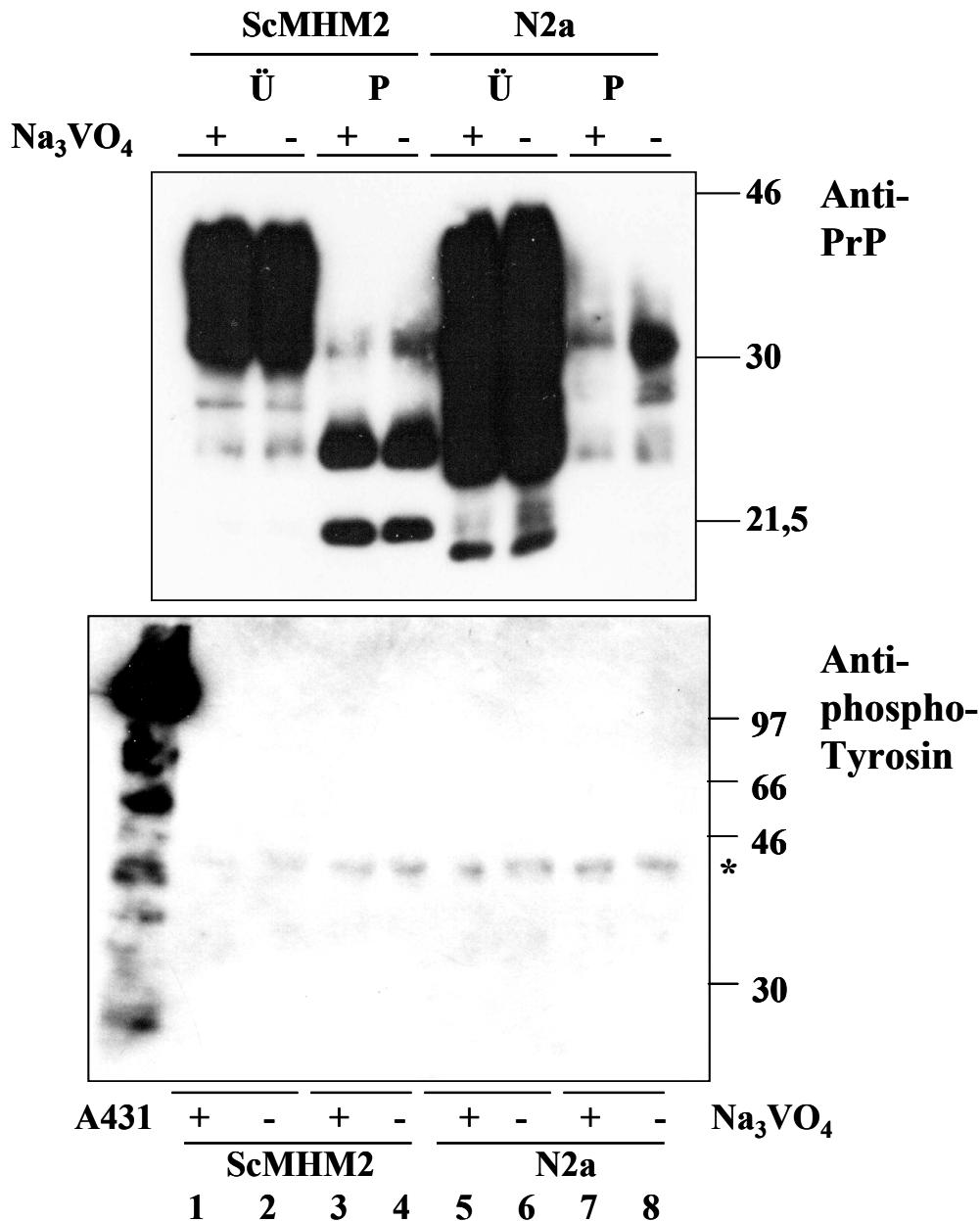


Abb. 4.6.2.1. Untersuchung von *in vivo* Tyrosin-Phosphorylierung von PrP^c und PrP^{Sc} in N2a- und ScMHM2-Zellen. N2a- und ScMHM2-Zellen wurden zur Inhibition von Tyrosinphosphatasen für 2 Stunden mock- (-Na₃VO₄) bzw. mit 1 mM Na₃VO₄ (+Na₃VO₄) behandelt. Die postnukleären Extrakte wurden zur Trennung von PrP^c von PrP^{Sc} einem Löslichkeits-Assay unterworfen. Überstand (Ü) und Präzipitat (P) wurden in einer Immunpräzipitation mit A7 Antikörper eingesetzt und vergleichbare Proteinmengen auf zwei 12,5 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Analyse erfolgte in Western Blots einmal mit 4H11 Antikörper, einmal mit 4G10 Antikörper (Anti-Phospho-Tyrosin). Als Kontrolle für den Antikörper 4G10 wurden 20 µg eines Lysats von stimulierten A431-Zellen aufgetragen. Eine unspezifische Bande ist durch * gekennzeichnet.

Demnach wird weder PrP^c noch PrP^{Sc} *in vivo* an Tyrosinresten phosphoryliert. Dies deckt sich auch mit der Beobachtung anderer Arbeitsgruppen, die im Rahmen der vom bayrischen Forschungsverband geförderten Projekte die Phosphorylierung von PrP^c untersucht haben (C. Haas, A. Uehlhoff, LMU München, persönliche Mitteilung).

All diesen Ergebnissen zufolge ist die Inhibition von c-Abl die Ursache für die nach der Behandlung mit STI571 beobachtete Reduktion von PrP^{Sc}. Die Tatsache, dass PrP *in vitro* nicht von c-Abl als Substrat erkannt wird und weder PrP^c noch PrP^{Sc} *in vivo* an Tyrosinresten phosphoryliert werden, deutet darauf hin, dass der anti-Prion Effekt durch STI571 indirekt ist. Es ist daher anzunehmen, dass die Inhibition von c-Abl bestimmte Signaltransduktionswege in der Zelle in Gang setzt, an deren Ende die lysosomale Degradierung von PrP^{Sc} steht.

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob durch Eingriffe in die zelluläre Signaltransduktion der Konversionsprozess von PrP^c zu seiner pathogenen Isoform PrP^{Sc} beeinflusst werden kann. Zu diesem Zweck wurden 50 verschiedene Substanzen mit gut charakterisierten Wirkungen auf spezifische Signaltransduktionskaskaden in Prion-infizierten Zellen getestet. Ziel des Screenings war es Substanzen zu isolieren, unter deren Behandlung ein hemmender Effekt auf die Konversion von PrP^c zu PrP^{Sc} zu beobachten war. Der Tyrosin-Kinasen Inhibitor STI571 war die einzige Substanz, die, ohne die zelluläre Isoform PrP^c zu beeinflussen und ohne zytotoxische Nebenwirkungen, den Gehalt an PrP^{Sc} in den Zellen drastisch reduzierte. Um den molekularen Wirkungsmechanismus des anti-Prion Effekts von dieser Substanz näher zu untersuchen, wurden die weiteren Experimente durchgeführt.

5.1. Der Tyrosin-Kinasen Inhibitor STI571

STI571 (Signaltransduktions-Inhibitor 571), auch bekannt unter dem Namen Glivec oder Imatinib Mesylat, ist ein Derivat von 2-Phenylaminopyrimidin und agiert als kompetitiver Inhibitor der ATP-Bindungsstelle an der katalytischen Domäne der Abl-Kinase (Buchdunger *et al.*, 1996). Ist ATP verdrängt, wird die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen, die in der Signalkaskade unterhalb von c-Abl liegen, unterbunden und damit die Signaltransduktion unterbrochen. Röntgenstrukturanalysen zeigten jedoch, dass der herausragende inhibitorische Effekt von STI571 vielmehr durch die Stabilisierung der (physiologisch) inaktiven Form der Kinase-Domäne nach erfolgter Bindung daran hervorgerufen wird. Zudem passt STI571 genau in die „ATP-binding pocket“ der Kinase.

Abbildung 5.1.1. zeigt die chemische Strukturformel von STI571 und eine schematische Darstellung der Bindung von STI571 an Bcr-Abl.

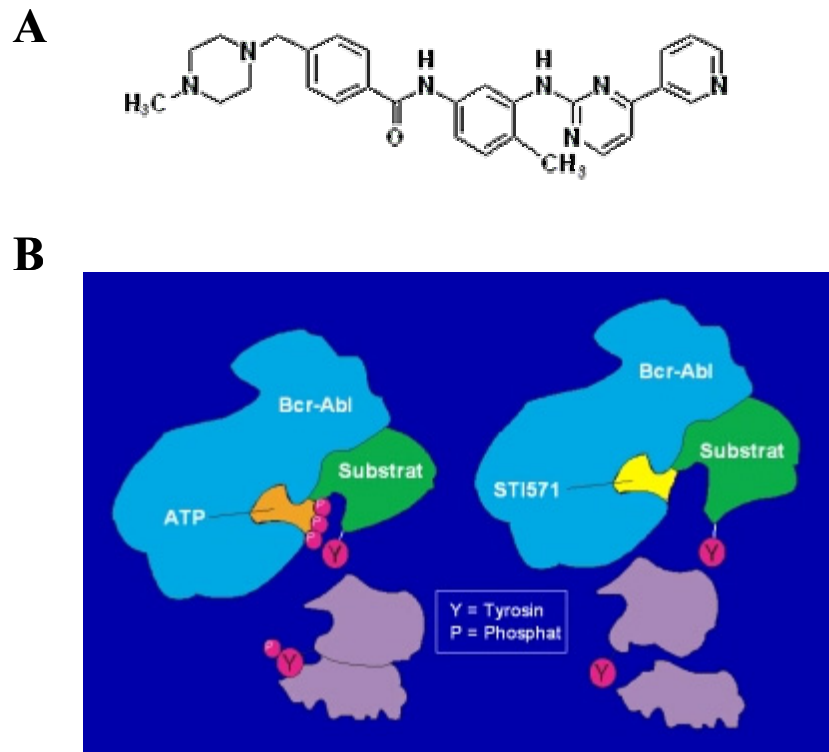


Abb. 5.1.1. (A): Strukturformel von STI571 (B): STI571 verdrängt ATP von der spezifischen Bindungsstelle an der Tyrosin-Kinase-Domäne von Abl und verhindert somit die Phosphorylierung von Substraten (nach Deininger *et al.* 2000).

Ursprünglich wurde STI571 in Studien gegen chronisch myeloische Leukämie (CML) getestet. CML wird durch das Fusions-Protein Bcr-Abl verursacht. Bcr-Abl ist das Produkt der reziproken Translokation (Rowley, 1973), bei der das *c-abl* Gen von Chromosom 9 mit der „Breakpoint-Cluster-Region“ (BCR) von Chromosom 22 fusioniert wird (de Klein *et al.*, 1982). Nach ihrem Entdeckungsort wurde diese Translokation t(9;22) Philadelphia Chromosom Translokation genannt. Sie führt zu einer konstitutiven Aktivierung der sonst meist inaktiven und physiologischen Regulationen unterworfenen c-Abl Kinase, was die letztendlich transformierende und leukämogene Potenz von Bcr-Abl verursacht.

STI571 inhibiert aber nicht nur die Aktivität von c-Abl, sondern kann auch die Aktivität von zwei weiteren Tyrosin-Kinasen inhibieren: dem PDGF-Rezeptor und der c-Kit Kinase (Buchdunger *et al.*, 1996; Heinrich *et al.*, 2000). Die Deregulation von c-Kit in gastrointestinalen Stroma-Tumoren (GIST), beispielsweise, kann durch STI571 sehr effizient inhibiert werden (Tuveson *et al.*, 2001). Obwohl STI571 auch die Aktivität der endogenen Wildtyp-Kinasen in gesunden Zellen inhibiert, konnten bisher nur in einigen

wenigen Fällen Nebeneffekte beobachtet werden. Dies ist wahrscheinlich über die Redundanz von zellulären Signaltransduktionswegen zu erklären. Seit Mai 2001 wird STI571 als oral verabreichtes Medikament gegen chronisch myeloische Leukämie eingesetzt und seit Februar 2002 auch gegen gastrointestinale Stroma-Tumore.

Eine interessante Entdeckung war, dass STI571 möglicherweise auch in der Therapie der neurodegenerativen Alzheimer-Erkrankung von Nutzen sein könnte. Bei Alzheimer Patienten kommt es zur Bildung von Amyloidplaques im Gehirn, die hauptsächlich aus 40 und 42 Aminosäuren langen β -Amyloidpeptiden bestehen. Die β -Amyloidpeptide entstehen durch proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins β APP (β amyloid precursor protein) durch den γ -Sekretase-Komplex. Die Inhibition der proteolytischen Aktivität dieses Komplexes und damit die Unterbindung der Produktion der β -Amyloidpeptide stellen einen wirkungsvollen Ansatz für mögliche Therapien gegen Alzheimer dar. Untersuchungen in Zellkultur zeigten, dass STI571 *in vitro* die β -Amyloid-Produktion inhibieren kann, ohne jedoch die Spaltung von Notch-1 durch den γ -Sekretase-Komplex zu beeinflussen (Netzer *et al.*, 2003). Notch-1, ebenfalls ein Substrat des γ -Sekretase-Komplex, ist ein Transkriptionsfaktor mit wichtigen Funktionen in der Neuronal-Entwicklung und im Immunsystem beim Erwachsenen. Im Gegensatz zu STI571 wird durch die bisher bekannten Inhibitoren des γ -Sekretase-Komplex ebenfalls die Spaltung von Notch-1 inhibiert, was erhebliche Nebenwirkungen zur Folge hat. Als Ursache hierfür wird die Tatsache postuliert, dass die Spaltung von β APP durch die γ -Sekretase in sekretorischen Kompartimenten, die Notch-1 Spaltung jedoch an oder in der Nähe der Plasmamembran stattfindet. Damit besteht die Möglichkeit, dass STI571 auf ein Protein wirkt, das vor allem die γ -Sekretase Aktivität in der β -Amyloid Produktion reguliert. Aus diesem Grund sehen die Autoren in STI571 ein viel versprechendes Medikament für die Behandlung von Alzheimer.

