

Rolle von Chemokinen und Scavenger-Rezeptoren in der Scrapie-Pathogenese

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Theresa Bamme
aus Erlangen

Berlin, Juni 2008

Tag der Promotion: 22.09.2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Mielke
2. Gutachter: Prof. Dr. Multhaup

Die Doktorarbeit wurde am Robert-Koch-Institut in Berlin in der Arbeitsgruppe „Neurodegenerative Erkrankungen“ unter der Leitung von Dr. Michael Baier im Zeitraum von April 2003 bis Juni 2008 angefertigt.

meiner Schwester gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 TSE bei Säugetieren	1
1.2 TSE beim Menschen	3
1.3 Eigenschaften des Erregers	4
1.3.1 Das zelluläre Prionprotein PrP ^C und seine pathologische Isoform PrP ^{Sc}	4
1.4 Pathogenese von TSE	7
1.4.1 Pathogenese in der Peripherie und Neuroinvasion	7
1.4.2 Pathogenese im ZNS	7
1.5 Diagnostik von TSE-Erkrankungen	9
1.6 Scavenger Rezeptoren	10
1.6.1 CD36	11
1.6.2 SR-A	12
1.7 Chemokine	13
1.7.1 CXCL13	14
1.8 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Material	16
2.1 Allgemeine Materialien und Bezugsquellen	16
2.1.1 Versuchstiere	16
2.1.2 Scrapie-Stamm	16
2.1.3 Zelllinien	16
2.1.4 <i>E.coli</i> -Stämme	16
2.1.5 Chemikalien	17
2.1.6 Fertigkits	18
2.1.7 Enzyme und Proteine	19
2.1.8 Sonstige Materialien	19
2.2 Puffer und Lösungen	20
2.2.1 Selbsthergestellte Puffer und Lösungen	20
2.2.2 Fertiglösungen	21
2.3 Antikörper, Konjugate und Substrate	21
2.4 Medien	22
2.4.1 Medien zur Kultivierung von <i>E.coli</i>	22
2.4.2 Medien zur Kultivierung von SNB19-Zellen	23
2.4.3 Medien zur Kultivierung von Follikulären Dendritischen Zellen (FDC's)	23
2.5 Plasmide und Plasmidkonstruktionen	23

2.6 Oligonukleotid-Primer	23
2.7 Geräte	25
3 Methoden	27
3.1 Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit infektiösem Material	27
3.2 Tierversuch	27
3.2.1 Tierhaltung	27
3.2.2 Infektion, Diagnostik und Tötung der Versuchstiere	27
3.2.3 Statistik	28
3.3 Immunhistochemie	28
3.3.1 Gewebefixierung	28
3.3.2 Anfertigung von Gewebeschnitten	28
3.3.3 ABC-Methode (<u>A</u> vidin- <u>B</u> iotin- <u>C</u> omplex)	29
3.3.4 Verwendung von Fluoreszenz-Antikörpern	29
3.3.5 Verwendung von Thioflavin-S	30
3.3.6 Hämalaun-Eosin(HE)-Übersichtsfärbung	30
3.3.7 Immunhistochemische Färbemethoden an Paraffinschnitten	30
3.3.7.1 Nachweis aktivierter Astrozyten (GFAP)	30
3.3.7.2 Nachweis aktivierter Mikroglia (Iba-1)	31
3.3.7.3 Paraffin-Embedded Tissue Blot (PET-Blot)	31
3.3.8 Immunhistochemische Färbemethoden an Kryoschnitten	32
3.3.8.1 Nachweis von CXCL13 (BLC) im ZNS	32
3.3.8.2 CXCL13-GFAP-Doppelmarkierung	32
3.3.8.3 CXCL13-Thioflavin-Doppelmarkierung	32
3.3.8.4 Nachweis von CD36 im ZNS	33
3.3.8.5 CD36-GFAP-Doppelmarkierung	33
3.3.8.6 Nachweis von SR-A im ZNS	33
3.3.8.7 SR-A-GFAP-Doppelfärbung	34
3.3.9 Auswertungsmethoden für Histologie und Immunhistochemie	34
3.4 Molekularbiologische Methoden	34
3.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren	34
3.4.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> (analytischer und präparativer Maßstab)	34
3.4.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Gewebe	35
3.4.1.3 Isolierung von RNA aus Gewebe	35
3.4.2 Aufreinigung von RNA und cDNA-Synthese	35
3.4.2.1 Reinigung der Gesamt-RNA von genomischer DNA	35
3.4.2.2 Aufreinigung der Gesamt-RNA	36
3.4.2.3 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA	36

3.4.3 Amplifikation von DNA	36
3.4.3.1 Amplifikation von DNA über Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.4.3.2 Ganz-Zell-PCR aus <i>E.coli</i>	38
3.4.4 Quantitative real-time PCR	38
3.4.5 Klonierung von DNA	40
3.4.5.1 Dephosphorylierung von DNA	40
3.4.5.2 Ligation von DNA-Fragmenten	40
3.4.5.3 Eluieren von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	40
3.4.6 Transformation elektrokompenter <i>E.coli</i> -Zellen	40
3.4.7 Analyse von DNA und RNA	41
3.4.7.1 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration	41
3.4.7.2 Restriktions-Analyse von DNA	41
3.4.7.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	41
3.4.7.4 Auftrennung von RNA durch denaturierende Formaldehyd-Gelelektrophorese	42
3.4.7.5 Transfer und Detektion von RNA auf Membranen (Northern Blot)	42
3.4.7.5.1 Transfer von RNA (Northern Blot)	42
3.4.7.5.2 Herstellung radioaktiver Sonden	42
3.4.7.5.3 Hybridisierung	43
3.4.7.5.4 Wiederverwendung von Northern Blot-Filtern durch Strippen	43
3.5 Proteinbiochemie	43
3.5.1 Analyse von Proteinen	43
3.5.1.1 Herstellung von Homogenaten aus Gehirn und Milz	43
3.5.1.2 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
3.5.1.3 Transfer und Detektion von Proteinen auf Membranen (Western Blot)	44
3.5.1.3.1 Transfer von Proteinen (Western Blot)	44
3.5.1.3.2 Detektion von Prion-Protein PrP ^{Sc}	45
3.5.1.4 Immunpräzipitation von PrP ^{Sc} mit dem Antikörper 15B3	45
3.5.1.5 Detektion von Proteinen durch ELISA	46
3.5.1.6 Detektion von PrP ^{Sc} in Dendritischen Zellen mittels Western Blot	46
3.6 Zellkultur	46
3.6.1 Kultivierung von SNB19-Zellen	46
3.6.2 Transfektion von SNB19-Zellen	47
3.6.3 Herstellung und Kultivierung von dendritischen Zellen aus Mäusen	48
3.6.4 Infektion von dendritischen Zellen mit PrP ^{Sc}	49
3.7 Expressionskonstrukte	50
3.7.1 Das Konstrukt pBLC400v	50
3.7.2 Das Konstrukt pBLC400u	51
3.7.3 Das Konstrukt pBLC600v	51

