

7. ZUSAMMENFASSUNG

Scrapie ist eine neurodegenerative Erkrankung, die sich durch die Ablagerung von fehlgefaltetem, pathologischem Prion-Protein, dem sogenannten PrP^{Sc}, im zentralen (und peripheren) Nervengewebe auszeichnet. Die Funktion des normalen, zellulären Prion-Proteins (PrP^C) ist noch immer teilweise ungeklärt, jedoch konnte in *in vitro* Experimenten gezeigt werden, daß PrP^C Kupfer bindet und somit eventuell eine Rolle im zellulären Kupfer Haushalt spielt. Dies wiederum könnte möglicherweise mit der Neurotoxizität der Krankheit in Verbindung stehen. Da die überwiegende Mehrheit von Studien an terminal erkrankten Tieren durchgeführt wurde, sind die molekularen Ereignisse, die der Familie der Prion Erkrankungen zugrunde liegen, besonders zu frühen, präklinischen Zeitpunkten, noch immer weitgehend unverstanden. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die chemische Zusammensetzung auf zellulärer Ebene in Scrapie-infiziertem Nervengewebe über den Gesamtverlauf der Krankheit zu untersuchen, und eventuell Prion-Protein induzierte molekulare Veränderungen zu detektieren. Um dies zu erreichen wurde eine Zeitverlaufsstudie mit insgesamt 39 Tieren (24 infizierten und 15 Kontrollen) durchgeführt. Dabei wurden fünf verschiedene Zeitpunkte untersucht: 70 Tage nach Infektion (days post infection, dpi), 100 dpi, 130 dpi, bei Auftreten erster klinischer Symptome (first clinical signs, fcs, ~145 dpi) und bei Erreichen des terminalen Stadiums (~180 dpi). Das fehl gefaltete Prionprotein und seine Verteilung in Spinalganglien wurden einerseits mit Hilfe der Immunhistochemie zum Nachweis von PrP^{Sc} ermittelt, und andererseits die Sekundärstruktur mittels Fourier Transform Infrarotmikrospektroskopie untersucht. Des Weiteren wurde der Gehalt und die Verteilung von Spurenelementen, wie Kupfer, Eisen und Zink an sequenziellen Schnitten derselben Spinalganglien mit Hilfe der Röntgenfluoreszenzmikrospektroskopie ermittelt. Die Ergebnisse zeigten deutliche Änderungen der Sekundärstrukturverteilung der Proteine im infizierten Gewebe zu präklinischen Zeitpunkten. Im Einzelnen wiesen die Neuronen von Scrapie-infizierten Tiere einen signifikant erhöhten Proteingehalt auf, wobei sie, ebenfalls signifikant, weniger β -Faltblatt reiche Proteine als die Kontroll-Tiere zeigten. Regionen mit erhöhtem β -Faltblatt Anteil in frühen Stadien der Krankheit wurden ausschließlich im Bereich der Plasmamembran detektiert. Im Verlauf der Pathogenese erhöhte sich der relative Anteil an β -Faltblatt reichen Proteinen in den neuronalen Zellen der infizierten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen signifikant. Ein Vergleich mit

denselben, anschließend immungefärbten Gewebeschnitten bestätigte, dass die detektierte Zunahme zumindest teilweise durch die Zunahme von pathologischem Prion-Protein verursacht war. Es konnte daher geschlußfolgert werden, dass die detektierten spektralen Veränderungen möglicherweise spezifisch für die Prionenerkrankung Scrapie sind. Ferner wurde festgestellt, dass im terminalen Stadium die Protein Expression signifikant erniedrigt ist, wahrscheinlich aufgrund des bereits induzierten Zelltodes. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine Überexpression von Proteinen mit geringem Anteil an β -Faltblatt charakteristisch zu sein scheint für das präklinische Stadium von Scrapie. Während der Pathogenese wird zelluläres PrP^C schließlich in PrP^{Sc} umgewandelt, wahrscheinlich zusammen mit der Umwandlung oder Auswechslung weiterer α -Helix reicher Proteine zu bzw. gegen β -Faltblatt reichen Proteinen. Die dramatischen Änderungen gerade in den asymptomatischen Tieren betont die Wichtigkeit, diese Proteine molekular zu identifizieren, um einerseits diese Art von Erkrankungen besser zu verstehen und andererseits eventuelle TSE Diagnostik- und Behandlungsmöglichkeiten voranzutreiben.