Obwohl bislang nur die drei Tyrosin-Kinasen c-Abl, PDGF-Rezeptor und c-Kit als Targets von STI571 bekannt sind, besteht durchaus die Möglichkeit, dass noch weitere Kinasen existieren, die durch STI571 inhibiert werden.

5.2. Der anti-Prion Effekt von STI571

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Behandlung von Prion-infizierten Zellen mit STI571 zu einer zeit- und dosisabhängigen Abnahme von PrP^{Sc} führt. Die Zeitabhängigkeit des Effektes war in zwei verschiedenen Ansätzen untersucht worden. Im ersten Ansatz waren die Zellen an drei aufeinander folgenden Tagen behandelt und zusammen am vierten Tag lysiert worden. Im zweiten Ansatz erfolgte die Behandlung am selben Tag, die Zellernte an drei aufeinander folgenden Tagen. In beiden Ansätzen zeigte sich eine Zeitabhängigkeit des Effektes. Im zweiten Ansatz jedoch wurde bereits deutlich, was in späteren Versuchen näher untersucht wurde: der anti-Prion Effekt von STI571 beruht hauptsächlich auf der Aktivierung des Abbaus von bereits bestehenden PrP^{Sc}-Aggregaten in der Zelle und weniger auf einer Interferenz mit der Neubildung der pathogenen Isoform. Wäre alleine die Neubildung von PrP^{Sc} betroffen, so müsste nach nur 24 Stunden in den Zellen noch PrP^{Sc} nachweisbar sein, da die Halbwertszeit von PrP^{Sc} in den Zellen mehr als 24 Stunden beträgt (Borchelt *et al.* 1992). Die Tatsache jedoch, dass bereits nach 24-stündiger Behandlung mit STI571 kein PrP^{Sc} mehr im Western Blot zu detektieren war, deutet auf eine verstärkte Degradierung von bereits existierendem PrP^{Sc} hin. Ebenso wurde mit dem Versuchsaufbau nach dem zweiten Ansatz die bereits früher im Labor gemachte Beobachtung, dass mit zunehmender Konfluenz der Zellen die Expression von PrP^c hochreguliert wird, bestätigt (Spielhauer & Schätzl, 2001). Da von Oberflächenrezeptoren der Zelle häufig eine von der Zelldichte abhängige Expression beobachtet wird, könnte diese Tatsache als ein erneuter Hinweis auf eine Rolle von PrP^c in der zellulären Signaltransduktion gedeutet werden.

Die zehntägige Behandlung Prion-infizierter Neuroblastomzellen mit STI571 zeigte, dass die durch STI571 herbeigeführte Clearance der Zellen von PrP^{Sc} irreversibel ist. Selbst nach 30 Tagen ohne STI571 ließ sich kein PrP^{Sc} mehr in den zuvor behandelten Zellen nachweisen, was auf ein endgültiges Erliegen der Konversion hindeutet. Die Tatsache, dass nach einer Behandlung Prion-infizierter Zellen mit STI571 keine Konversion von PrP^c zu PrP^{Sc} mehr stattfindet, berechtigt vorläufig zu der Aussage, dass die Zellen „geheilt“ wurden. Ein sicherer Nachweis dafür, dass die Zellen auch ihre Infektiosität verloren haben, wären jedoch Indikator-Tierversuche in Mäusen. In diesen Experimenten werden Mäuse intracerebral mit Zellhomogenat inokuliert. Handelt es sich dabei um infizierte Zellen, so werden die Tiere nach einer vom verwendeten Maus-

Stamm und von der Infektiosität der Zellen bzw. der Inokulations-Dosis abhängigen Inkubationszeit krank. Im Falle der durch STI571-Behandlung „geheilten“ Zellen sollten die Mäuse, die mit Homogenat von diesen Zellen inokuliert wurden im Gegensatz zu den mit dem Kontroll-Homogenat inokulierten Tieren keine Krankheits-Symptome zeigen. Dieser Nachweis steht allerdings noch aus.

Wie in den Ergebnissen gezeigt werden konnte, ist der Effekt von STI571 auf Prion-infizierte Zellen nicht nur auf eine Zelllinie beschränkt. Vielmehr ist es in der Lage, den PrP^{Sc}-Gehalt in mehreren Zelllinien zu reduzieren. Jedoch konnten bei der Behandlung unterschiedlicher Prion-infizierter Zelllinien zelltypspezifische Unterschiede beobachtet werden. ScGT1- und ScMHM2-Zellen waren etwa gleich sensitiv gegenüber der Behandlung mit STI571. Nach einer dreitägigen Behandlung konnte in beiden Zelllinien kein Signal für PrP^{Sc} mehr im Western Blot detektiert werden. In den nicht-neuronalen SMBs.15-Zellen ergab sich der anti-Prion Effekt jedoch erst nach einem Behandlungszeitraum von 10 Tagen. Diese zelltypspezifischen Unterschiede könnten ihre Ursache in unterschiedlichen Signalkaskaden verschiedener Zelllinien haben. Denkbar ist auch die unterschiedliche Ausstattung unterschiedlicher Zelllinien an bestimmten Proteinen. Hierbei sollte nicht außer acht gelassen werden, dass die beiden neuronalen Zelllinien ScMHM2 und ScGT1 beide sensitiv auf die Behandlung mit STI571 reagierten, während die eher resistenten SMBs.15-Zellen nicht-neuronalen Ursprungs sind (Birkett *et al.*, 2001).

5.2. Kein Einfluss von STI571 auf PrP^c

Eine Substanz kann über eine Reihe von Mechanismen in Prion-infizierten Zellen die Konversion von PrP^c zu PrP^{Sc} inhibieren. Abbildung 5.2.1. zeigt das derzeit am meisten vertretene Heterodimer-Modell der Prion-Konversion (vergleiche auch Abschnitt 2.5 Konversionsmodelle). Darin sind mögliche Angriffspunkte für anti-Prion Ansätze durch Buchstaben gekennzeichnet. (Vergleiche hierzu auch Abschnitt 2.6 Ansätze zu Therapie und Prophylaxe).

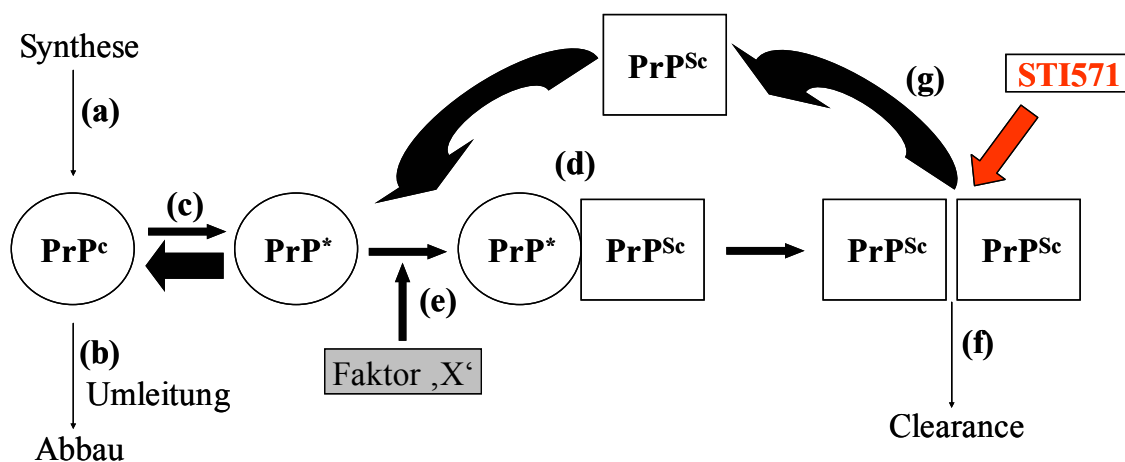


Abb. 5.2.1. Heterodimer-Modell für die Konversion von PrP^c zu PrP^{Sc} (nach Gilch & Schätzl. 2003). Die Buchstaben stellen Angriffspunkte für experimentelle anti-Prion Ansätze dar (vergleiche hierzu auch Abschnitt 2.6). Der gedachte Angriffspunkt für STI571 ist ebenfalls angegeben.

Ein möglicher Mechanismus ist zum Beispiel die Überstabilisierung der Konformation von PrP^c-Molekülen in ihrem Gleichgewicht mit dem postulierten Konversions-Intermediat PrP^{*}, so dass eine Konformationsänderung verhindert wird. Ein derartiger Mechanismus konnte für Dimethylsulfoxid (DMSO) und Kongo Rot gezeigt werden (Tatzelt *et al.*, 1996; Caspi *et al.*, 1998). Ein weiteres Beispiel ist die Herunterregulierung der zellulären Expression von PrP^c (Prusiner, 1998; Weissmann *et al.*, 2001). Durch die Behandlung Prion-infizierter Zellen mit der Substanz Suramin kommt es zur Bildung von unlöslichen PrP^c-Aggregaten im Trans-Golgi-Netzwerk. Diese PrP-Aggregate werden direkt in Lysosomen transportiert und dort degradiert (Gilch *et al.*, 2001). Durch dieses intrazelluläre „Umleiten“ wird der Transport von PrP^c an die Zelloberfläche verhindert, so dass kein Substrat mehr für die Konversion zu PrP^{Sc} zur Verfügung steht.

Die beiden genannten Wirkungsmechanismen greifen die zelluläre Isoform PrP^c, das eigentliche Konversions-Substrat, an und führen so zu einer Reduktion von PrP^{Sc}. Aus diesem Grund stellte sich auch im Falle des anti-Prion Effekts von STI571 die Frage nach möglichen Auswirkungen auf PrP^c.

Weder in den Untersuchungen mittels konfokaler Mikroskopie noch in den am Durchflusszytometer durchgeführten Experimenten konnten Auswirkungen auf die Lokalisierung von PrP^c durch die Behandlung mit STI571 beobachtet werden. Sowohl die Menge als auch die Lokalisierung von PrP^c bleiben unter einer Behandlung mit STI571 im Vergleich zu mock-behandelten Zellen unverändert. Diese Ergebnisse konnten mittels eines Verdauens mit Phosphatidylinositol spezifischer Phospholipase C auch biochemisch bestätigt werden. Die durch das Enzym von der Zelloberfläche abgespaltene Menge an PrP^c war in mock- und STI571-behandelten Zellen gleich. Ebenso wenig konnten Veränderungen in den untersuchten biochemischen Eigenschaften durch eine STI571-Behandlung beobachtet werden. Löslichkeits-Assays zeigten, dass PrP^c in Zellen, die mit STI571 behandelt wurden, weiterhin in nicht-ionischen Detergenzien löslich war und demnach keine unlöslichen Aggregate bildete, was auch als Hinweis darauf gesehen werden kann, dass STI571 nicht an PrP^c bindet.

Somit konnte gezeigt werden, dass der anti-Prion Effekt durch STI571 nicht durch eine Veränderung in der Lokalisierung oder des biochemischen Verhaltens von PrP^c verursacht wird, wie es für andere anti-Prion Substanzen der Fall ist, Dies lässt den Schluss zu, dass STI571 keinen Effekt auf die zelluläre Isoform PrP^c hat.

5.3. Der anti-Prion Effekt von STI571 beruht auf zellulären Vorgängen

Durch die Behandlung Prion-infizierter Zellen mit STI571 konnte eine starke Abnahme von PrP^{Sc} beobachtet werden. Der Nachweis von PrP^{Sc} erfolgte zumeist über einen Proteinase K-Verdau der postnukleären Extrakte mit nachfolgendem Western Blot. Deshalb bestand die Möglichkeit, dass durch STI571 die Sensitivität von PrP^{Sc} gegenüber Proteinase K erhöht werden könnte. Dies könnte beispielsweise durch Bindung von STI571 an PrP^{Sc} verursacht werden. Wenn das der Fall wäre, dann dürfte es keinen Unterschied machen, ob lebende Zellen in Kultur oder tote Zellen im Reaktionsgefäß mit STI571 behandelt werden würden. Somit müsste die Inkubation

postnukleärer Extrakte Prion-infizierter Zellen mit STI571 ausreichen, um im folgenden Proteinase K-Verdau eine Reduktion von PrP^{Sc} zu erhalten. Jedoch konnte gezeigt werden, dass diese Inkubation nicht zu einer Abnahme von PrP^{Sc} im postnukleären Extrakt Prion-infizierter Zellen führte. Dies bedeutet, dass für einen anti-Prion Effekt von STI571 molekulare Vorgänge in lebenden Zellen notwendig sind.