3.7.4 Das Konstrukt pBLC600u	51
4 Ergebnisse	52
4.1 Expressionsanalyse von CD36 und SR-A im ZNS	52
4.1.1 Immunhistologische Untersuchung der Expression von CD36 im ZNS	52
4.1.2 Immunhistologische Untersuchung der Expression von SR-A im ZNS	53
4.2 Infektionsstudien an CD36/SR-A-Knockout-Mäusen	55
4.2.1 Vergleich der Überlebenszeiten	55
4.2.2 Immunhistologische Untersuchungen der Scrapie-infizierten Knockout-Mäuse	57
4.2.2.1 PrP ^{Sc} -Ablagerungen im Gehirn nach i.c.-Infektion	57
4.2.2.1.1 PrP ^{Sc} -Ablagerung im asymptomatischen Stadium der Infektion (125 dpi)	57
4.2.2.1.2 PrP ^{Sc} -Ablagerung im terminalen Stadium der Infektion	58
4.2.2.2 PrP ^{Sc} -Ablagerungen in der Milz nach i.p.-Infektion	59
4.2.2.2.1 Western Blot (30, 60 und 100 dpi; i.p.-Infektion)	59
4.2.2.2.2 Pet-Blot (60 dpi; i.p.-Infektion)	61
4.2.2.2.3 Immunpräzipitation aller PrP ^{Sc} -Isoformen (60 dpi; i.p.-Infektion)	61
4.2.2.2.4 Verimpfen von Milzen in tga20-Mäuse zum Nachweis infektiöser Prionen	62
4.2.2.3 PrP ^{Sc} -Akkumulation in dendritischen Zellen nach PrP ^{Sc} -Infektion	63
4.2.2.4 Mikrogliaaktivierung	64
4.2.2.4.1 Aktivierung von Mikroglia im asymptomatischen Stadium der Infektion (125dpi; i.c.-Infektion)	64
4.2.2.4.2 Aktivierung von Mikroglia im terminalen Stadium der Infektion	67
4.2.2.5 Astrozytenaktivierung	69
4.2.2.5.1 Aktivierung von Astrozyten im asymptomatischen Stadium der Infektion (125 dpi; i.c.-Infektion)	69
4.2.2.5.2 Aktivierung von Astrozyten im terminalen Stadium der Infektion	71
4.2.2.6 Spongiforme Veränderungen/Vakuolisierung	73
4.2.2.6.1 Vakuolisierung im asymptomatischen Stadium der Infektion (125 dpi; i.c.-Infektion)	73
4.2.2.6.2 Vakuolisierung im terminalen Stadium der Infektion	75
4.2.3 Expressionsanalyse ausgewählter Gene und Proteine in den CD36/SR-A-Knockout-Tieren	77
4.2.3.1 Expressionsanalyse ausgewählter Gene mittels real-time QPCR	77
4.3 Expressionsanalyse von CXCL13 im ZNS	81
4.3.1 Immunhistologische Untersuchung der Expression von CXCL13 im nicht-infizierten Gehirn	81
4.3.2 Immunhistologische Untersuchung der Expression von CXCL13 im Verlauf der Scrapie-Pathogenese	82
4.3.3 Immunhistologische Charakterisierung des Zelltyps	83

4.3.4 Immunhistologische Untersuchung der CXCL13-Expression während neurodegenerativer Erkrankungen	83
4.3.5 Expression von CXCL13 in CD36/SR-A-Knockout-Tieren	85
4.4 Generierung CXCL13-transgener Mäuse	87
4.4.1 Herstellung des Expressionskonstruktes mittels PCR, Ligation und Klonierung	87
4.4.2 Charakterisierung der Transformanden mittels Kolonie-PCR	88
4.4.3 Überprüfung der Konstrukte mittels Zellkultur	88
4.4.4 Generierung der CXCL13-transgenen Mäuse	89
4.4.5 Genotypisierung der transgenen Mäuse mittels PCR	90
4.4.6 Untersuchung der CXCL13-Expression im Gehirn transgener Mäuse mittels real-time QPCR	91
4.4.7 Untersuchung der CXCL13-Proteinexpression im Gehirn transgener Mäuse mittels ELISA	92
4.4.8 Bestimmung der Kopienzahl des Konstruktes	92
4.5 Infektionsstudien an CXCL13-transgenen Mäusen	94
4.5.1 Vergleich der Überlebenszeiten	94
5 Diskussion	95
5.1 CD36/SR-A	95
5.1.1 Expression von CD36 und SR-A im Scrapie-infizierten Gehirn	95
5.1.2 Infektionsstudien an CD36/SR-A-Knockout-Mäusen	96
5.1.2.1 Verminderte Mikrogliaaktivierung in Scrapie-infizierten CD36/SR-A-Knockout-Mäusen während des asymptomatischen Stadiums der Infektion	96
5.1.2.2 Verminderte Astrozytenaktivierung in Scrapie-infizierten CD36/SR-A-Knockout-Mäusen während des asymptomatischen Stadiums der Infektion	98
5.1.2.3 Der Grad der Vakuolisierung des Hirngewebes ist von CD36/SR-A unabhängig	99
5.1.2.4 Verminderte PrP ^{Sc} -Ablagerung und gleichzeitig verkürzte Überlebenszeiten bei CD36/SR-A-Knockout-Mäusen	99
5.2 CXCL13	102
5.2.1 Expression und Funktion von CXCL13 im ZNS	102
5.2.2 Generierung und Charakterisierung von CXCL13-transgenen Mäuse	103
6 Zusammenfassung	106
6.1 Summary	107
7 Anhang	108
7.1 Abkürzungen	108
7.2. Abbildungsverzeichnis	109

7.3. Diagrammverzeichnis	111
7.4. Tabellenverzeichnis	112
7.5 Sequenzen und Vektorkarten	112
7.5.1 CXCL13	112
7.5.2 pBLC400v	112
7.5.3 pEGFP-N1	115
8 Literaturverzeichnis	118

1 Einleitung

Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind eine Gruppe von infektiösen, neurodegenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) von Menschen und Tieren, die auch als Prionkrankheiten bezeichnet werden. Auslöser dieser Erkrankungen ist die pathologisch veränderte Form eines körpereigenen Proteins. Der Begriff Prion wurde geprägt von Stanley B. Prusiner. Er leitet sich ab von den Begriffen *proteinaceous infectious particle* (proteinartiges infektiöses Partikel). Prusiner postulierte mit der Protein-only-Hypothese ein neues infektionsbiologisches Modell, demzufolge die Hauptkomponente der TSE-Erreger, das fehlgefaltete Prionprotein, das infektiöse Agens darstellt (Prusiner, 1982).

Die TSE gehen einher mit einer großen Zahl von neurologischen Merkmalen und verhaltensverändernden Symptomen wie Ataxie (Störungen der Gleichgewichtsregulation und der Bewegungskoordination) und Demenz (Einschränkung der geistigen Leistungsfähigkeit, vor allem des Gedächtnisses, ferner des Denkvermögens, der Sprache und der Motorik). Des Weiteren charakteristisch für diese Erkrankungen sind eine ungewöhnlich lange Inkubationszeit und eine fehlende humorale bzw. zelluläre Immunantwort auf das infektiöse Agens. Histologisch sind vor allem eine Astrozytose, Mikrogliose und die für die Diagnose besonders wichtigen charakteristischen spongiformen Veränderungen und Ablagerungen des infektiösen Prionproteins PrP^{Sc} zu erkennen. Bei den TSE handelt es sich um stets tödlich verlaufende Erkrankungen. Eine Schutzimpfung oder eine kausale Therapie sind derzeit nicht bekannt. Eine Diagnose kann bisher nur post mortem gesichert werden.

1.1 TSE bei Säugetieren

Zu den am besten untersuchten TSE-Erkrankungen zählt **Scrapie** bei Schafen und Ziegen. Sie wurde erstmalig 1732 erwähnt und 1759 von dem Veterinärmediziner J. G. Leopoldt als Traberkrankheit beschrieben (Brown and Bradley, 1998).