Zusätzlich zu den Spinalganglien, die dem peripheren Nervengewebe zugehörig sind, wurden Hirne von 70 Tage infizierten Tieren mit Hilfe der Synchrotron IR Mikrospektroskopie untersucht. Bereits zu diesem sehr frühen Zeitpunkt wurden signifikante Unterschiede im Fingerprint Bereich des Spektrums detektiert, die auf molekulare Änderungen der Zusammensetzung in Nukleinsäuren, Kohlenhydraten oder Phospholipiden hindeuten. Ähnlich wie bei den Spinalganglien zeigten zwei der insgesamt fünf untersuchten infizierten Tiere einen verringerten Anteil an β -Faltblatt zusammen mit einem leicht erhöhten Anteil an Gesamtprotein im Gewebe des DMNV. Die Ergebnisse der Röntgenfluoreszenzmikrospektroskopie wiesen auf eine Rolle von Spurenelementen in der Pathogenese von Prion Erkrankungen hin. Anhand der Kontrolltiere konnte die normale, physiologische Verteilung der Spurenelemente ermittelt werden. Demnach sind Kupfer, Zink, Mangan und Phosphor hauptsächlich intrazellulär, während Eisen und Kalzium in höchsten Konzentrationen extrazellulär vorhanden sind. Ferner wurde gezeigt, dass die physiologische Konzentration von Phosphor etwa das Zehnfache der von Kalzium ist, welches wiederum ungefähr zweimal so hoch konzentriert vorliegt wie Eisen. Die Kupfer und Zink Konzentrationen sind ungefähr 2-3 mal kleiner als Eisen aber immer noch doppelt so hoch wie Mangan, welches die niedrigste Konzentration aller untersuchten Elemente aufwies. Im terminalen Stadium konnte in den infizierten Zellen eine Zunahme an

Kupfer, Zink, Eisen, Kalzium und Mangan festgestellt werden, bzw. führte die Krankheit dazu, dass diese Elemente nicht, wie in den Kontrollen beobachtet, altersbedingt abnahmen. Im präklinischen Stadium lagen alle Spurenelemente in ungefähr gleichen Mengen in den infizierten Tieren den Kontrollen vor, einzig Kalzium war deutlich vermindert im Vergleich zur Kontrolle. Dies läßt auf eine Beteiligung von Kalzium in frühen Stadien von Scrapie schließen, eventuell als Folge seiner Freisetzung aus intrazellulären Speichern während früher apoptotischer Ereignisse.

Um die Spezifität der Scrapie induzierten spektralen Veränderungen zu bestimmen, wurden Spektren von Spinalganglien terminal an 263K Scrapie erkrankter Hamster mit denen von ME7 Scrapie infizierten Tieren verglichen. Ferner wurden spektrale Änderungen im DMNV des Hirnes von 263K infizierten Tieren mit denen von Reovirus infizierten neugeborenen Hamstern verglichen. Reovirus T3C9 induziert eine letale Enzephalitis im Hirn von neonatalen aber nicht adulten Tieren und erreicht als erste Struktur im Hirn, analog zu 263K Scrapie, den DMNV. Zunächst konnte festgestellt werden, dass der DMNV von Reovirus infizierten Tieren spektrale Änderungen in der gleichen spektralen Region aufwies wie die 263K Scrapie infizierten Tiere. Allerdings könnte das ausschließliche in den Scrapie-infizierten Tieren auftretende Signal bei $\sim 1050\text{ cm}^{-1}$, welches auf Änderungen in Kohlehydraten hindeutet, spezifisch für diese Krankheit sein. Der Vergleich der spektralen Veränderungen in Spinalganglien von Tieren, die mit zwei unterschiedlichen Scrapie Stämmen infiziert wurden, zeigte ebenfalls distinkte spektrale Merkmale. Zum einen wiesen beide Stämme einen signifikant erhöhten Anteil an β -Faltblatt auf, ME7 allerdings mehr als 263K. Da die Western Blot Analysen nicht zeigten, dass die ME7 infizierte Tiere einen höheren Anteil an PrP^{Sc} besitzen, kann geschlossen werden, dass noch weitere Proteine neben dem Prion-Protein im Verlauf der Pathogenese vermehrt auftreten, und zwar bei ME7 in einem größeren Ausmaß als bei 263K infizierten Tieren. Darüber hinaus induzierten beide Stämme spektrale Veränderungen, die auf Unterschiede im Lipid Haushalt hindeuteten, und auch hier wiederum stärker ausgeprägt in den ME7 infizierten Tieren. Während Änderungen im Lipid und Amid Bereich bei beiden Stämmen in die gleiche Richtung zeigten und nur in ihrem Ausmaß variierten, konnte im Fingerprint Bereich des Spektrums festgestellt werden, dass die Proben ME7 und 263K infizierter Tiere gegensätzliche Änderungen in den Peak Intensitäten bei etwa 1238 cm^{-1} und 1084 cm^{-1} zeigten. Offensichtlich führt

die Infektion mit verschiedenen Scrapie Stämmen zu unterschiedlichen spektralen Mustern im Fingerprint Bereich des Spektrums, was auf Unterschiede in Nukleinsäuren, Kohlenhydraten, Phospholipiden oder anderen Molekülgruppen hindeutet. Die Daten weisen daher darauf hin, dass die detektierten spektralen Profile auch auf Stamm-Ebene spezifisch sein könnten.