5.4. STI571 induziert die lysosomale Degradation von bereits existierendem PrP^{Sc}

Wie bereits erwähnt wurden schon viele Substanzen beschrieben, die in Experimenten mit Prion-infizierten Zellen einen anti-Prion Effekt aufweisen. Interessanterweise greifen die meisten dieser Substanzen in die Neubildung von PrP^{Sc} ein. Für die verzweigten Polyamine jedoch konnte gezeigt werden, dass sie einen Effekt auf bereits in der Zelle bestehendes PrP^{Sc} haben und ihre Wirkung über die lysosomale Aktivität in den Zellen ausgeübt wird (Supattapone *et al.*, 1999; Supattapone *et al.*, 2001). Diese Untersuchungen bestätigten ebenfalls die Vermutungen, dass lysosomale Proteasen auch an der generellen Degradation von PrP^{Sc} in Zellkultursystemen beteiligt sein könnten. Für die verzweigten Polyamine wird, analog zu den RNA-Aptameren, als Wirkungsmechanismus vorgeschlagen, dass sie zur Dissoziation größerer PrP^{Sc}-Aggregate führen und damit PrP^{Sc}-Moleküle sensitiver für den Abbau durch Proteasen machen könnten, oder dass sie den Transport von PrP^{Sc} vom Konversionsort in sekundäre Lysosomen erleichtern könnten (Supattapone *et al.*, 1999; Supattapone *et al.*, 2001, Proske *et al.*, 2002). Zwei weitere anti-Prion Substanzen, für die eine Wirkung über Lysosomen vermutet wurde, sind Quinacrin und Chloroquine. Ein genauer Mechanismus konnte jedoch noch nicht genau beschrieben werden. Man glaubt allerdings, dass die Eigenschaft der beiden Substanzen, den lysosomalen pH-Wert zu verändern, für den beobachteten anti-Prion Effekt verantwortlich ist (Doh-Ura *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte auch für den Effekt von STI571 auf PrP^{Sc} gezeigt werden, dass er über Lysosomen ausgeführt wird. Untersuchungen der Morphologie der Lysosomen STI571-behandelter Zellen mittels konfokaler Mikroskopie ergaben deutliche Unterschiede zu mock-behandelten Zellen. Diese Unterschiede schienen sowohl die Anzahl als auch die Größe der Lysosomen zu betreffen.

Insgesamt konnte für STI571 kein bedeutender Effekt auf die Neubildung von PrP^{Sc} beobachtet werden. Stattdessen ergaben die Untersuchungen eine Wirkung auf bereits bestehendes PrP^{Sc}. Durch die Behandlung mit STI571 wurde die Degradierung von PrP^{Sc} aktiviert und dessen Halbwertszeit von mehr als 24 Stunden in den mock-behandelten Zellen auf unter 9 Stunden reduziert. Diese durch STI571 aktivierte Degradation von PrP^{Sc} konnte durch eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Ammoniumchlorid (NH₄Cl) inhibiert werden. NH₄Cl inhibiert die lysosomale Degradation durch eine Anhebung des lysosomalen pH-Wertes. Untersuchungen mit Pepstatin A, einem für Aspartat-Proteasen spezifischen Inhibitor, ergaben ebenfalls eine leichte Aufhebung des anti-Prion Effekts durch STI571. Zusätzlich konnte in den nicht mit STI571-behandelten Zellen sowohl durch die unspezifische Inhibition der lysosomalen Degradation mit NH₄Cl, als auch durch die spezifische Inhibierung mit Pepstatin A eine leichte Zunahme des PrP^{Sc}-Signals beobachtet werden.

Mit diesen Ergebnissen konnte somit die Beobachtung, dass lysosomale Proteasen an der normalen Degradierung von PrP^{Sc} in den Zellen beteiligt sind und dass STI571 in der Lage ist diesen Prozess zu aktivieren, bestätigt werden. Interessanterweise konnte die durch die verzweigten Polyamine hervorgerufene Degradierung von PrP^{Sc} nicht durch eine gleichzeitige Behandlung mit NH₄Cl inhibiert werden (Supattapone *et al.*, 1999; Supattapone *et al.*, 2001), was darauf schließen lässt dass STI571 und diese Substanzen ihre Wirkung auf unterschiedlichem Weg ausüben.

Es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass durch die Behandlung mit STI571 die Menge an PrP^c nicht beeinflusst wird. Dies bedeutet, dass PrP^c und PrP^{Sc} von unterschiedlichen proteolytischen Aktivitäten in der Zelle degradiert werden. Diese Beobachtung steht nicht im Widerspruch zu Studien, in denen gezeigt wurde, dass durch die Inhibition des proteasomalen Abbauwegs der Zelle der Abbau von PrP^c-Molekülen gehemmt und die Anhäufung von „PrP^{Sc}-ähnlichen“ Aggregaten im Zytosol induziert wird (Ma & Lindquist, 2001; Ma & Lindquist, 2002). Die Autoren vermuteten, dass ein Defekt im proteasomalen Abbauweg der Zelle eine wichtige Rolle im Ursprung von PrP^{Sc} haben könnte. Der proteasomale Abbau wäre demnach sowohl für PrP^c als auch für PrP^{Sc} wichtig. Diese Feststellung mag im Szenario der spontanen Entstehung der sporadischen oder familiären Formen der Prionkrankheiten von Bedeutung sein. Die weitere Konversion von PrP^{Sc} und die Ausbreitung von Zelle zu Zelle jedoch finden an der Zelloberfläche und/oder den Kompartimenten der frühen Endozytose und nicht im Zytoplasma statt. Von daher wird der zelluläre Abbau von

PrP^{Sc} höchstwahrscheinlich durch lysosomale Proteasen in sekundären Lysosomen ausgeübt.

5.5 Lysate von STI571-behandelten Zellen besitzen keine erhöhte proteolytische Aktivität

Da die durchgeführten Experimente zeigten, dass durch die Behandlung mit STI571 die lysosomale Degradierung von PrP^{Sc} aktiviert wird und die Menge und Größe der Lysosomen behandelter Zellen ansteigt, lag die Vermutung nahe, dass die verstärkte Degradation in einer erhöhten proteolytischen Aktivität von Lysosomen begründet ist. Um dieser Frage nachzugehen wurden die Lysate mock- und STI571-behandelter N2a-Zellen zusammen mit postnukleären Extrakten Prion-infizierter Zellen inkubiert und die Proben danach auf ihren Gehalt an PrP^{Sc} untersucht. Hierbei wurden Reaktionsbedingungen gewählt, die den Bedingungen in zellulären Lysosomen entsprechen sollten, um die Aktivität lysosomaler Proteasen gewährleisten zu können. Bei diesen Bedingungen sollten cytoplasmatische Proteasen, Calpaine etc., eher inaktiv sein, so dass deren Aktivität bei diesem Assay keine Rolle spielen sollte.

Mit diesem Versuchsaufbau konnten keine Unterschiede zwischen den Lysaten mock-behandelter Zellen und den Lysaten von mit STI571 behandelten Zellen beobachtet werden. Das Signal für PrP^{Sc} im Western Blot war in sämtlichen Proben gleich. Dennoch ließ sich eine leichte proteolytische Aktivität der N2a-Lysate nachweisen. Obwohl vergleichbare Proteinmengen aufgetragen worden waren, nahm die Signalstärke für PrP^c durch die Inkubation mit N2a-Lysat im Vergleich zu den Kontroll-Extrakten, die nur mit dem Lyse-Puffer für die N2a-Lysate inkubiert worden waren, leicht ab. Auch PrP^{Sc} war von dieser proteolytischen Aktivität im N2a-Lysat betroffen, allerdings war es, ähnlich wie gegenüber dem Verdau mit Proteinase K, resistenter dagegen als PrP^c. Im Gegensatz zu PrP^c ließ sich keine starke Abnahme der Signalstärke beobachten. Im Western Blot hingegen tauchte eine zusätzliche Proteinase K-resistente Bande bei etwa 15 kDa auf. Diese Bande stammt höchstwahrscheinlich aus einer Spaltung der nicht-glykosylierten Form von PrP^{Sc}, da ansonsten keine Veränderungen im Bandenmuster zu detektieren waren. Diese beobachtete proteolytische Aktivität war

aber von STI571 unabhängig und stellt somit lediglich die normalerweise im Lysat von N2a-Zellen vorhandene Aktivität von Proteasen dar.

Die Beobachtung, dass nicht wie im Proteinase K-Verdau das gesamte PrP^c degradiert bzw. nur ein Teil der nicht-glykosylierten PrP^{Sc}-Form gespalten wurde, kann mehrere Ursachen haben. Zum einen könnten die Reaktionsbedingungen nicht ideal gewählt gewesen sein, so dass die Proteasen anfangs zwar aktiv waren, dann aber schnell inaktiviert wurden oder dass die Proteasen im Extrakt an sich nur schwach aktiv waren. Zum anderen ist dieser Versuchsaufbau nur bedingt mit der physiologischen Situation in der Zelle vergleichbar. Die Reaktion erfolgt in einem viel größeren Volumen als normalerweise in den Lysosomen. Das hat eine Verdünnung der proteolytischen Aktivität pro Molekül und damit eine relative Stabilisierung der zu degradierenden Proteine zur Folge.

In diesen Versuchen konnte keine verstärkte proteolytische Aktivität in Lysaten von STI571-behandelten Zellen festgestellt werden. Geht man davon aus, dass die gewählten Bedingungen für die Fragestellung ausreichend waren, so kann man daraus schließen, dass die verstärkte lysosomale Degradierung von PrP^{Sc} durch die Behandlung mit STI571 nicht durch eine generelle Aktivierung der Proteasen verursacht wird, sondern vielmehr durch eine Beeinflussung der Vorgänge, die zur Degradierung von PrP^{Sc} führen. Denkbar wäre, wie schon für die verzweigten Polyamine vorgeschlagen, eine Erleichterung des Transports von PrP^{Sc} in sekundäre Lysosomen.

Dem steht allerdings die in der konfokalen Mikroskopie beobachtete scheinbare Vermehrung der Lysosomen entgegen, die mit einer steigenden proteolytischen Aktivität verbunden sein könnte. Diese Diskrepanz könnte aber auch daher rühren, dass die gewählten Bedingungen für die Gewährleistung der Aktivität der Proteasen doch nicht ideal waren und daher in weiteren Versuchen optimiert werden müssten. Ebenso könnte keine Vermehrung der Lysosomen vorliegen, sondern eher eine Veränderung in der Größe und Verteilung der Lysosomen. Die Anfärbung der Lysosomen wurde mit Antikörpern gegen das lysosomale Membranprotein Lamp-1 durchgeführt. Eine Vergrößerung der Lysosomen hätte eine Ausdehnung der Lysosomenmembran und damit eine verstärkte Expression von Lamp-1 zur Folge. Das würde die stärkere Färbungsintensität erklären. Zudem spricht gegen eine generelle Erhöhung der proteolytischen Aktivität durch die Behandlung mit STI571 das Fehlen von

offensichtlichen Nebenwirkungen, die durch verstärkten unspezifischen lysosomalen Abbau zu beobachten sein müssten, wie beispielsweise ein verstärktes Verschmelzen von Lysosomen mit Vesikeln des endozytotischen Transportswegs. Dahingegen wäre ein Wirkungsmechanismus über den vereinfachten Transport von PrP^{Sc} in sekundäre Lysosomen oder die Aktivierung spezifischer zellulärer Vorgänge, die zum Abbau von PrP^{Sc} in sekundären Lysosomen führen, ein gerichteter Vorgang ohne unspezifische Nebenwirkungen und ist somit wahrscheinlicher.

5.6. Beruht der anti-Prion Effekt auf der Inhibition von c-Abl?

STI571 inhibiert spezifisch die Tyrosin-Kinasen c-Abl, c-Kit und den PDGF-Rezeptor (Buchdunger *et al.*, 1996; Heinrich *et al.*, 2000). Da jede dieser Kinasen eine bestimmte Rolle innerhalb wichtiger Signaltransduktionskaskaden spielt, wurde versucht, die für den beobachteten Effekt auf PrP^{Sc} verantwortliche Tyrosin-Kinase zu identifizieren. Die spezifische Inhibition von c-Kit und dem PDGF-Rezeptor mit dem Inhibitor CT52923 hatte in Prion-infizierten Zellen keinen Einfluss auf den PrP^{Sc}-Gehalt. Hingegen konnte durch die Überexpression einer so genannten Transdominant-Negativ-Mutante von c-Abl, durch die die Aktivität von endogenem Wildtyp c-Abl inhibiert wird, eine Reduktion von PrP^{Sc} in ScMHM2-Zellen beobachtet werden. Ebenso hatte die Herunterregulierung der Expression von c-Abl durch RNAi einen anti-Prion Effekt. Diesen Experimenten zufolge wird somit der beobachtete Effekt von STI571 auf PrP^{Sc} in Prion-infizierten Zellen durch die Inhibition von c-Abl ausgelöst.

Die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Werte für den IC₅₀-Wert für STI571 lagen bei etwa 0,1 µM im *in vitro* Kinase-Assay und unter 1 µM in den Zellkulturexperimenten. Diese Werte stimmen mit den in der Literatur angegebenen IC₅₀-Werten von STI571 überein, die für die c-Abl Aktivität *in vitro* zwischen 0,1 µM und 0,3 µM für die Inhibition der Autophosphorylierung und unter 1 µM für die Inhibition der Zellproliferation (Zellkulturexperimente) liegen (Capdeville *et al.*, 2002). Diese relativ große Differenz zwischen den IC₅₀-Werten hat mit großer Wahrscheinlichkeit ihre Ursache in den unterschiedlichen Wirkungen, die zur Messung herangezogen werden. Die *in vitro* Assays messen einen direkten Effekt von STI571 auf

die Phosphorylierung eines spezifischen Substrats von c-Abl. Der anti-Prion Effekt hingegen bzw. der Effekt auf die Zellproliferation sind indirekte Auswirkungen, die in der Abfolge einer Signaltransduktionskaskade geschehen, deren Anfang die Inhibition von c-Abl bildet. Zudem muss STI571 in diesen Experimenten erst über die Plasmamembran in die Zelle aufgenommen werden, um an c-Abl binden zu können. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, IC_{50} -Werte miteinander zu vergleichen, die in unterschiedlichen Assays bestimmt wurden. Eine Konzentration von STI571, die im *in vitro* Kinase-Assay eine 50 %ige Inhibition der Phosphorylierung eines synthetischen Substrats bewirkt, ist höchstwahrscheinlich nicht ausreichend, um in Prion-infizierten Zellen die Degradierung von PrP^{Sc} zu aktivieren und zu einer 50 %igen Reduktion von PrP^{Sc} zu führen.