Abbildung 1: Scrapie bei Schafen und Ziegen. Die Symptomatik von Scrapie ist sehr vielfältig. Durch Schädigung des ZNS kommt es zu Verhaltensstörungen, Kratzen und damit verbundenen Wollschäden, zunehmenden Bewegungsstörungen bis zum Festliegen, Zittern und schließlich zum Exitus (www.jenagen.de).

Die Bezeichnung Scrapie wurde von einem der klinischen Symptome abgeleitet, nämlich den starken Kratzbewegungen (engl.: *to scrape* = sich kratzen). Bereits Mitte des 18. Jh. ging man davon aus, dass es sich um eine ansteckende (kontagiöse) Krankheit handelt. 1936 gelang es schließlich experimentell zu beweisen, dass Scrapie übertragbar (transmissibel) und somit eine Infektionskrankheit ist (Cuillé and Chelle, 1936). Die Ausbreitung der Scrapie erfolgt zum einen vertikal durch Übertragung des Erregers vom Muttertier auf ihre Nachkommen vermutlich während des Geburtsvorganges, aber auch eine horizontale Übertragung von Tier zu Tier durch eine kontaminierte Umgebung ist bekannt (Hoinville, 1996). Bis auf Australien und Neuseeland ist die Scrapie weltweit verbreitet. Es existieren mehr als 20 verschiedene Stämme des Erregers, die oft nur durch aufwändige Untersuchungen zu unterscheiden sind.

Ein weiterer Vertreter der TSE bei Tieren ist die **bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)** des Rindes, die erstmalig 1986 in Großbritannien diagnostiziert wurde. Die Ursache der BSE liegt möglicherweise in der Schafscrapie, die seit Jahrhunderten in Großbritannien endemisch vorkommt. Kontaminiertes Tiermehl, das Scrapie-infiziertes Schafhirngewebe beinhalten und ungenügend erhitzt wurde, könnte zur Übertragung des Erregers geführt haben (Wells et al., 1987), der damit letztlich die Artenschranke zum Rind überwinden konnte. Die Folge war eine BSE-Epidemie in England, die sich durch den Export von Tiermehl auch auf andere Länder wie Deutschland, die Schweiz und Frankreich ausweitete. Bis heute wurden in England 181.064 Fälle von BSE bestätigt (Stand 2.01.2008; Quelle: www.defra.gov.uk). In Deutschland wurden allein im Zeitraum 2001-2008 410 amtlich bestätigte Fälle registriert (Stand 31.01.2008, Quelle: www.Verbraucherministerium.de). Aus experimentellen Pathogenesestudien ging eine Inkubationszeit von 36 ± 2 Monate hervor. Außerdem fand man heraus, dass 0,1 Gramm infektiöses Hirngewebe von BSE-Kühen ausreicht, um Rinder oral zu infizieren. Um die Ausbreitung der BSE zu verhindern, ist seit 2001 in der gesamten europäischen Union die Verfütterung von Tierkörpermehl an alle Nutztiere verboten.

Eine weitere Ursprungshypothese geht davon aus, dass schon sehr lange eine symptomlose BSE-Form vorgekommen ist. Durch eine „Virulenzsteigerung“ des BSE-Erregers und dessen Rückführung über Tiermehl im Futter konnte sich schließlich die BSE-Epidemie etablieren (Schreuder, 1998). Eine weitere BSE-Ursprungshypothese besagt, dass schon seit jeher eine sporadische Form von Prionkrankheit im Rind auftritt. Aufgrund mangelnder Überwachung ist diese aber durch ihre geringe Häufigkeit vor der BSE-Epidemie nicht entdeckt worden. Durch die Veränderungen in der Tierkörperverwertungstechnologie in Großbritannien ist danach der Erreger der BSE innerhalb der Rinderpopulation rasch rezykliert worden, was zur BSE-Epidemie führte (Chastel, 1996; Eddy, 1995). Zusätzlich zur infektiös übertragenen BSE ist inzwischen auch eine weitere, möglicherweise sporadische Form der BSE entdeckt worden, die sich hinsichtlich des Ablagerungsmusters von der bisher bekannten unterscheidet und der sCJD ähnelt (Casalone et al., 2004).

Mit dem Auftreten von BSE kam die Frage auf, ob BSE auch auf Schafe und Ziegen übertragen werden kann. In Laborversuchen ist Wissenschaftlern das schon vor Jahren gelungen (Foster et al., 1993) und 2005 wurde BSE erstmals bei einer Ziege in Frankreich bestätigt (Eloit et al, 2005).

Weitere Prionerkrankungen bei Säugetieren sind die **transmissible Enzephalopathie der Nerze (TME – transmissible mink encephalopathy)**, die bei Farmnerzen auftritt (Marsh et al., 1992) und die **feline spongiforme Enzephalopathie (FSE)**, die erstmalig bei einer britischen Hauskatze im

Jahre 1990 diagnostiziert wurde. Ebenso tritt sie bei exotischen Wildkatzen auf, die in Zoologischen Gärten gehalten werden. Beide Erkrankungen scheinen durch den Verzehr bzw. die Verfütterung von tierischen Produkten, die mit dem BSE-Erreger kontaminiert sind, ausgelöst zu werden (Marsh et al., 1992; Kirkwood and Cunningham, 1994; Ryder et al., 2001).

Die „**chronisch zehrende**“ **Krankheit (chronic wasting disease, CWD)** tritt vorwiegend bei verschiedenen Hirscharten wie Maultierhirschen und Rocky Mountain-Hirschen (deutsch: Wapiti; engl.: *elk* – fälschlicherweise oft als Elch ins Deutsche übersetzt) in den USA und Kanada auf. Die CWD wurde bereits in den 60er Jahren beobachtet, allerdings erst 1978 als TSE diagnostiziert (Williams et al., 1982). 1981 wurde die CWD erstmals bei einem wildlebenden Hirsch gemeldet (Spraker et al., 1997).

1.2 TSE beim Menschen

Die **Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD)** wurde erstmals in den Jahren 1920 und 1921 von den deutschen Neurologen Hans-Gerhard Creutzfeldt und Alfons Jakob als sporadische Pseudosklerose beschrieben (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921). Die CJD, die seit den 60er Jahren als transmissible Krankheit gilt (Gajdusek et al., 1966), äußert sich durch Demenz und Ataxie. Die CJD tritt mit einer Inzidenz von etwa einem Fall pro 1 Million Einwohner pro Jahr auf und ist seit 1994 meldepflichtig. Die häufigste Form der CJD ist die **sporadische CJD (sCJD)**. Es wird angenommen, dass sie spontan auftritt und weder durch eine Mutation des Priongens *PRNP* noch durch eine Infektion mit einem extern aufgenommenen pathogenen Prionprotein verursacht wird (Will, 1993). Sie stellt 80-90% aller CJD-Fälle dar. Das Durchschnittsalter der sCJD-Patienten liegt bei 55-60 Jahren.

Eine weitere Form der CJD ist die **familiäre CJD (fCJD)**. Sie stellt eine autosomal dominant vererbte TSE dar, die durch unterschiedliche Punkt- und Insertionsmutationen des Priongens gekennzeichnet ist, und etwa 10-15% aller CJD-Fälle ausmacht. Zu diesen familiären TSE gehören das 1936 erstmals beschriebene **Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)** (Gerstmann et al., 1936) sowie die **fatale familiäre Insomnie (FFI)** (Manetto et al., 1992).