In einer kürzlichen Veröffentlichung wurde von der Inhibition der Produktion von β -Amyloid-Peptiden durch STI571 berichtet. Die Anhäufung von β -Amyloid-Peptiden im Gehirn verursacht das Entstehen der Alzheimer-Erkrankung. Es wurde gezeigt, dass STI571 die Aktivität des γ -Sekretase-Komplexes inhibiert, die für die pathologische Spaltung des β -Amyloid-Vorläufer-Proteins und die Produktion von β -Amyloid-Peptiden verantwortlich ist (vergleiche auch Abschnitt 5.2.). Interessanterweise schien hier c-Abl keine Rolle zu spielen. STI571 inhibierte die Entstehung von β -Amyloid-Peptiden sowohl in Wildtyp, als auch in c-Abl^{-/-} Maus-Fibroblasten (Netzer *et al.*, 2003). Das würde bedeuten, dass dem anti-Prion Effekt und dem Effekt von STI571 auf die Produktion der β -Amyloid-Peptide unterschiedliche Wirkungsmechanismen zugrunde liegen.

Die Tyrosin-Kinase c-Abl

C-Abl ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das eine Vielzahl von Funktionen erfüllt. Abbildung 5.6.1. zeigt ein Schema des Aufbaus von murinem c-Abl.

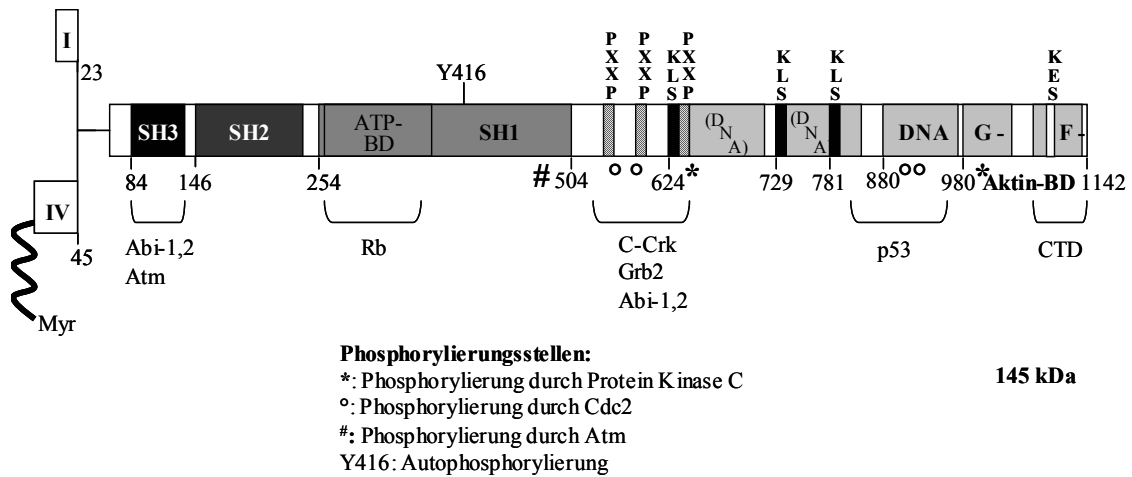


Abb. 5.6.1. Schematische Darstellung des Aufbaus von murinem c-Abl. Sowohl die I-Form mit Exon I als auch die alternative IV-Form mit Exon IV, das eine Myristyl-Gruppe (Myr) enthält, sind dargestellt. Zu sehen sind die src-Homologie Domänen SH1 für die Kinase Aktivität mit gekennzeichneter N-terminaler ATP-Bindungsregion, die SH2 Domäne zur Bindung an Phospho-Tyrosinreste und die SH3-Domäne zur Bindung prolinreicher Regionen. Des Weiteren existieren 3 prolinreiche Domänen (PxxP) für die Bindung an Adaptorproteine, 3 basische Kernlokalisierungssignale, 3 sich tandemartig wiederholende DNA-Bindedomänen, wovon eine (DNA) für die direkte Bindung verantwortlich ist, während die beiden anderen ((DNA)) nur zusätzlich vorhanden sind, Domänen zur Bindung an G- und F-Aktin (G-, F-Aktin-BD) und ein Kernexportsignal (KES). Die Stelle für die Autophosphorylierung (Y416) und die Stellen die durch das Ataxia-Telangiectasia-mutierte Protein (#, Atm), Cdc2 (°) und die Protein Kinase C (*) phosphoryliert werden, sind gekennzeichnet. Von den 9 vermutlich existierenden Phosphorylierungsstellen von Cdc2 sind nur 4 gezeigt. Die Nummerierung der Aminosäuren (nach der IV-Form) ist angegeben. Zusätzlich sind einige der bekannten Interaktoren von c-Abl aufgelistet. (Abi-1,2: Abl interacting protein; Rb: Retinoblastoma Protein; CTD: C-Terminale Domäne der RNA-Polymerase II). (nach van Etten, 1999).

Aus dem Schema ist ersichtlich, dass die Vielzahl an Domänen und das Vorhandensein verschiedener Sequenzen für die Lokalisierung in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle, c-Abl eine herausragende Stellung in der Signaltransduktion verleihen. Das c-Abl Gen in Säugetieren wird ubiquitär exprimiert und besitzt zwei alternative 5'-Exons mit verschiedenen Promotoren, so dass zwei verschiedene mRNAs und Proteine entstehen, die sich nur in ihren N-terminalen Sequenzen unterscheiden, die I-Form und die IV-Form. Beide Formen besitzen neben drei Kernlokalisations-Sequenzen und einer Kern-Export-Sequenz auch je eine Domäne, die sie befähigt, an F- bzw. G-Actin zu binden. Aus diesem Grund können beide Formen sowohl im Kern als auch im Zytoplasma lokalisiert sein. Im Zytoplasma ist der Großteil der c-Abl-Moleküle über die Aktin-Binde-Domäne an das Zytoskelett assoziiert. Ein kleiner Teil der IV-Form ist über die Myristyl-Gruppe an die Plasmamembran gebunden. In den meisten Zelllinien ist die Kinase im Kern lokalisiert. In neuronalen und hämatopoetischen Zellen jedoch

befindet sich c-Abl hauptsächlich im Zytosol. Die genauen Aufgaben von c-Abl sind bislang noch nicht völlig klar. Ebenso ist noch nicht ganz sicher, ob c-Abl je nach Kompartiment, in dem es sich befindet, spezifische, ortsgebundene Funktionen hat oder ob es auch in der Lage ist durch das Wechseln von einem Kompartiment in das andere direkt Signale zu transduzieren (van Etten, 1999).

Von c-Abl sind bisher nur sehr wenig Aktivatoren und Targets bekannt und es werden immer wieder neue Aufgaben von c-Abl beschrieben. Zu den Interaktoren von c-Abl zählen unter anderem das Retinoblastoma Protein, p53, Atm (Ataxia-Telangiectasia-mutiertes Protein) und die C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II. Diese Interaktoren sind für die Funktionen von c-Abl im Kern wichtig. Beispielsweise spielt c-Abl eine wichtige Rolle bei der Einleitung zum Zell-Zyklus Arrest in der G1-Phase als Antwort auf ionisierende Strahlung und DNA-Schädigungen. Hierfür interagiert c-Abl mit der Serin-Kinase Atm, wird von ihr phosphoryliert und dadurch aktiviert. Im Zytoplasma interagiert c-Abl mit dem Adaptorprotein Grb2 und c-Crk. C-Crk wird von c-Abl zudem phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Die Kinase-Aktivität von c-Crk ist wichtig für die Organisation der Aktin-Mikrofilamente des Zytoskeletts. Wie oben bereits erwähnt, ist der Großteil an zytoplasmatischem c-Abl an das Zytoskelett gebunden. Diese Tatsachen deuten auf eine Rolle von c-Abl beim Auf- und Umbau des Zytoskelett als Antwort auf verschiedene Signaltransduktionskaskaden hin. Des Weiteren wäre auch eine Regulation von zytoskelettgebundenem c-Abl durch Signale über das Zytoskelett denkbar. So konnte gezeigt werden, dass in Fibroblasten bei Anheftung an Fibronectin c-Abl zu den Fokalen Adhäsionsstellen rekrutiert wird. Gleichzeitig steigt seine Kinase-Aktivität vorübergehend an. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht ganz verstanden. Es wird aber vermutet, dass hierbei eine Zytoskelett-vermittelte Signaltransduktion für die Aktivierung von c-Abl verantwortlich ist.

Unter normalen Umständen ist c-Abl inaktiv und unterliegt einer sehr strengen Regulation. C-Abl, das eine konstitutive Aktivität besitzt, hat transformierende Eigenschaften (van Etten, 1999) und die Überexpression von c-Abl in Zellkultur führt zu Zellzyklus-Arrest in der G1 Phase mit darauf folgender Einleitung in die Apoptose (Wen *et al.*, 1996; Sawyers *et al.*, 1994; Goga *et al.*, 1995). Aus diesem Grund war es in der vorliegenden Arbeit auch nicht möglich, Wildtyp c-Abl in den ScMHM2-Zellen zu überexprimieren.

Die Tatsache, dass c-Abl in neuronalen Zellen hauptsächlich im Zytoplasma vorliegt und dort Funktionen im Auf- und Umbau vom Zytoskelett wahrnehmen könnte, spräche für den im Vorkapitel vorgeschlagenen Wirkungsmechanismus. Durch Beeinflussung der Organisation des Zytoskeletts wird auch der Transport von Zellorganellen beeinflusst. Somit könnte durch einen Eingriff in die Aktivität von c-Abl über STI571 auch der Transport von PrP^{Sc} in sekundäre Lysosomen beeinflusst werden. Dahingehend sollten weitere Experimente die Hypothese der Beteiligung von c-Abl und dem Zytoskelett am anti-Prion Effekt untermauern

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass STI571 die zelluläre Degradierung von PrP^{Sc} in Prion-infizierten Zellen aktiviert und dass dieser Effekt höchstwahrscheinlich auf der Inhibition der Tyrosin-Kinase c-Abl beruht. Da eine Inhibition der lysosomalen Degradierung der Zelle den anti-Prion Effekt von STI571 aufheben kann, ist es wahrscheinlich, dass der durch STI571 aktivierte Abbau von PrP^{Sc} in Lysosomen stattfindet. Zudem bestärkt die Beobachtung, dass die alleinige Inhibition der lysosomalen Degradierung zu einem Anstieg der Menge an PrP^{Sc} in der Zelle führt das Modell, in dem Lysosomen eine wichtige Rolle in der Degradierung von PrP^{Sc} in Prion-infizierten Zellen spielen.

5.7 STI571: von der Zellkultur zu *in vivo* Studien?

Bisher konnte von mehreren Substanzen ein anti-Prion Effekt in Zellkultur gezeigt werden. In diesem Kontext sind beispielsweise zu nennen: Kongo Rot (Caughey & Race, 1992), Dextransulfat, Pentosan Polysulfat (Ladogana *et al.*, 1992), Suramin (Gilch *et al.*, 2001), verzweigte Polyamine wie Polypropyleneimin (PPI) Dendrimere und Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimere (Supattapone *et al.*, 1999; Supattapone *et al.*, 2001; Winklhofer *et al.*, 2000), Acridin Derivate wie Quinacrin und Chlorpromazin (Korth *et al.*, 2001) und Lovastatin (Taraboulos *et al.*, 1995). Von den meisten dieser Substanzen ist kein molekularer Wirkungsmechanismus bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass STI571 den PrP^{Sc}-Gehalt in behandelten Zellen drastisch reduziert, ohne dabei die zelluläre Isoform PrP^c zu

beeinflussen. Diese Tatsache würde STI571 zu einem viel versprechenden Kandidaten für Prophylaxe und Therapie von Prionkrankheiten machen. In *in vivo* Studien in Mäusen, die in einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Klein in Würzburg durchgeführt wurden, konnten tatsächlich zunächst sehr viel versprechende Ergebnisse erzielt werden. Hierfür wurden Mäuse intraperitoneal mit 10 % Hirnhomogenat einer terminal an Scrapie erkrankten Maus infiziert. Der verwendete mausadaptierte Prion-Stamm war RML (Rocky Mountain Laboratories); hier liegt die erwartete Inkubationszeit bei der intraperitonealen Inokulation bei über 180 Tagen. 57 Tage nach erfolgter Infektion wurden die Tiere über intraperitoneale Injektion entweder mit 50 mg STI571/kg Körpergewicht oder mock-behandelt. Nach gewissen Zeitabständen wurden je eine behandelte und eine Kontroll-Maus getötet und Milz, Rückenmark und Hirnstamm auf PrP^{Sc} untersucht. Abbildung 5.7.1. zeigt die Untersuchungen der Milz nach 27 bzw. 48 Tagen erfolgter Behandlung (84 bzw. 105 Tage nach Infektion). Darin ist zu sehen, dass durch die Behandlung mit STI571 eine Akkumulation von PrP^{Sc} in der Milz erfolgreich verhindert werden konnte. In den STI571 behandelten Tieren (+STI571) ist weder nach 25 noch nach 48 Tagen ein Signal für PrP^{Sc} nach Verdau mit Proteinase K zu detektieren (Spuren 2 und 4), im Gegensatz zu den mock-behandelten Tieren (-STI571), bei denen nachweisbar PrP^{Sc} in der Milz vorhanden ist (Spuren 5 und 7). Spuren 9 und 10 zeigen als Kontrolle das für die Infektion verwendete Hirnhomogenat.

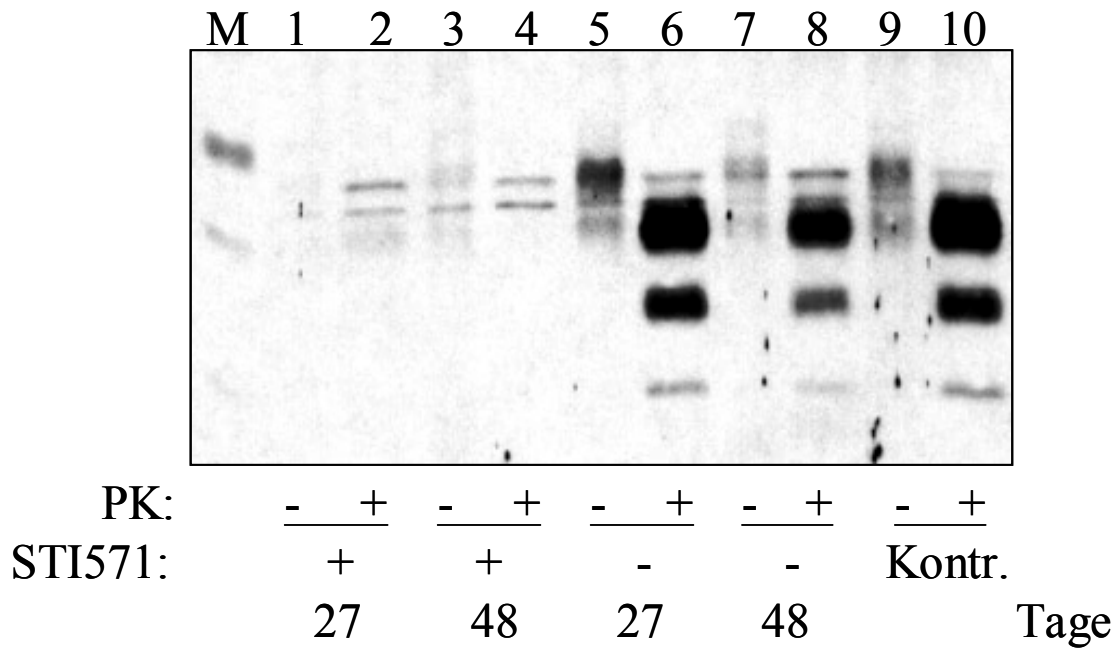


Abb. 5.7.1. Effekt von STI571 auf die Akkumulation von PrP^{Sc} in infizierten Mäusen. C57BL/6 Mäuse wurden intraperitoneal mit dem mausadaptierten Prion-Stamm RML inokuliert. 57 Tage nach der Infektion (27 dpi) wurden die Mäuse entweder mock- oder mit 50 mg STI571/kg Körpergewicht mittels intraperitoneal Injektion behandelt. Nach weiteren 27 bzw. 48 Tagen (84 bzw. 105 dpi) wurde je eine Maus getötet und die Milz homogenisiert. Das Homogenat wurde mittels Proteinase K-Verdau auf den Gehalt an PrP^{Sc} getestet. Die Analyse erfolgte mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot. (Blot freundlicherweise von Prof. Dr. Michael Klein, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt).

Nach 27 tägiger Behandlung (84 Tage nach der Infektion) waren auch Rückenmark und Hirnstamm frei von PrP^{Sc}. Allerdings war das auch zu erwarten, da der Zeitpunkt der Neuroinvasion noch nicht stattgefunden hatte und auch die Kontroll-Tiere noch kein PrP^{Sc} in diesen Organen aufwiesen. Nach 48 Tagen (105 Tage nach der Infektion) war der Hirnstamm von behandelten und Kontroll-Tieren zwar immer noch frei von PrP^{Sc}, dafür ließ sich nun in beiden Gruppen PrP^{Sc} im Rückenmark nachweisen, was auf den Beginn der Neuroinvasion hindeutete. Zu späteren Zeitpunkten war in beiden Gruppen PrP^{Sc} auch im Hirnstamm nachweisbar. Dementsprechend gab es auch keine Unterschiede in der Inkubationszeit der Krankheit. Alle Tiere zeigten etwa zur gleichen Zeit die ersten Symptome und mussten innerhalb kurzer Zeit getötet werden. Somit konnte durch die Behandlung mit STI571 zwar die Akkumulation von PrP^{Sc} in peripheren, lymphoretikulären Organen wie der Milz verhindert werden, nicht jedoch die Neuroinvasion und der Ausbruch der Krankheit. Dass durch die Behandlung mit STI571 auch keine Retardierung oder Abschwächung in der Neuroinvasion beobachtet werden konnte, könnte darauf hinweisen, dass die Akkumulation von PrP^{Sc} in der

Peripherie in anderen Organen stattgefunden hatte. Allerdings ist die intraperitoneale Inokulation mit Scrapie ein sehr „grobes“ Verfahren und spiegelt nicht unbedingt die Situation einer „natürlichen“ Infektion wieder. Ein relativ großes Volumen einer sehr hohen Dosis wird in den verhältnismäßig winzigen Bauchraum einer Maus appliziert. Hierbei kommt es zu einer sehr weit reichenden, unspezifischen Verteilung des Erregers und es kann geschehen, dass ein gewisser Teil schon das Nervensystem erreicht. Sollte die Akkumulation dort langsamer stattfinden als in den physiologischen Stätten für die erste Akkumulation von PrP^{Sc}, wie der Milz, dann könnte das auch der Grund dafür sein, dass zunächst kein PrP^{Sc} nachweisbar war. Da eine solche unspezifische Verteilung nie ausgeschlossen werden kann, sind der Vergleich und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sehr schwer. Eine Lösung dieses Problems böte eine geringere Dosis oder besser noch die orale Infektion, die der natürlichen Infektion am nächsten käme. Dies ist allerdings durch die sehr verlängerte Inkubationszeit kaum im großen Rahmen durchführbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass für einen Erfolg versprechenden Einsatz in der Therapie und Prophylaxe von Prionkrankheiten, entsprechende Kandidaten zuvor noch einige wichtige Voraussetzungen erfüllen sollten:

Zunächst lassen sich Ergebnisse, die in Zellkultursystemen gewonnen wurden, nicht direkt auf die *in vivo* Situation übertragen. So konnte mit STI571 zwar eine Heilung Prion-infizierter Zellen herbeigeführt werden, was sich *in vivo* durch die Inhibition der Akkumulation von PrP^{Sc} in der Milz auch reproduzieren ließ. Die Neuroinvasion und der Ausbruch der Krankheit jedoch fanden in gleichem Maße statt wie in den mock-behandelten Kontroll-Tieren. Ähnliches konnte für die Substanz Quinacrin beobachtet werden. Die Behandlung von Prion-infizierten Zellen mit Quinacrin führte zu einer starken Inhibition der PrP^{Sc}-Neubildung (Korth *et al.*, 2001). In Tierversuchen jedoch konnte durch Quinacrin keine wesentliche Verlängerung der Überlebenszeit Prion-infizierter Mäuse erreicht werden (Collins *et al.*, 2002). Nichtsdestotrotz könnte Quinacrin ein guter Kandidat für eine Post-Expositions-Prophylaxe sein, wie es auch für Suramin der Fall ist (Gilch *et al.* 2001).

Ähnlich verhält es sich mit der Übertragbarkeit von Ergebnissen aus einem murinen *in vivo* System auf die Situation im Menschen. So bestehen große Unterschiede zwischen dem Metabolismus von STI571 in der Maus und dem im Menschen. Die Halbwertszeit von oral aufgenommenem STI571 beträgt im Menschen zwischen 12 und 16 Stunden.

In der Maus hingegen liegt sie unter 4 Stunden (Le Coutre *et al.*, 1999). Aus diesem Grund ist es schwer, in den Mäusen die für den anti-Prion Effekt nötige STI571-Konzentration im Blut zu erreichen und aufrecht zu erhalten.

Eine therapeutische Substanz müsste im Falle der Prionkrankheiten das ZNS erreichen und daher in der Lage sein, die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen (Gilch & Schätzl, 2003). Zwischenzeitlich konnte gezeigt werden, dass nur etwa 2,8 % von oral verabreichtem STI571 im Liquor cerebrospinalis gefunden werden (Petzer *et al.*, 2002). Diese Menge wäre wahrscheinlich nicht genug, um einen anti-Prion Effekt im Gehirn hervorzurufen. Aus diesem Grund konnte in dem Vorversuch im Mausmodell auch die Neuroinvasion nicht verhindert werden. Könnte gezeigt werden, dass nach oraler Infektion die Behandlung mit STI571 eine Neuroinvasion und der Ausbruch der Krankheit verhindert werden, so wäre STI571 wie auch Suramin und Quinacrin wenigstens ein viel versprechendes Mittel für die Prophylaxe direkt nach einer eventuell erfolgten Infektion. Eine andere Möglichkeit wäre die Entwicklung von Derivaten von STI571, die eine bessere Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit aufweisen. Da aber ein Großteil des inhibitorischen Effekts von STI571 darauf beruht, dass es genau in die „ATP-binding pocket“ der Kinasen-Domäne passt, waren bislang angestrebte Versuche, ein vergleichbares Derivat zu entwickeln, eher erfolglos. Bereits kleinste Veränderungen an STI571 haben zur Folge, dass es nicht mehr so effektiv die Kinase-Aktivität von c-Abl inhibieren kann. Ebenso führt jegliche Mutation der Aminosäure-Sequenz der „ATP-binding pocket“ dazu, dass die Kinase nicht mehr durch STI571 inhibiert werden kann. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der anti-Prion Effekt von STI571 durch die Inhibition von c-Abl verursacht wird. Demnach ist der Versuch, ein Derivat von STI571 zu entwickeln, das zum einen die Blut-Hirn-Schranke überwindet und zum anderen immer noch einen starken anti-Prion Effekt aufweist, sehr schwer, wenn nicht sogar unmöglich.

In Zusammenschau der Befunde zeigen die Ergebnisse, die mit STI571 in Prion-infizierten Zellen und *in vivo* im Maussystem gewonnen werden konnten, dass dieser Signaltransduktions-Inhibitor in der Lage ist, die Degradation von PrP^{Sc} und die zelluläre Clearance von Prionen zu erhöhen. Diese Arbeiten waren die ersten, die zeigen konnten, dass Signaltransduktionswege generell als potentielle Ziele für Ansätze zur Prophylaxe und Therapie von Prionkrankheiten angesehen werden können.

5.8. Ausblick

Zu Beginn der Arbeit waren etwa 50 verschiedene Substanzen, die alle einen bekannten inhibitorischen Effekt auf spezifische Signaltransduktionswege der Zelle haben, in Prion-infizierten Zellen dahingehend getestet worden, ob sie einen Effekt auf PrP^{Sc} aufweisen. Dabei wurden wenige Substanzen gefunden, die einen Effekt auf PrP^{Sc} ausübten, gleichzeitig aber auch einen Einfluss auf PrP^c hatten. Diese Substanzen wurden bisher noch nicht weiter untersucht. Es wäre daher sehr interessant den molekularen Wirkungsmechanismus dieser Substanzen näher zu charakterisieren und zu untersuchen, ob der Effekt auf PrP^{Sc} tatsächlich über den Effekt auf PrP^c ausgeübt wird. Die Ergebnisse zeigten, dass Signaltransduktionswege generell als potentielle Ziele für Ansätze zur Prophylaxe und Therapie von Prion-Erkrankungen angesehen werden können. Da in dem Screening nur inhibitorische Substanzen getestet wurden, wäre zu überlegen, ob ein weiteres Screening mit Aktivatoren spezieller Signaltransduktionswege durchgeführt werden sollte.

Die Charakterisierung der Substanz STI571 ist weitgehend abgeschlossen. Ohne die zelluläre Isoform PrP^c zu beeinflussen, bewirkt STI571 eine sehr effektive, irreversible Clearance von PrP^{Sc}. Im Langzeitversuch konnte gezeigt werden, dass PrP^{Sc} auch nach Wegnahme der Substanz nicht wieder zu detektieren ist. Es wurde die Schlussfolgerung getroffen, dass STI571 eine „Heilung“ der Zellen bewirkt. Um diese Schlussfolgerung zu bestärken, müsste zusätzlich nachgewiesen werden, dass die Zellen zudem ihre Infektiosität verloren haben. Dies wird in der Regel durch den Indikator-Tierversuch erreicht. Hierbei werden Mäuse oder Hamster mit Homogenat der zu testenden Zellen durch intracerebrale Infektion inokuliert. Im Gegensatz zu den Kontroll-Tieren, die mit Homogenat von mock-behandelten Prion-infizierten Zellen inokuliert wurden, sollten die mit Homogenat von STI571-behandelten Prion-infizierten Zellen inokulierten Tiere nicht erkranken. Ein solcher Indikator-Tierversuch steht für die STI571-behandelten Zellen noch aus, sollte aber zur Bestätigung der getroffenen Aussage über die Heilung Prion-infizierter Zellen noch durchgeführt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass STI571 die lysosomale Degradation von bereits in der Zelle vorhandenem PrP^{Sc} aktiviert. Den durchgeführten Untersuchungen zufolge geschieht diese Aktivierung über die Inhibition der Tyrosin-Kinase c-Abl. Die Inhibition der Aktivität von c-Abl mittels RNAi hatte einen ähnlichen Effekt auf PrP^{Sc} wie die Substanz STI571. Allerdings waren die Ergebnisse, bedingt durch die transiente

Transfektion und die dadurch eingeschränkte Transfektionseffizienz, wie in Abschnitt 4.5.2. diskutiert, inhomogen. Diese Problematik sollte durch eine Hygromycin B-Selektion der transfizierten Zellen und einer längerfristigen Niederregulation von c-Abl behoben werden können. Bisher ist eine solche Selektion noch nicht geglückt, sollte aber noch durchgeführt werden, um die bisherigen Ergebnisse zu bestätigen. Ebenso kann man die Expression der Transdominant-Negativ-Mutante in den Zellen optimieren. Mit der in dieser Arbeit durchgeführten transienten Transfektion ist eine maximale Expression der Mutante für höchstens 2 Tage zu erreichen. Zudem werden nicht alle Zellen der Zellkulturschale erfolgreich transfiziert. Bei Verwendung eines retroviralen Transduktions-Systems wären diese beiden Einschränkungen nicht mehr gegeben. Im Moment werden in unserem Labor zwei Retrovirus-Systeme zur Transduktion etabliert. Sollte sich eines dieser Systeme für die Transduktion Prion-infizierter Zellen eignen, sollte der Versuch mit der Transdominant-Negativ-Mutante von c-Abl in diesem System wiederholt werden.