Die **iatrogene CJD (iCJD)** umfasst die seltenen CJD-Fälle, die durch medizinische Interventionen verursacht wurden, zu denen neurochirurgische Eingriffe mit kontaminierten und unzureichend sterilisierten Instrumenten, aber auch Gewebetransplantationen von Cornea und Dura mater CJD-kranker Patienten zählen (Gibbs et al., 1985; Brown et al., 1988; Harvey et al., 1992; Brown et al., 1990; Zobeley et al., 1999). Am häufigsten wurde die iCJD aber durch die Behandlung mit Wachstumshormonen übertragen, die aus infektiösen Leichenhypophysen extrahiert wurden (Fradkin et al., 1991).

Eine weitere infektiös erworbene CJD ist die **neue variante CJD (vCJD bzw. nvCJD)**, die 1996 erstmals beschrieben wurde (Will et al., 1996) und die in einem engen Zusammenhang mit der Rinderseuche BSE gesehen wird. Vermutlich wurde sie durch den Verzehr von BSE-Erreger-haltigen Produkten (Risikomaterial) auf den Menschen übertragen (Hill et al., 1997). Zahlreiche Experimente stützen diese Hypothese. So konnte der BSE-Erreger auf Makaken (Lasmézas et al., 1996) und andere nicht humane Primaten übertragen werden (Bons et al., 1999), wobei dieselben neuropathologischen Veränderungen und Glykosilierungsmuster der Prion-Proteine festgestellt

werden konnten, die auch bei der vCJD auftreten (Collinge et al., 1996). Durch das sog. „strain typing“, das auf Übertragungsversuchen auf Mäuse basiert, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die vCJD durch den gleichen Erregerstamm verursacht wird wie BSE und FSE (Bruce et al., 1997), denn die mit vCJD, BSE und FSE infizierten Tiere wiesen die gleichen Läsionsprofile und Überlebenszeiten auf.

Die vCJD unterscheidet sich von der sCJD durch ein jüngeres Durchschnittsalter und einen längeren klinischen Verlauf der Erkrankung. Zudem können neuropathologisch charakteristische „floride Amyloidplaques“ beobachtet werden (Ironsides, 2002). Letztendlich kann aber erst post mortem festgestellt werden, ob es sich bei der Erkrankung um sCJD oder vCJD handelt. Bislang sind keinerlei vCJD-Fälle in Deutschland diagnostiziert worden. In Großbritannien hingegen sind bislang 166 vCJD-Todesfälle registriert worden. In Frankreich wurden 23, in Irland 4, in den USA 3, in den Niederlande und Portugal je 2 Fälle gemeldet. In Italien, Kanada, Japan, Spanien und Saudi-Arabien trat jeweils nur ein Fall der vCJD auf (Quelle: www.cjd.ed.ac.uk, Stand Dezember 2007).

Die CJD lässt sich bislang nur symptomatisch behandeln. Hierfür werden Antidepressiva und Neuroleptika eingesetzt. Eine Therapie zur Heilung der Erkrankung existiert bislang nicht.



Abbildung 2: Kuru beim Menschen. Ein Eingeborener des Fore-Stammes trägt einen an Kuru erkrankten Jungen. Bewegungsstörungen sind bei Kuru schon frühe charakteristische Merkmale. Eine Demenz, d.h. der Zerfall der geistigen Fähigkeiten ist vergleichsweise selten und tritt meistens erst im Terminalstadium auf (www.pathology.mc.duke.edu).

Eine verwandte Form der CJD ist die **Kuru**. Sie stellt eine endemische Form einer durch Infektion übertragenen TSE dar. Das Vorkommen der Kuru begrenzt sich auf Angehörige des Fore-Stammes auf Papua-Neuguinea. Sie wurde durch kannibalische Rituale übertragen (Liberski et al., 1997) und durch entsprechende Prävention konnte ein Abklingen der Epidemie in den 60er Jahren erreicht werden.

1.3 Eigenschaften des Erregers

1.3.1 Das zelluläre Prionprotein PrP^C und seine pathologische Isoform PrP^{Sc}

Das zelluläre Prionprotein (PrP^C) ist ein Glykoprotein, das auf der Zelloberfläche fast aller Zelltypen, besonders aber von Neuronen, stark exprimiert wird (Kretzschmar et al., 1986). Das Protein umfasst

vor seiner posttranslationalen Modifikation 254 Aminosäuren bei Maus und Hamster bzw. 253 Aminosäuren beim Menschen (Kretzschmar et al., 1986).

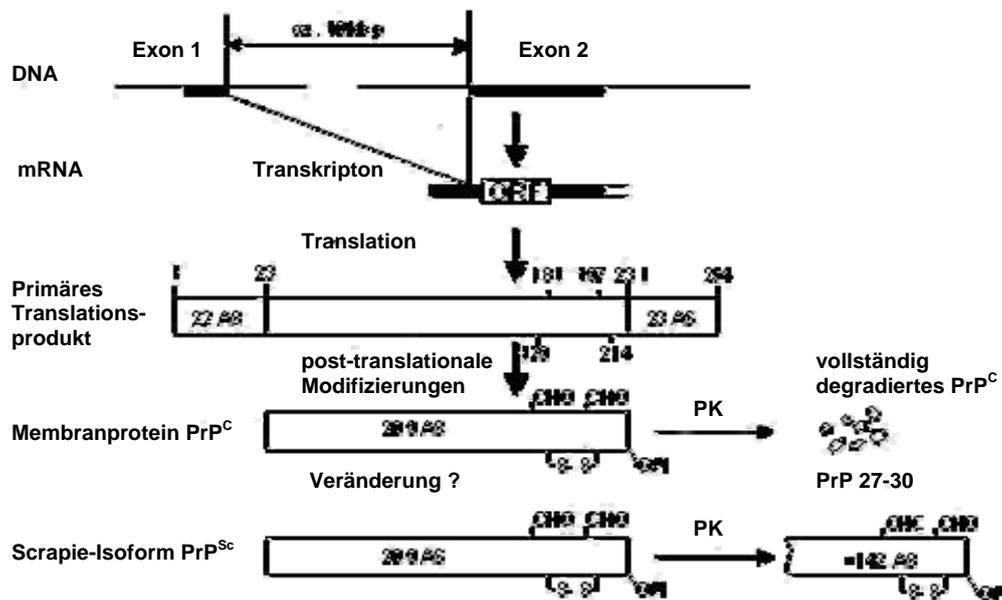


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Biosynthese und posttranslationalen Modifikation des zellulären Prionproteins. Das PrP^C der Maus umfasst nach seiner Biosynthese 254 AS. Während seiner Prozessierung im endoplasmatischen Retikulum kommt es zu einer Abspaltung eines Signalpeptids am N-Terminus, zur Anheftung eines GPI-Ankers am C-terminalen Ende, zwei Glykosylierungen finden statt und eine Disulfidbrücke entsteht. Die sog. Prion Rods entstehen nach proteolytischer Abspaltung eines N-terminalen Restes von PrP^{Sc}, wohingegen das zelluläre PrP vollständig durch Proteinase K abgebaut wird (aus: Biologen heute, 6/1999; modifiziert nach Weissmann, 1994).