Weitere Untersuchungen sollten durchgeführt werden, um die für den anti-Prion Effekt verantwortliche Signaltransduktionskaskade und weitere daran beteiligte Proteine zu identifizieren. Da c-Abl auch einen Effekt auf die Organisation des Zytoskeletts hat, wäre denkbar, dass der anti-Prion Effekt über diesen Weg ausgeübt wird. Hierbei wäre zum Beispiel ein Einfluss auf den Transport von Vesikeln, wie den Lysosomen, und damit ein veränderter lysosomaler Abbau vorstellbar. Somit wären Experimente zur näheren Untersuchung des Einflusses von STI571 auf die Actin-Filamente und die Organisation der Microtubuli im Zusammenhang mit dem Effekt auf PrP^{Sc} sehr interessant und könnten weitere Aufschlüsse über den molekularen Wirkungsmechanismus von STI571 und die Rolle von c-Abl im anti-Prion Effekt geben.

Der Einfluss von STI571 auf die Lysosomen und die lysosomale Morphologie könnte durch Aufreinigung der zellulären Lysosomen mittels Zellfraktionierung und deren nähere Untersuchung durchgeführt werden. Geeignet wären hierbei Western Blot Experimente, um einen möglichen Einfluss auf bestimmte lysosomale Proteine zu untersuchen oder auch die Elektronenmikroskopie für eine Untersuchung der Lysosomenmorphologie.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Experiment zur Untersuchung der proteolytischen Aktivität durchgeführt. Hiernach konnte keine generelle Erhöhung dieser Aktivität festgestellt werden. Ein spezifischer Effekt auf einzelne Proteasen oder

Proteasenfamilien kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da eine solche Auswirkung mit dem durchgeführten Experiment nicht festzustellen gewesen wäre. Mit kommerziell erhältlichen Assays lässt sich die Aktivität von einzelnen Proteasen oder Proteasenfamilien genauer bestimmen. Die Verwendung solcher Assays wäre daher sehr hilfreich, um einen spezifischen Einfluss auf bestimmte Proteasen zu untersuchen.

In den durchgeführten Tierversuchen zur Therapie und Prophylaxe konnten bisher leider keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden. Wie bereits im Abschnitt 5.7. diskutiert ist allerdings die in diesen Versuchen angewandte Inokulationsmethode – die intraperitoneale Infektion – relativ problematisch, was die unspezifische Verteilung des Inokulums in der Maus und damit die Übertragbarkeit auf die „natürliche“ Situation angeht. Eine Lösung wären Versuche, bei denen die Tiere oral infiziert werden würden. Das käme dem natürlichen Infektionsweg am nächsten und wäre somit am ehesten übertragbar. Auch eine Infektion mit niedrigeren Dosen an Inokulum wäre denkbar. Derartige Tierversuche sind allerdings sehr Zeit- und Kostenintensiv und können nur in einem sehr großen Tierlabor durchgeführt werden. Die im ersten Versuch gemachte Beobachtung, dass durch die Behandlung mit STI571 der PrP^{Sc}-Gehalt in der Milz drastisch reduziert werden konnte, würden solche Tierversuche jedoch rechtfertigen. Denn obwohl STI571 nicht in der Lage ist, in ausreichender Menge die Blut-Hirn-Schranke zu übertreten und damit nach erfolgter Neuroinvasion für eine Therapie nicht zu verwenden ist, so besteht doch die Möglichkeit, dass STI571 als prophylaktisches Mittel nach einer peripheren Infektion, zum Beispiel nach dem Verzehr von kontaminiertem Fleisch, zum Einsatz kommen könnte, um die Neuroinvasion und den Ausbruch der Krankheit zu verhindern.

6. Literaturverzeichnis

Alper T., Cramp, W. A., Haig, D. A. und Clarke, M. C. (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, **214**, 764–766.

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

Alpers, M. P. (1987) Epidemiology and clinical aspects of kuru. (Prusiner & McKinley, 1987, pp. 451–465)

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

Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181**, 223–230.

Baker, H. E., Poulter, M., Crow, T. J., Frith, C. D., Lofthouse, R. und Ridley, R. M. (1991) Aminoacid polymorphism in human prion protein and age at death in inherited prion disease. *Lancet*, **337**, 1286.

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 isofoms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, **46**, 417–428.

Birkett, C. R., Hennion, R. M., Bembridge, D. A., Clarke, 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 J.*, **20**, 3351–3358.

Bolton, D. C., Meyer, R. K. und Prusiner, S. B. (1985) Scrapie PrP 27 – 30 is a sialoglycoprotein. *J. Virol.*, **53**, 596–606.

Borchelt, D. R., Koliatsos, V. E., Guarneri, M., Pardo, C. A., Sisodia, S. S. und Price, D. L. (1994) Rapid anterograde axonal transport of the cellular prion glycoprotein in the peripheral and central nervous system. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14711–14714.

Borchelt, D. R., Scott, M., Taraboulos, A., Stahl, N. und Prusiner, S. B. (1990) Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J. Cell. Biol.*, **110**, 743–752.

Borchelt, D. R., Taraboulos, A. und Prusiner, S. B. (1992) Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.*, **267**, 16188–16199.

- Brotherston, J. G.** (1968) Spread of scrapie by contact to goats and sheep. *J. Com. Path.*, **78**, 9–17.
- Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D. und Kretzschmar, H. A.** (1997a) The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature*, **390**, 684–687.
- Brown, D. R., Schulz-Schaeffer, W. J., Schmidt, B. und Kretzschmar, H. A.** (1997b) Effects of oxidative stress on prion protein expression in PC12 cells. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **15**, 961–972.
- Brown, D. R., Wong, B. S., Hafiz, F. Clive, C., Haswell, S. J. und Jones, I. M.** (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem. J.*, **344**, 1–5.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. und Agami, R.** (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550–553.
- Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Muller, M., Druker, B. J. und Lydon, N. B.** (1996) Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase *in vitro* by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.*, **56**, 1000–1004.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguett, M. und Weissmann, C.** (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, **73**, 1339–1347.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguett, M. und Weissmann, C.** (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, **356**, 577–582.
- Burger, D. und Hartsough, G. R.** (1965) Encephalopathy of mink II: Experimental and natural transmission. *J. Infect. Dis.*, **115**, 393–399.
- Byrom, M., Pallotta, V., Brown, D. und Ford, L.** (2002) Visualizing siRNA in mammalian cells: fluorescence analysis of the RNAi effect. *Ambion TechNotes*, **93**, 6–8.
- Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J. und Matter, A.** (2002) Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat. Rev. Discov.* **7**, 493–502.
- Carlson, G. A., DeArmond, S. J., Gorchia, M., Westaway, D. und Prusiner, S. B.** (1994) Genetics of prion diseases and prion diversity in mice. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*, **343**, 363–369.
- Caspi, S., Halimi, M., Yanai, A., Sasson, S. B., Taraboulos, A. und Gabizon, R.** (1998) The anti-prion activity of Congo red. Putative mechanism. *J. Biol. Chem.*, **271**, 3484–3489.
- Caughey, B.** (1991) *In vitro* expression and biosynthesis of prion protein. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **172**, 93–107.

Caughey, B. und Race, R. E. (1992) Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red. *J. of Neurochem.*, **59**, 768–771.

Caughey, B. und Raymond, G. J. (1991) The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem.*, **266**, 18217–18223.

Caughey, B. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F. und Caughey, W. S. (1991) Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27 – 30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry*, **30**, 7672–7680.

Chen, S., Mange, A., Dong, L., Lehmann, S. und Schachner M. (2003) Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol. Cell. Neurosci.*, **22**, 227–233.

Clarke, A. R., Jackson, G. S. und Collinge, J. (2001) The molecular biology of prion propagation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **365**, 185–195.

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**, 530–531.

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

Collinge, J. (2001) Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**, 519–550.

Collinge, J. und Rossor, M. (1996a) A new variant prion disease. *Lancet*, **347**, 916–917.

Collinge, J., Hill, A. F., Ironside, J. und Zeidler, M. (1997) Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy – authors' reply to Arya and Evans. *Lancet*, **349**, 1322–1323.

Collinge, J., Palmer, M. S. und Dryden, A. J. (1991) Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, **337**, 7–9.

Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J. und Hill, A. F. (1996b) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of “new variant” CJD. *Nature*, **383**, 685–690.

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

Collins, S. J., Lewis, V., Brazier, M., Hill, A. F., Fletcher, A. und Masters, C. L. (2002) Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model. *Ann. Neurol.*, **52**, 503–506.

Come, J. H., Fraser, P. E. und Lansbury, P. T. Jr. (1993) A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 5959–5963.

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

de Klein, A., van Kessel, A. G., Grosveld, G., Bartram, C. R., Hagemeyer, A., Bootsma, D., Spurr, N. K., Heisterkamp, N., Groffen, J. und Stephenson, J. R. (1982) A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature*, **300**, 765–767.

Deininger, M. W., Goldman, J. M. und Melo J. V. (2000) The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, **96**, 3343–3356.

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

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

Doh-Ura, K., Iwaki, T. und Caughey, B. (2000) Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J. of Virol.*, **74**, 4994–4897.

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

Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Ghani, A. C. und Anderson, R. M. (2002) Implications of BSE infection screening data for the scale of the British BSE epidemic and current European infection levels. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **269**, 2179–2190.

Edenhofer, F., Rieger, R., Famulok, M., Wendler, W., Weiss, S. und Winnacker, E. L. (1996) Prion protein PrP^C interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J. Virol.*, **70**, 4724–4728.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. und Tuschl, T. (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494–498.

Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. und Tuschl, T. (2001b) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.*, **20**, 6877–6888.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 9295–9299.

Ford, B. J. editor (1996) BSE – the facts (mad cow disease and the risk of mankind). London, Gorgi Books.

Fournier, J. G., Escaig-Haye, F., Billette de Villemeur, T. und Robain, O. (1995) Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP^c) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *C. R. Acad. Sci. III*, **318**, 339–344.

Gabriel, J. M., Oesch, B., Kretzschmar, H., Scott, M. und Prusiner, S. B. (1992) Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 9097–9101.

Gajdusek, D. C. (1981) Letter to Burnet, Wood and Anderson. In: Farquhar, J., *et al.*, (eds.). Kuru – early letters and field notes from the collection of D. Carlton Gajdusek. Raven Press, New York, NY, pp.5.

Gajdusek, D. C. und Zigas, V. (1957) Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N. Engl. Med.*, **257**, 974–978.

Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J. und Alpers, M. (1966) Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*, **209**, 794–796.

Gasset, M., Baldwin, M. A., Fletterick, R. J. und Prusiner, S. B. (1993) Perturbation of the secondary structure of the scrapie prion protein under conditions that alter infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 1–5.

Gauczynski, S., Peyrin, J. M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J. P., Dormont, D., Lasmezas, C. I. und Weiss, S. (2001) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as a cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J.*, **20**, 5863–5875.

Gerstmann, J. et al. (1936) Über eine eigenartige hereditary-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystem; zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z. Ges. Neurol. Psychiat.*, **154**, 736–762.

Ghani, A. C., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M. und Anderson, R. M. (2002) The transmission dynamics of BSE and vCJD. *C. R. Biol.*, **325**, 37–47.

Gibbs, C. J. Jr., Gajdusek, D. C., Asher, D. M., Alpers, M. P., Beck, E., Daniel, P. M. und Matthews, W. B. (1968) Creutzfeld-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science*, **161**, 388–389.

Gilch, S., Nunziante, M., Ertmer A., Wopfner, F., Laszlo, L. und Schätzl, H. M. (2004) Recognition of luminal prion protein aggregates by post-ER quality control mechanisms is mediated by the prooctarepeat region of PrP. *Traffic*, **5**, 300–313.

Gilch, S und Schätzl, H. M. (2003) Promising developments bringing prion diseases closer to therapy and prophylaxis. *Trends Mol. Med.*, **9**, 367–369.

Gilch, S., Winkelhofer, K. F., Groschup, M. H., Nunziante, M., Muranyi, W., Riesner, D., Tatzelt, J. und Schätzl, H. M. (2001) Intracellular re-routing of prion

protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. *EMBO J.*, **20**, 3957–3966.

Gilch, S., Wopfner, F., Renner-Müller, I., Bauer, C., Wolf, E., Brem, G., Groschup, M. H. und Schätzl, H. M. (2003) Polyclonal anti-PrP auto-antibodies induced with dimeric PrP interfere efficiently with PrP^{Sc} propagation in prion-infected cells. *J. Cell. Biol.*, **278**, 18524–18531.

Gill, A. C., Ritchie, M. A., Hunt, L. G., Steane, S. E., Davies, K. G., Bocking, S. P. Rhie, A. G., Bennett, A. D. und Hope, J. (2000) Post-translational hydroxylation at the N-terminus of the prion protein reveals presence of PPII structure *in vivo*. *EMBO J.*, **19**, 5324–5331.

Goga, A., Liu, X., Hambuch, T. M., Senechal, K., Major, E., Berk, A. J., Witte, O. N. und Sawyers, C. L. (1995) p53 dependent growth suppression by the c-Abl nuclear tyrosine kinases. *Oncogene*, **10**, 791–799.

Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B. und Cohen, F. E. (2004) Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 8342–8347.

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

Hadlow, W. J. (1992) The scrapie-kuru connection: recollections of how it came about. In: Prusiner, S. B., *et al.* (eds.). Prion diseases of humans and animals. Ellis Horwood, New York, N.Y., 1992, pp. 40.

Hadlow, W. J. (1959) Scrapie and kuru. *Lancet*, **ii**, 289–290.

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

Hartsough, G. R. und Burger, D. (1965) Encephalopathy of mink I. Epizootiologic and clinical observations. *J. Infect. Dis.*, **115**, 387–394.

Head, M. W. und Ironside, J. W. (2000) Inhibition of prion-protein conversion: a therapeutic tool? *Trends Microbiol.*, **8**, 6–8.

Heinrich, M. C., Griffith, D. J., Druker, B. J., Wait, C. L., Ott, K. A. und Zigler, A. J. (2000) Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood*, **96**, 925–932.

Heppner, F. L., Musahl, C., Arrighi, I., Klein, M. A., Rulicke, T., Oesch, B., Zinkernagel, R., M., Kalinke, U. und Aguzzi, A. (2001) Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion antibodies. *Science*, **294**, 178–182.

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

Hill, A. F., Butterworth, R. J. Joiner, S., Jackson, G., Rossor, M. N., Thomas, D. J., Frosh, A., Tolley, N., Bell, J. E., Spencer, M., King, A., Al-Sarraj, S., Ironside, J. W., Lantos, P. L. und Collinge, J. (1999) Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet*, **353**, 183–189.

Hilmert, H. und Diringer, H. (1984) A rapid and efficient method to enrich SAF-protein from scrapie brains of hamsters. *Biosci. Rep.*, **4**, 165–170.

Hope, J., Morton, L. J., Farquhar, C. F., Multhaup, G., Beyreuther, K. und Kimberlin, R. H. (1986) The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). *EMBO J.*, **5**, 2591–1597.

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

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

Hsiao K., Baker, H. F., Crow, T. J., Poulter, M., Owen, F., Terwilliger, J. D., Westaway, D., Ott, J. und Prusiner, S. B. (1989) Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature*, **338**, 342–245.

Hsiao, K., Dlouhy, S. R., Farlow, M. R., Cass, C., DaCosta, M., Conneally, P. M., Hodes, M. E., Ghetti, B. und Prusiner, S. B. (1992) Mutant prion proteins in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Nat. Genet.*, **1**, 68–71.

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

Hutter, G., Heppner, F. L. und Aguzzi, A. (2003) No superoxide dismutase activity of cellular prion protein *in vivo*. *Biol. Chem.*, **384**, 1279–1285.

Jakob, A. M. (1921) Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (Spastische Pseudosklerose – Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, **70**, 132–146.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 10069–10074.

Kascsak, R. J., Rubenstein, R., Merz, P. A., Tonna-DeMasi, M., Fersko, R., Carp, R. I., Wisniewski, H. M. und Diringler, H. (1987) Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J. Virol.*, **61**, 3688–3693.

Kharbanda, S., Ren, R., Pandey, P., Shafman, T. D., Feller, S. M., Weichselbaum, R. R. und Kufe, D. W. (1995) Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA damage agents. *Nature*, **376**, 785 – 788.

Klatzo, I., Gajdusek, D. C. und Zigas, V. (1959) Pathology of Kuru. *Lab Invest*, **8**, 799–847.

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

Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T. und Caughey, B. (1994) Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature*, **370**, 471–474.

Korth, C., May, B. C., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B. (2001) Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 9834–9841.

Kretzschmar, H. A., Neumann, M., Riethmüller, G. und Prusiner, S. B. (1992) Molecular cloning of a mink prion protein gene. *J. Gen. Virol.* **73**, 2757–2761.

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

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

Ladogana, A., Casaccia, P., Ingrosso, L., Cibati, M., Salvatore, M., Xi, Y. G., Masullo, C. und Pocchiari, M. (1992) Sulphate polyanions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters. *J. Gen. Virol.*, **73**, 661–665.

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

Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Demainay, R., Adjou, K. T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J. und Hauw, J. J. (1996) BSE transmission to macaques. *Nature*, **381**, 743–744.

Le Coutre, P., Mologni, L., Cleris, L., Marchesi, E., Buchdunger, E., Giardini, R., Formelli, F. und Gambacorti-Passerini, C. (1999) *In vivo* eradication of human BDR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **91**, 163–168.

Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H.-O. B., Riesner, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B. (2004) Synthetic Mammalian Prions. *Science*, **305**, 673–676.

Llewelyn, C. S., Hewitt, P. E., Knight, R. S., Amar, K., Cousens, S., Mackenzie, J. und Will, R. G. (2004) Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet*, **363**, 417–421.

Lopez Garcia, F., Zahn, R., Riek, R. und Wuthrich, K. (2000) NMR structure of the bovine prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 8334–8335.

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

Ma, J. und Lindquist, S. (2001) Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 14955–14960.

Ma, J. und Lindquist, S. (2002) Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP^{Sc}-like conformation in the cytosol. *Science*, **298**, 1785–1788.

Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J. Klohn, P. C., Brandner, S. und Collinge, J. (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science*, **302**, 871–874.

Manuelidis, L., Valley, S. und Manuelidis, E. E. (1985) Specific proteins associated with Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie share antigenic and carbohydrate determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 4263–4267.

Masters, C., L., Gajdusek, D. C. und Gibbs, C. J. Jr. (1981) Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain*, **104**, 535–558.

McGowan, J. P. (1914) Investigation into the disease of sheep called „scrapie“ with special reference to its association with sarcosporidiosis. Rept. 223, Edinburgh and East of Scotland College of Agriculture. Blackwood, Edinburgh.

McKnight, S. und Tjian, R. (1986) Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell*, **46**, 795–805.

Meier, P., Genoud, N., Prinz, M., Rüllicke, 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.

Mellon, P. L., Windle, J. C., Goldsmith, P. C., Padula, C. A., Roberts, J. L. und Weiner, R. I. (1990) Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron*, **5**, 1–10.

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

Myslinski, E., Arne, J. C., Krol, A. und Carbon, P. (2001) An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2502–2509.

Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Freidländer, G. und Taraboulos, A. (1997) Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J. Biol. Chem.*, **272**, 6324–6331.

Negro A., Meggio, F., Bertoli, A., Roberto, B., Sorgato, M. C. und Pinna, L. A. (2000) Susceptibility of the Prion Protein to Enzymic Phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **271**, 337–341.

Netzer, W. J., Dou, F., Cai, D., Veach, D., Jean, S., Li, Y., Bornmann, W. G., Clarkson, B., Xu, H. und Greengard, P. (2003) Gleevec inhibits beta-amyloid production but not Notch cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 12444–12449.

Nunziante, M., Gilch, S. und Schätzl, H. M. (2003) Prion diseases: from molecular biology to intervention strategies. *Chembiochem*, **4**, 1268–1284.

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**, 735–746.

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 Lett.*, **538**, 96–100.

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

Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J. und Conklin, D. S. (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.*, **16**, 948–958.

Palmer, M. S., Dryden, A. J., Hughes, J. T. und Collinge, J. (1991) Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, **1**, 51–52.

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

Parchi, P., Castellani, R., Capellari, S., Ghetti, B., Young, K., Chen, S. G., Farlow, M., Dickson, D. W., Sima, A. A., Trojanowski, J. Q., Petersen, R. B. und Gambetti, P. (1996) Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.*, **39**, 767–778.

- Pattison, I. H. und Jones, K. M.** (1968) Modification of a strain of mouse-adapted scrapie by passage through rats. *Res. Vet. Sci.*, **9**, 408–409.
- Pauly, P. C. und Harris, D. A.** (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J. Biol. Chem.*, **273**, 33107–33110.
- Peden, A. H., Head, M. W., Ritchie, D. L., Bell, J. E. und Ironside, J. W.** (2004) Preclinical vCJD after blood transfusion in a *PRNP* codon 129 heterozygous patient. *The Lancet*, **364**, 527–529.
- Peretz, D., Williamson, R. A., Kaneko, L., Vergara, J., Leclerc, E., Schmitt-Ulms, G., Mehlhorn, I. R., Legname, G., Wormald, M. R., Rudd, P., M., Dwek, R., A., Burton, D., R. und Prusiner, S. B.** (2001) Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature*, **412**, 739–743.
- Petzer, A. L., Gunsilius, E., Hayes, M., Stockhammer, G., Duba, H. Ch., Schneller, F., Grünewald, K., Poewe, W. und Gastl, G.** (2002) *In vivo* release of vascular endothelial growth factor from colorectal carcinomas. *J. of Haematol.*, **117**, 623–625.
- Pergami, P., Jaffe, H. und Safar, J.** (1996) Semipreparative chromatographic method to purify the normal cellular isoform of the prion protein in nondenatured form. *Anal. Biochem.*, **236**, 39–47.
- Proske, D., Gilch, S., Wopfner, F., Schätzl, H. M., Winnacker, E. L. und Famulok, M.** (2002) Prion-protein-specific aptamer reduces PrP^{Sc} formation. *Chembiochem*, **3**, 717–725.
- Prusiner, S. B.** (1982) Novel proteinaceous particles cause scrapie. *Science*, **216**, 136–144.
- Prusiner, S. B.** (1997) Prion diseases and the BSE crisis. *Science*, **278**, 245–251.
- Prusiner, S. B.** (1998) Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 13363–13383.
- Prusiner, S. B.** (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science*, **252**, 1515–1522.
- Prusiner, S. B. und McKinley, M. P. eds.** (1987) Prions: Novel Infectious Pathogens Causing Scrapie and Creutzfeldt-Jakob Disease. San Diego: Academic.
- Prusiner, S. B., Groth, D. F., Bolton, D. C., Kent, S. B. und Hood, L. E.** (1984) Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell*, **38**, 127–134.
- Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Groth, D. F., Bowman, K. A., Mock, N. I., Cochran, S. P. und Masiarz, F. R.** (1981) Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 6675–6679.
- Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirinda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D. und Carlson, G. A.** (1990) Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, **63**, 673–686.

- Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmezas, C. I. und Weiss, S.** (1997) The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat. Med.*, **3**, 1383–1388.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. und Wuthrich, K.** (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121–231). *Nature*, **382**, 180–182.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R. und Wuthrich, K.** (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23 – 231). *FEBS Lett.*, **413**, 2882–288.
- Robakis, N. K., Devine-Gage, E. A., Jenkins, E. C., Kascsak, R. J., Brown, W. T., Krawczun, M. S. und Silverman, W. P.** (1986) Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the p arm of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **140**, 758–765.
- Roskoski, R. Jr.** (2003) STI-571: an anticancer protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **309**, 709–17.
- Rother, K. I., Clay, O. K., Bourquin, J. P., Silke, J. und Schaffner, W.** (1997) Long non-stop reading frames on the antisense strand of heat shock protein 70 genes and prion protein (PrP) genes are conserved between species. *Biol. Chem.*, **378**, 1521–1530.
- Rowley, J. D.** (1973) A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine and Giemsa staining. *Nature*, **243**, 290–293.
- Satoh, J., Kuroda, Y. und Katamine, S.** (2000) Gene expression profile in prion protein-deficient fibroblasts in culture. *Am. J. Pathol.*, **157**, 59–68.
- Sawyers, C. L., McLaughlin, J., Goga, A. L., Havlik, M. und Witte, O. N.** (1994) The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell*, **77**, 121–131.
- Schätzl, H. M., Laszlo, L., Holtzman, D. M., Tatzelt, J., Weiner, R. I., Mobley, W. und Prusiner, S. B.** (1997) A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J. Virol.*, **71**, 8821–8831.
- Schätzl, H. M., Da Costa, M., Taylor, L., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B.** (1995) Prion protein gene variation among primates. *J. Mol. Biol.*, **254**, 362 – 374.
- Scott, M. R., Groth, D., Foster, D., Torchia, M., Yang, S. L., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B.** (1993) Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell*, **73**, 979–988.
- Scott, M. R., Köhler, R., Foster, D. und Prusiner S. B.** (1992). Chimeric prion protein expression in cultures cells and transgenic mice. *Protein Sci.*, **79**, 986–997.
- Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S. J. et al.** (1989) Transgenic mice expressing

hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell*, **59**, 637–644.

Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blattler, T., Brandner, S., Gotz, J., Rulicke, T., Flechsig, E., Cozzio, A. und von Mering, C. (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell*, **93**, 203–214.

Sigurdson, B. (1954) Rida, a chronic encephalitis of sheep with general remarks of infections which develop slowly and some of their special characteristics. *Br. Vet. J.*, **110**, 341–354.

Sigurdsson, E. M., Brown, D. R., Daniels, M., Kasczak, R., Carp, R., Meeker, H. C., Fragione, B. und Wisniewski, T. (2002) Immunisation delays the onset of prion disease in mice. *Am. J. Pathol.*, **161**, 13–17.

Soto, C., Kascak, R. J., Saborio, G. P., Aucouturier, P., Wisniewski, T., Prelli, F., Kasczak, R., Mendez, E., Harris, D. A., Ironside, J., Tagliavini, F., Carp, C. I. und Frangione, B. (2000) Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides. *Lancet*, **355**, 192–197.

Sparkes, R. S., Simon, M., Cohn, V. H., Fournier, R. E., Lem, J., Klisak, I., Heinzmann, C., Blatt, C., Lucero, M., Mohandas, T. et al. (1986) Assignment of human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 7358–7362.

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

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 spectroscopy and amino acid sequencing. *Biochemistry*, **32**, 1991–2000.

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

Stockel, J., Safar, J., Wallace, A. C., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B. (1998) Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry*, **37**, 7185–7193.