Während seiner Prozessierung im endoplasmatischen Retikulum (Abb. 3) wird ein Signalpeptid, das 22 Aminosäuren umfasst, vom primären Translationsprodukt abgespalten (Hope et al., 1986; Harris et al., 1993). Glykosylierungen erfolgen an den Positionen 181 und 197 (Endo et al., 1989; Stahl et al., 1993). Zusätzlich bilden die Cysteinreste an Position 179 und 214 eine Disulfidbrücke aus (Stahl et al., 1991). Am C-Terminus des Proteins wird ein 23 Aminosäuren umfassender Rest durch eine Glykosyl-Phosphatidylinositol(GPI)-Einheit ersetzt, womit das PrP^C auf der Zelloberfläche verankert wird (Stahl et al., 1987). Hier ist es in Cholesterin-reichen Mikrodomänen, sog. *caveolae-like domains*, lokalisiert (Vey et al., 1996).

Das PrP^C ist ein hoch konserviertes Protein. Seine biologische Funktion ist bislang aber noch nicht ausreichend geklärt. Da Mäuse, denen das Priongen fehlt, außer einem veränderten Schlaf-Wach-Rhythmus keinerlei Auffälligkeiten in ihrer Entwicklung oder ihrem Verhalten zeigen, geht man davon aus, dass PrP^C keine vitale Funktion übernimmt (Tobler et al., 1996; Bueler et al., 1994). Durch eine hoch konservierte Oktapeptid-Repeatsequenz im N-Terminus ist PrP^C allerdings in der Lage, Kupfer zu binden. Daher könnte es möglicherweise für die Regulation des Kupferspiegels in den Synapsen verantwortlich sein. Ebenfalls käme eine Superoxid-Dismutase-Funktion zum Schutz vor freien Radikalen in der Zelle in Frage (Kretzschmar et al., 2000; Brown et al., 1999).

Durch eine Infektion von $\text{PrP}^{-/-}$ -Mäusen mit dem Scrapie-Erreger konnte außerdem gezeigt werden, dass das Vorhandensein des PrP^{C} essentiell für eine Scrapie-Infektion ist, da die infizierten Knockout-Mäuse nicht an Scrapie erkrankten (Bueller et al., 1992; Manson et al., 1994). Transgene Mäuse, die PrP^{C} überexprimierten, zeigten dagegen eine verkürzte Inkubationszeit gegenüber Wildtyp-Mäusen (Bueller et al., 1994).

Zudem stehen eine Vielzahl von Punkt- und Insertionsmutationen des Prionproteingens *PRNP* in Zusammenhang mit unterschiedlichen erblichen Prionkrankheiten wie beispielsweise GSS und FFI.

Wodurch unterscheidet sich das infektiöse PrP^{Sc} von zellulärem PrP^{C} ? Beide Proteine weisen die gleiche Aminosäuresequenz auf. Allerdings zeichnet sich die Sekundärstruktur des PrP^{Sc} durch einen erhöhten Anteil an β -Faltblattstrukturen aus (45%), wohingegen PrP^{C} nur etwa 3% dieser β -Faltblattstrukturen aufweist, dafür aber überwiegend aus α -helikalen Strukturen besteht (40%) (Pan et al., 1993). Diese Konformationsunterschiede führen dazu, dass PrP^{Sc} wasserunlöslich und extrem resistent gegenüber proteolytischem Abbau, Hitze und herkömmlichen Desinfektionsmitteln ist.

Zur Prion-Replikation entwickelte Prusiner das Heterodimer-Modell. Dabei führt die Anlagerung eines PrP^{Sc} -Monomers an ein PrP^{C} -Molekül zu dessen Umfaltung in die pathogene PrP^{Sc} -Konformation. Anschließend stehen nach Dissoziation des entstandenen Homodimers zwei PrP^{Sc} -Moleküle zur weiteren Replikation zur Verfügung (Raeber et al., 1992).

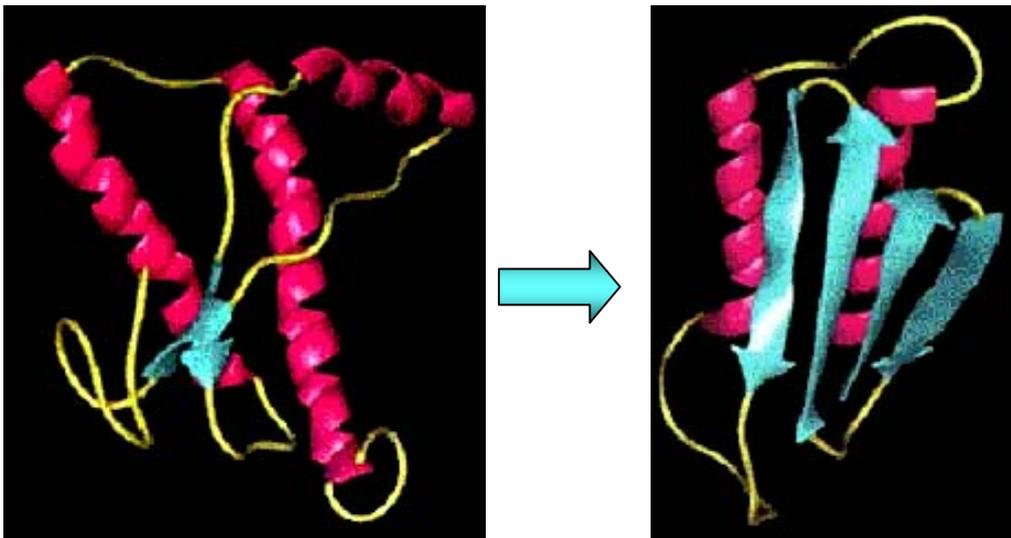


Abbildung 4: Das zelluläre Prionprotein PrP^{C} und seine pathologische Isoform PrP^{Sc} . Die dreidimensionale Struktur des PrP^{C} wird vorwiegend von α -Helices bestimmt. Die pathologische Isoform PrP^{Sc} weist hingegen hauptsächlich β -Faltblattstrukturen auf. Eine Anlagerung eines PrP^{Sc} an ein PrP^{C} -Molekül führt nach der Protein-only-Hypothese zu seiner Umfaltung zu PrP^{Sc} (www.pharmaceutical-technology.com).

Nach wie vor wird diese Protein-only-Hypothese, der zur Folge biologische Information ohne Beteiligung einer Nukleinsäure weitergegeben wird, von einigen Forschern in Frage gestellt (Chesebro, 1985; Narang, 2002). Letztendlich wird als endgültiger Beweis für die Prion-Hypothese die synthetische Herstellung von PrP^{Sc} , das auch *in vivo* infektiös ist, angesehen. Was zuvor bereits im Hefemodell gezeigt werden konnte (Sparrer et al., 2000; King and Diaz-Avalos, 2004), ist nun auch in einem Tierexperiment gelungen. *In vitro* erzeugtes PrP^{Sc} konnte in Mäusen eine Prionerkrankung auslösen. Diese Mäuse waren transgen für PrP^{C} , das sie 20-fach höher exprimierten als die Wildtyp-

Kontrollen (Legname et al., 2004). Der Nachweis einer erregerspezifischen Nukleinsäure konnte hingegen noch nicht erbracht werden (Diringer et al., 1997).

1.4 Pathogenese von TSE

1.4.1 Pathogenese in der Peripherie und Neuroinvasion

Der natürliche und somit epidemiologisch relevanteste Infektionsweg von TSE ist die orale Übertragung des Erregers. Bei der experimentellen Übertragung stellt die intracerebrale Infektion mit PrP^{Sc} die weitaus effektivste und somit schnellste Methode dar. Bei intravenösem, intraperitonealem, subcutanem und oralem Infektionsweg verlängert sich die Inkubationszeit. Das zentrale Nervensystem (ZNS) ist unabhängig von der Art der Inokulation immer das letztliche Zielgebiet des TSE-Erregers.

Die Ausbreitung des Erregers beginnt mit dem transepithelialen Transport durch die M-Zellen aus dem Darmlumen in die Peyerschen Plaques. Das lymphoretikuläre System (LRS), zu dem neben den Peyerschen Plaques auch Lymphknoten, Tonsillen und Milz gehören, scheint eine entscheidende Rolle bei der peripheren Prion-Replikation und Akkumulation von PrP^{Sc} zu spielen, da nach einer oralen bzw. intraperitonealen Infektion in der Milz bereits eine hohe Infektiösität detektierbar ist, bevor der Erreger im ZNS nachgewiesen werden kann. Die Prion-Replikation erfolgt innerhalb des LRS vor allem in den folliculären dendritischen Zellen (FDC's) der Milz (Kitamoto et al., 1991). FDC's bilden als Bindegewebszellen mit ihren Fortsätzen in Lymphfollikeln die Keimzentren für die klonale Expansion antigenaktivierter B-Zellen. FDC-defiziente Mäuse sind intraperitoneal nicht infizierbar, da durch das Fehlen reifer FDC's die Prion-Replikation in der Milz, als auch die Neuroinvasion signifikant beeinträchtigt sind (Mabbot et al., 2000). Es zeigte sich zudem, dass die Positionierung der FDC's eine große Rolle für eine effektive periphere Prion-Infektion spielt. Mäuse, die defizient für den Chemokinrezeptor CXCR5 waren, zeigten eine Positionierung von FDC's in der Nähe sympathischer Nerven, die zu einem beschleunigten Transfer von Prionen in das Rückenmark führte (Prinz et al., 2003).

Von den FDC's gelangt der Erreger über den Nervus (N.) splanchnicus in die graue Substanz des thorakalen Rückenmarks wo er sich in auf- und absteigender Richtung ausbreitet. Eine weitere Ausbreitung ist über parasymphatische Kerngebiete des N. vagus möglich, wodurch er direkt in die Medulla oblongata gelangt, um das ZNS zu infizieren (McBride et al., 2001).

1.4.2 Pathogenese im ZNS

TSE weisen ein charakteristisches histopathologisches Erscheinungsbild im ZNS auf. Es wird geprägt durch die Ablagerung von PrP^{Sc}, spongiösen Veränderungen, Nervenzellverlust, astrozytärer Gliose, sowie einer zum Teil massiven Mikrogliaaktivierung. Ansonsten können in der Regel keine zellulären immunologischen Reaktionen beobachtet werden (Collis et al., 1983). Daher spricht man auch von einer lokal induzierten, chronischen, nicht immunvermittelten Neuroinflammation (Rezaie and Lantos, 2001).

Bereits im sehr frühen Krankheitsstadium kommt es zur Akkumulation von PrP^{Sc}. Die Ablagerungen können in Neuronen, Astrozyten und Mikroglia nachgewiesen werden (Diedrich et al., 1991; Williams et al., 1997; Ye et al., 1998). Ausmaß und Lokalisation sind allerdings vom Erregerstamm, Wirt und Genotyp des Prionproteins abhängig (McKinley et al., 1991; Rubenstein et al., 1991).

Eine Folge der PrP^{Sc}-Ablagerung ist die Aktivierung von Mikroglia. Diese besitzen unspezifische Abwehraufgaben und repräsentieren die gewebeständigen Makrophagen des Gehirns (Del Rio Hortega et al., 1919; 1932), die im ZNS als Zellen mit phagozytotischer Funktion fungieren. Daher nehmen sie eine zentrale Rolle bei pathologischen Vorgängen im Gehirn ein. Im ruhenden Zustand weisen Mikroglia eine ramifizierte bzw. verzweigte Morphologie auf und exprimieren in geringem Maße immunrelevante Moleküle wie MHC-II (*major histocompatibility complex*) (Kreutzberg et al., 1996). Während der Scrapie-Infektion kommt es nach Ablagerung von PrP^{Sc} im Gehirn zur Aktivierung der Mikroglia, bei der Rezeptoren wie FPRL-1 (*formyl peptide receptor like-1*), RAGE (*receptor for advanced glycation endproduct*) oder CD14 (Le et al., 2001; Yan, 1996; Fassbender et al., 2004) beteiligt sein könnten. Auch andere Scavenger Rezeptoren könnten dabei eine Rolle spielen (Husemann et al., 2002; El Khoury et al., 2003). Die Aktivierung der Mikroglia führt zu einer morphologischen Veränderung, die eine Reduzierung ihrer Zellausläufer und eine Vergrößerung des Zellkörpers umfasst (Streit et al., 1988; Kreutzberg et al., 1996). In diesem Zustand exprimieren sie im hohen Maße Zelloberflächenmoleküle wie CD45, MHC-II, F4/80 und IBA-1 (Graeber et al., 1988; Williams et al., 1994 b) und es kommt zu einer Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL-) 1, IL-6 und TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) (Forloni et al., 1993; Brown et al., 1996 a; Williams et al., 1994 b; Campbell et al., 1994), wodurch weitere Mikroglia aktiviert, mobilisiert und rekrutiert werden. Neben Zytokinen sezernieren Mikroglia auch reaktive Sauerstoffspezies, Neurotoxine und Chemokine (Ju et al., 1998; Rogers et al., 1996; Riemer et al., 2000; Lewicki et al., 2003). Außerdem sind Mikroglia in der Lage, PrP^{Sc}-Ablagerungen zu phagozytieren und mit der Sekretion von neurotrophen Faktoren Neuronen zu schützen (Peyrin et al., 1999; Nakajima and Kohsaka, 2004).

Neben den Mikroglia werden auch Astrozyten aktiviert, die zu den Stütz- und Schutzzellen des ZNS gehören. Astrozyten sind die größten Glia des ZNS, die mit ihren zytoplasmatischen Fortsätzen in Kontakt mit Nervenzellen und Blutkapillaren stehen und dadurch an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind. Unter anderem sind sie an der Versorgung und dem Sauerstoffaustausch zwischen Nervenzellen beteiligt und fördern die Erregungsleitung. Ihre Aktivierung geschieht durch die von Mikroglia sezernierten proinflammatorischen Zytokine, wie z.B. IL-1 und anderen löslichen Faktoren (Hafiz and Brown, 2000; Schultz et al., 2004). Eine direkte Interaktion mit PrP^{Sc} führt ebenfalls zu einer Aktivierung, wobei eventuell wiederum Scavenger Rezeptoren eine Rolle spielen könnten (Wyss-Coray et al., 2003). Ihre Aktivierung ist neben der Mikrogliose ein früher Prozess im Krankheitsverlauf der Scrapie-Infektion und kann bereits vor dem Auftreten von neurodegenerativen Prozessen detektiert werden.

Aktivierte Astrozyten steigern ebenfalls ihre Zytokin- und Chemokinproduktion, wodurch unter anderem, weitere Mikroglia aktiviert werden und es zu ihrer Migration in entzündete Hirnregionen kommt. Die von Mikroglia, Astrozyten und Neuronen sezernierten Zytokine und Chemokine spielen

also insgesamt eine wichtige Rolle für die Entwicklung der Neuroinflammation während der TSE-Pathogenese (Williams et al., 1997).