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

Sui, G., Soohoo, C., Affar, E. B., Gay, F., Shi, Y., Forrester, W. C. und Shi, Y. (2002) A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** (8), 5515–5520.

Supattapone, S., Nguyen, H.-O. B., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. und Scott, M. R. (1999) Elimination of prion by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 14529–14535.

Supattapone, S., Wille, H., Uyechi, L., Safar, J., Tremblay, P., Szoka, F. C., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. und Scott, M. R. (2001) Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. *J. of Virol.* **75**, 3453–3461.

Taraboulos, A., Serban, D. und Prusiner, S. B. (1990) Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. *J. Cell. Biol.*, **110**, 2117–1232.

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**, 121–132.

Tateishi, A., Brown, T., Ktamoto, T., Hoque, Z. M., Roos, R., Wollman, R., Cevenokova, L. und Gajdusek, D. C. (1995) First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature*, **376**, 434–435.

Tatzelt, J., Prusiner, S. B. und Welch, W. J. (1996) Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J.*, **15**, 6363–6373.

Telling, G. C., Scott, M., Hsiao, K. K., Foster, D., Yang, S. L., Torchia, M., Sidle, K. C., Collinge, J., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B. (1994) Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 9936–9940.

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.

Telling, G. C., DeArmond, S. J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P. und Prusiner, S. B. (1996) Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagation prion diversity. *Science*, **274**, 2079–2082.

Tilly, G., Chapuis, J., Vilette, D., Laude, H. und Vilotte, J. L. (2003) Efficient and specific down-regulation of prion protein expression by RNAi. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **305**, 548–551.

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

Tuveson, D. A., Willis, N. A., Jacks, T., Griffin, J. D., Singer, S., Fletcher, C. D., Fletcher, J. A. und Demetri, G. D. (2001) STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications. *Oncogene*, **20**, 5054–5058.

Van Etten, R. A. (1999) Cycling, stressed out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends in Cell Biol.*, **9**, 179–186.

Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nicon, 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 14945–14949.

Weissmann, C., Raeber, A. J., Montrasio, F., Hegyi, I., Frigg, R., Klein, M. A. und Prusiner, S. B. (2001) Prions and the lymphoreticular system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **356**, 177–184.

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

Wen, S.-T., Jackson, P. K. und Van Etten, R. A. (1996) The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products. *EMBO J.*, **15**, 1583–1595.

Westaway, D., Cooper, C., Turner, S., Da Costa, M., Carlson, G. A. und Prusiner, S. B. (1994) Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 6418–6422.

Westaway, D., Goodman, T. A., Mirenda, C. A., McKinley, M. P., Carlson, G. A. und Prusiner, S. B. (1987) Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell*, **51**, 651–662.

White, A. R., Enever, P., Tayebi, M., Mushens, R., Linehan, J., Brandner, S., Anstee, D. und Collinge J. (2003) Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature*, **422**, 80–83.

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

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

Will, R.G. (1998) New variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Dev. Biol. Stand.*, **93**, 17–84.

Wille H., Michelitsch, M. D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F. E., Agard, D. A. und Prusiner, S. B. (2002) Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 3563–3568.

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

Windl, O., Dempster, M., Estibeiro, T. und Lathe, R. (1995) A candidate marsupial PrP gene reveals two domains conserved in mammalian PrP proteins. *Gene*, **159**, 181–186.

Winklhofer, K. F. und Tatzelt, J. (2000) Cationic lipopolyamines induce degradation of PrP^{Sc} in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.*, **381**, 463–469.

Wong, B. S., Pan, T., Liu, T., Li, R., Petersen, R. B., Jones, I. M., Gambetti, P., Brown, D. R. und Sy, M. S. (2000) Prion disease: A loss of antioxidant function? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**, 249–252.

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

Wyatt, J. M. et al. (1990) Spongiform encephalopathy in a cat. *Vet. Rec.*, **126**, 513.

Yu, J. C., Lokker, N. A., Hollenbach, S., Apatira, M., Li, J., Betz, A., Sedlock, D., Oda, S., Nomoto, Y., Matsuno, K., Ide, S., Tsukuda, E. und Giese, N. A. (2001) Efficacy of the novel selective platelet derived growth factor receptor antagonist CT52923 on cellular proliferation, migration, and suppression of neointima following vascular injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **298**, 1172–1178.

Yuan, Z. M., Huang, Y., Whang, Y., Sawyers, C., Weichselbaum, R., Kharbanda, S. und Kufe, D. (1996) Role of c-Abl tyrosine kinase in growth arrest response to DNA damage. *Nature*, **382**, 272 – 274.

Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wieder, G. und Wuthrich, K. (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 145–150.

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

Zigas, V. (1981) Letter to Gunther. In: Farquhar, J., from the collection of D. Carlton Gajdusek. Raven Press, New York, NY, pp.1.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Über die gebräuchlichen AI- und IUPAC-Einheiten hinausgehend wurden die folgenden Abkürzungen verwendet:

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
Bisacrylamid	N,N'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
C	Cytidin
cDNA	komplementäre DNA
CJD	Creutzfeldt-Jakob Erkrankung
cpm	Zählereignisse pro Minute
CWD	chronic wasting disease (chronisch zehrende Erkrankung)
Cys	Cystein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäuree
<i>et al.</i>	et altera (und andere)
FCS	fötales Kälberserum
FFI	fatale familiäre Insomnie
FSE	feline spongiforme encephalopahtie
G	Guanosin
Glu	Glutamat

Gly	Glycin
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
IC ₅₀	Nötige Konzentration einer Substanz, um eine 50 %ige Inhibition zu bewirken (Inhibitory concentration)
iCJD	iatrogene CJD
<i>in vitro</i>	in Zellkultur/Reagenzglas
<i>in vivo</i>	am Lebenden
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
mRNA	Messenger RNA / Boten RNA
MEM	Minimum Essential Medium
Met	Methionin
NCS	neugeborenen Kälberserum
PBS	Phosphate Buffered Saline / Phosphat gepufferte Salzlösung
Phe	Phenylalanin
pH-Wert	negativer-dekadischer-Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration (pro Hydrogeni)
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
RNase	Ribonuklease
sCJD	spontane CJD
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
siRNA	small interfering RNA
SV40	Simian Virus 40
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer

TME	transmissible mink encephalopathy
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathie
Tyr	Tyrosin
U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
U	Uracil
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Val	Valin
vCJD	variante CJD
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Ertmer
Vorname: Alexa
Anschrift: Von-Millau-Straße 12
85604 Zorneding
Geburtsdatum: 08. November 1974
Geburtsort: Ludwigshafen / Rhein
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1980–1984 Dietrich Bonhoeffer Grundschule in 76646 Bruchsal
1984–1993 St. Paulusheim Gymnasiums in 76646 Bruchsal
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1993–1995 Studium des Diplom-Übersetzers am Fachbereich Angewandte Sprachwissenschaft der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz in Gernersheim; Fächer: Französisch, Russisch, Italienisch;

1995–1999 Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg, Hauptfach: Molekularbiologie, Nebenfächer: Zellbiologie und Immunologie

1999–2000 Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Guntram Suske mit dem Titel: „Die inhibitorische Domäne von SP3: Identifizierung und Analyse des zentralen IKEE-Motivs.“
Abschluss: Diplom-Humanbiologin

2000–2001 Promotion am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg.

2001–2004 externe Promotion an der Philipps-Universität Marburg. Betreuung der Promotion durch Prof. Dr. Guntram Suske vom Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung. Durchgeführt am Max-von-Pettenkofer-Institut der Ludwigs-Maximilians-Universität München (bis 2002) bzw. am Institut für Virologie der Technischen Universität München (ab 2002) unter der Leitung von Prof. Dr. Hermann. M. Schätzl,

München, den

Alexa Ertmer

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Aumüller, Aurich, Banet, Barth, Beato, Besedovsky, Braun, Brüne, Brüsselbach, Daut, Dressler, Del Rey, Eilers, Elsässer, Feuser, Frenking, Fruhstorfer, Garten, Gemsa, Grzeschik, Habermehl, Hartmann, Hasilik,, Jungclas, Kastner, Kadenbach, Kern, Kirchner, Klug, Knöllner, Koch, Koolman, Kunz, Lammel, Lang, Löffler, Lorbert, Löw, Lill, Lührmann, Mandrek, Mannerz, Mazumda, Mc Gregor, Meinart, Meißner, Melsheimer, Müller, Münt, Niesing, Paul, Röhm, Rogausch, Schachtschabel, Schäfer, Schulz, Schwee, Sedlacek, Seifart, Seitz J., Seitz K. A., Siegel, Steininger, Steinmetz, Suske, Voigt, von Löw. Wagner, Waßmuth, Weseman, Westermann, Westphal.

Mein akademischer Lehrer in München war Herr Schätzl

Meine akademischen Lehrer in Germersheim/Mainz waren die Damen und Herren:

Andres, Bauske, Bielawska-Ellermeier, Burckhardt, Ellermeier, Endell-Steiert, Fein, Kobro, Pélégry, Picard, Rathje, Reinard, Salnikow-Ritter, Sattel, Schunck, Stahl, Tonard, Torka, Wegner, Weis, Westenfelder-Straub

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Veröffentlichungen

1. Gilch, S., Nunziante, M., Ertmer A., Wopfner, F., Laszlo, L. und Schätzl, H. M. (2004) Recognition of luminal prion protein aggregates by post-ER quality control mechanisms is mediated by the prooctarepeat region of PrP. *Traffic*, **5**, 300–313.

2. Ertmer, A., Gilch, S., Yun S.W., Flechsig, E, Klebl, B., Stein-Gerlach, M., Klein, M. A. und Schätzl, H. M. (2004) The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrP^{Sc} in prion-infected cells. *J. Biol. Chem.*, **279**, 41918–41927.

Kongressbeiträge in Form eines Vortrages:

Biomed-2 Collaborators' Meeting, 28. Juni – 01. Juli 2002, London;

Alexa Ertmer, Sabine Gilch, Hermann Schätzl;

Abolishing PrP^{Sc} propagation by a tyrosine kinase inhibitor.

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 26. – 29. März 2003, Berlin;

Alexa Ertmer, Sabine Gilch, Hermann, M. Schätzl;

An inhibitor of a signaling cascade can cure prion infected cells.

Treffen des Bayrischen Forschungsverbundes Prionen (ForPrion), 10. – 11 Juli 2003, München;

Alexa Ertmer, Sabine Gilch, Hermann M. Schätzl;

Interferenz mit Signaltransduktionswegen als therapeutischer Ansatz bei Prion-Infektionen.

Kongressbeiträge in Form eines Posters:

International Conference, Prion diseases: from basic research to intervention concepts, 08. – 10. Oktober 2003, München;

Alexa Ertmer, Sabine Gilch, Hermann, M., Schätzl;

An inhibitor of a signaling cascade can cure prion infected cells.

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 17. – 20. März 2004, Tübingen;

Alexa Ertmer, Sabine Gilch, Hermann, M. Schätzl;

The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrP^{Sc} in prion-infected cells.

ConVir 2004, 3rd European Conference on Viral Diseases, 14. – 16. Mai 2004, Regensburg;

Alexa Ertmer, Sabine Gilch, Hermann, M. Schätzl;

The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrP^{Sc} in prion-infected cells.

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 16. – 19. März 2005, Hannover;

Alexa Ertmer, Sabine Gilch, Eckhard Flechsig, Hermann, M. Schätzl;

Inhibition of c-Abl expression by siRNA leads to a reduction of PrP^{Sc} in prion-infected neuroblastoma cells.

Treffen des Bayrischen Forschungsverbundes Prionen (ForPrion), 04. – 05. Juli 2005, Hohenkammer;

Alexa Ertmer, Sabine Gilch, Eckhard Flechsig, Hermann, M. Schätzl;

Inhibition of c-Abl expression by siRNA leads to a reduction of PrP^{Sc} in prion-infected neuroblastoma cells.

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Hermann M. Schätzl für die Vergabe des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung, Unterstützung und Förderung während der gesamten Arbeit und für sein mir entgegengebrachtes Vertrauen.

Für die Betreuung aus Marburg, die es mir ermöglicht hat, meine Promotion am Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg durchzuführen, möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Guntram Suske bedanken.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. „Pi“ Elsässer für die Ratschläge und die Unterstützung aus der Ferne.

Ebenso möchte ich Iris Rohner für die seelische Stütze danken, die sie mir in schweren Zeiten gewesen ist, sowie Heike Göllner für ihre „Starthilfe“.

Mein Dank geht an alle Mitarbeiter der Diagnostik für das reibungslose Zusammenleben und –arbeiten am Biederstein. Insbesondere an Doris Pelz für das hervorragende Jonglieren mit und dem klaren Durchblick in allen Verwaltungsangelegenheiten und an Kata Masic für die rührende Sorge um unser aller Wohl.

Von ganzem Herzen danken möchte ich allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für das freundschaftliche Klima und die tolle Zusammenarbeit, insbesondere „Claude“ Kehler für die liebevolle Pflege meiner Zellen in meiner Abwesenheit sowie Sabine Gilch und Max Nunziante für das eifrige Korrekturlesen.

Mein ganz besonderer Dank geht an Sabine Gilch für einfach alles.

Mein letzter und inniger Dank gehört Stephan Lichter für den Rückhalt, den er mir gibt, seine endlose Geduld und seine Unterstützung.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die an dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel “Interferenz in Signaltransduktionswege als therapeutischer Ansatz bei Prionkrankheiten“ unter der Betreuung durch Prof. Dr. Hermann. M. Schätzl am Institut für Virologie der Technischen Universität München und unter der Leitung von Prof. Dr. Guntram Suske vom Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Teile der vorliegenden Arbeit wurden in verschiedenen Publikationsorganen veröffentlicht.

München, den

Alexa Ertmer