Ein weiteres charakteristisches Merkmal aller TSE's ist der Nervenzelltod, der sowohl apoptotisch als auch durch Nekrose erfolgt (Giese et al., 1995). Man geht dabei von einem multifaktoriellen Prozess aus. Hierzu zählt neben der Sekretion von Zytokinen und neurotoxischen Faktoren durch Mikroglia und Astrozyten auch die Deregulation des extrazellulären Glutamatspiegels. Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn und seine Deregulation bzw. Überstimulation führt vermutlich zu einer letalen Neurodegeneration (Exzitotoxizität) (Brown et al., 1999).

Zudem konnten für Apoptose charakteristische Merkmale, wie DNA-Fragmentierung, ein schrumpfendes Zellvolumen sowie spezifische Proteine bei experimentellen Untersuchungen nachgewiesen werden (Fairbairn et al., 1994; Giese et al., 1995; Park et al., 2000), obwohl sie nicht immer mit den lokalen Ablagerungen von PrP^{Sc} korrelieren.

Eine weitere Folge der TSE-Erkrankungen ist die Vakuolisierung, eine spongiöse Veränderung des Gehirns, die durch Hohlräume im Hirnparenchym gekennzeichnet ist. Es sind kleine, mitunter opak erscheinende blasenartige Gebilde im Neuropil, die vereinzelt oder als Gruppen vorliegen und in unterschiedlicher Ausprägung bei praktisch allen Prionkrankheiten auftreten. Das Läsionsprofil, das die Verteilung und das Ausmaß dieser Vakuolen beschreibt, ist stammspezifisch und teilweise auch wirtsabhängig. Im Endstadium von TSE spricht man schließlich vom „Status spongiosus“, wenn es zu einer ausgeprägten astrozytären Gliose, Gewebsauflockerungen mit großen perizellulären Spaltraumbildungen und einem fast vollständigen Nervenzellverlust gekommen ist (Zlotnik et al., 1962; Jeffrey et al., 1992; Jeffrey et al., 1995).

1.5 Diagnostik von TSE-Erkrankungen

TSE bei Menschen und Tieren haben eine ungewöhnlich lange Inkubationszeit und können bislang erst nach dem Tod des infizierten Lebewesens sicher diagnostiziert werden. Diese Verfahren beruhen auf dem Nachweis von PrP^{Sc} und den typischen histologischen Veränderungen im Gehirn. Es besteht jedoch die Hoffnung, dass in naher Zukunft mit Hilfe der PMCA (*protein misfolding cyclic amplification*) PrP^{Sc} im Blut nachgewiesen werden kann. Dieses Testverfahren nutzt die Eigenschaft des PrP^{Sc}, seine fehlgefaltete Struktur dem PrP^C aufzuzwingen, wodurch es gelingt, die geringe Zahl von PrP^{Sc} im Blut um den Faktor 10^7 zu vermehren und es somit leicht nachweisbar zu machen. Inzwischen konnte in Versuchsreihen mit Hamstern PrP^{Sc} im Blut mit einer Zuverlässigkeit von 89 % nachgewiesen werden. An der Anwendbarkeit auch für die Diagnose beim Menschen und einer Kontrolle von Blutspenden wird gearbeitet (Soto et al., 2005).

Die definitive Diagnose der sCJD setzt nach zurzeit geltenden Kriterien nach wie vor eine neuropathologische Untersuchung voraus. Letztendlich kann sie aber nur post mortem gestellt werden.

Auch im Falle von BSE bestehen derzeit nur Möglichkeiten zur post mortem Diagnose. Die Nachweismethoden bestehen in der Detektion der typischen degenerativen Veränderungen mittels pathologischer und immunhistologischer Untersuchungen.

Da inzwischen der Zusammenhang zwischen dem Verzehr BSE-kontaminierten Rindfleisches und dem Auftreten der vCJD beim Menschen als gesichert gilt, ist die Entwicklung empfindlicher und noch am lebenden Tier anwendbarer BSE-Tests wichtig für die Lebensmittelsicherheit und den Verbraucherschutz.

1.6 Scavenger Rezeptoren

Scavenger Rezeptoren (SR's) (engl.: *scavenger* = Straßenkehrer, Müllmann) sind glykosylierte Zelloberflächenproteine, die in die intrazelluläre Signaltransduktion involviert sind, wobei sie im Lipidmetabolismus und der Abwehr von bakteriellen Erregern eine Rolle spielen. Der Ausdruck „Scavenger Rezeptor“ wurde von Brown und Goldstein eingeführt, um Bindungsstellen für chemisch modifizierte Formen (acetylierte und oxidierte Form) von Lipoproteinen mit niedriger Dichte („*low density lipoprotein*“ (LDL)) auf der Oberfläche von Makrophagen zu beschreiben (Goldstein et al., 1979; Hart et al., 1996). Häufig werden sie aber auch als „*pattern recognition receptors*“ („mustererkennende Rezeptoren“) bezeichnet (Husemann et al., 2002). Scavenger Rezeptoren wurden erstmalig im Zusammenhang mit der Schaumzellbildung bei Makrophagen während atherosklerotischer Gefäßerkrankungen identifiziert (Chenevard et al., 2003).

Scavenger Rezeptoren stellen eine Familie von strukturell unterschiedlichen Rezeptoren mit einer breiten Ligandenspezifität dar (Platt et al., 1998). Neben acetyliertem oder oxidierten Lipoprotein binden sie auch eine ganze Reihe anderer strukturell nicht verwandter Substanzen, zu denen fibrilläres β -Amyloid (fA β), Thrombospondin-1 und polyanionische Polysaccharide gehören (Alarcón et al., 2005). Zusätzlich werden sie in unterschiedlichen Geweben von verschiedenen Zelltypen exprimiert, was auf wichtige physiologische Funktionen dieser Rezeptoren schließen lässt (Platt et al., 1998). Sie könnten vielerlei Funktionen übernehmen wie beispielsweise in der erworbenen und angeborenen Immunabwehr (Pearson, 1996). Auch eine Beteiligung an der Beseitigung von Endotoxinen ist möglich (Hawarth et al., 1996). Scavenger Rezeptoren sind zudem attraktive Kandidaten für Rezeptoren zur Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen, da ihre Liganden durch Modifikationen wie Oxidation oder Glykosylierung charakterisiert sind. Genau diese Veränderungen sind auch auf apoptotischen Zellen zu finden (Rigotti et al., 1995).

Eine ganze Reihe von SR's wurden bislang identifiziert, die in sechs Klassen unterteilt werden können (Abb. 5).

Die erste Klasse wird von den trimeren Glykoproteinen SR-AI, SR-AII und MARCO repräsentiert. SR-AI und SR-AII sind alternative Transkripte desselben Gens. Sie werden durch eine gewundene kollagene Domäne charakterisiert, die auch eine Bindestelle für acetyliertes LDL (acLDL) besitzt (Pearson, 1996). Sie unterscheiden sich durch die Anwesenheit einer C-terminalen Cystein-reichen Domäne bei SR-AI (Platt et al., 1998).

Die SR's der Klasse B besitzen alle eine extrazelluläre Domäne mit einer C-terminalen Region, die konservierte Cystein-Reste enthält (Krieger and Hertz, 1994; Pearson, 1996). Zu ihnen zählt auch CD36.

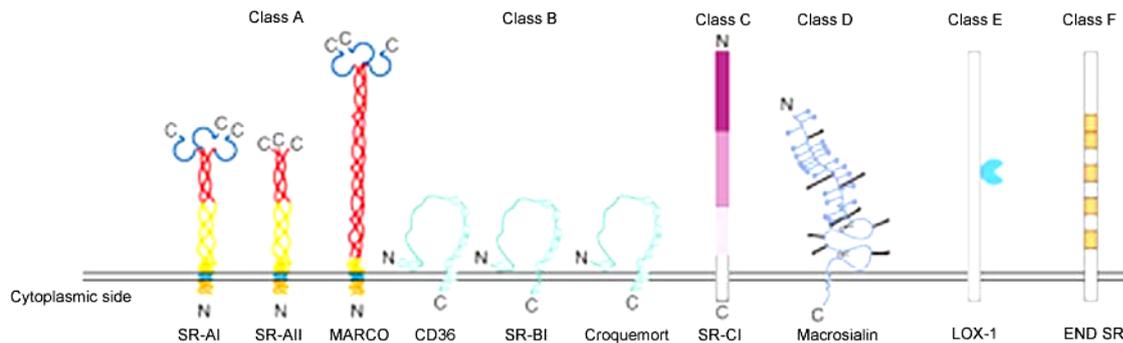


Abbildung 5: Scavenger-Rezeptor-Familien. Sechs Familien von SR's konnten bislang aufgrund ihrer strukturellen Homologien und Liganden-Bindungseigenschaften identifiziert werden (Platt, da Silva and Gordon et al., 1998).

SR-CI ist das einzige Mitglied der Klasse C und wurde in *Drosophila* isoliert. SR-CI besitzt multiple Domänen, die Regionen enthalten, die homolog zu Proteinen von Vertebraten sind (Pearson, 1996). Macrosialin bildet die Klasse D. Es ist ein Mitglied der Familie der lysosomal-assoziierten Membranproteine (LAMP) (Platt et al., 1998). Klasse E und Klasse F werden ebenfalls von einem einzigen Mitglied repräsentiert. Sie werden als LOX-1 (Sawamura et al., 1997) bzw. END SR (Adachi et al., 1997) bezeichnet und werden beide von Endothelzellen exprimiert.

1.6.1 CD36

CD36 gehört zur Klasse B der Scavenger Rezeptoren. Das Protein ist am N-Terminus stark glykosyliert, was anscheinend einen gewissen Schutz vor Degradation in Proteinase-reichen Umgebungen wie z.B. Lysosomen oder inflammatorischen Bereichen vermittelt (Gruarin et al., 2000). Hochkonservierte Homologe von CD36 finden sich innerhalb der Vertebraten, aber auch in *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* (Franc et al., 1996).

In der Peripherie wird CD36 von einer Reihe unterschiedlicher Zelltypen exprimiert, zu denen Makrophagen, mikrovaskuläre Endothelzellen, Thrombozyten, Adipozyten (Zellen des Fettgewebes) und Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) gehören (Febbraio et al., 2001; Huh et al., 1995). CD36 wird außerdem auf Mikroglia des humanen adulten Gehirns, sowie auf primären neonatalen Mikroglia und murinen N9-Zellen exprimiert (Coraci et al., 2002).

CD36 ist ein Rezeptor für oxLDL und übernimmt somit eine wichtige Funktion in der Schaumzellbildung von Makrophagen und in der Pathogenese der Atherosklerose (Endemann et al., 1993). Desweiteren bildet CD36 zusammen mit $\alpha_v\beta_3$ Integrin einen Rezeptor-Komplex, der sich auf der Oberfläche von Phagozyten befindet und an der Beseitigung von apoptotischen Zellen beteiligt ist (Bird et al., 1999).

CD36 scheint auch in die proinflammatorischen Ereignisse des Morbus Alzheimer (AD) involviert zu sein, in dem es die Interaktion von Mikroglia und Makrophagen mit fibrillärem A β (fA β) vermittelt. Es wird im Gehirn von Alzheimer-Patienten von Mikroglia verstärkt exprimiert und fungiert hier als Rezeptor für fA β 1-42 (Coraci et al., 2002; Moore et al., 2002). Mikroglia und Makrophagen, die aus CD36-defizienten Mäusen isoliert wurden, zeigten eine signifikante Reduktion in der fA β - induzierten

Sekretion von Chemokinen, Zytokinen und ROS (*reactive oxygen species*) (El Khoury et al., 2003). In diesem Zusammenhang konnte ein Rezeptorkomplex identifiziert werden, der neben CD36 auch CD47 und $\alpha_6\beta_1$ -Integrin umfasst. Antagonisten dieser Rezeptormoleküle inhibierten eine Adhäsion von THP-1 Monocyten an fA β sowie die A β -stimulierte Tyr-Kinase-Signalkaskade (Bamberger et al., 2003).

1.6.2 SR-A

SR-A gehört zur Klasse A der Scavenger Rezeptoren (Pearson, 1996) und beinhaltet eine charakteristische kollagene Domäne, die für die Erkennung von modifiziertem Lipoprotein wie oxLDL oder acLDL erforderlich ist (Doi et al., 1993). Verschiedene Reste, die diese Domäne umspannen, aber auch die Konformation und somit die Interaktion zwischen den Domänen scheinen relevant bei der Erkennung von Liganden zu sein (Andersson and Freeman, 1998; Resnick et al., 1996). Der evolutionäre Ursprung der SR-A Isoformen ist ungeklärt. Obwohl andere Scavenger Rezeptoren in Invertebraten identifiziert wurden, konnten keinerlei Homologe von SR-A in *Caenorhabditis elegans* oder *Drosophila melanogaster* gefunden werden. In Vertebraten hingegen scheint SR-A verbreitet zu sein (Platt and Gordon, 2001).

SR-A wird in erster Linie in der Peripherie konstitutiv von mononukleären Phagozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen (DC's) und Kupffer Zellen in verschiedenen Organen wie Milz, Leber, Herz und Darm exprimiert (Yamada et al., 1998). SR-A werden, wie auch den übrigen SR's, unterschiedliche Funktionen zugesprochen, die bei weitem noch nicht vollständig geklärt sind.

SR-A wird unter anderem im Thymus exprimiert, wo es an der Beseitigung unreifer Thymozyten beteiligt ist (Platt et al., 1996). Man geht weiterhin davon aus, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen eine universelle Eigenschaft aller SR's darstellt, da sie für alle bislang identifizierten SR's demonstriert werden konnte (Platt and Gordon, 1998). Neben phagozytären Eigenschaften wird SR-A auch eine mögliche Rolle bei der Adhäsion von Makrophagen zugesprochen. Die Rekrutierung und Retention in relevanten Organregionen ist erforderlich für eine angemessene Funktion von Makrophagen (El Khoury et al., 1994). Zudem scheint SR-A ebenfalls in die Immunabwehr bzw. die angeborene Immunität involviert zu sein, da es hauptsächlich von Makrophagen exprimiert wird und durch die Bindung bakterieller Moleküle an der Infektabwehr beteiligt sein könnte (Krieger and Herz, 1994; Pearson, 1996; Hughes, Fraser and Gordon, 1995).

SR-A findet man aber nicht nur in der Peripherie. Im Gehirn erwachsener Mäuse wird SR-A von Mato-Zellen (perivaskuläre Makrophagen) in geringem Maße exprimiert (Honda et al., 1998). Eine Expression von Endothelzellen wird ebenfalls nicht ausgeschlossen (Lucarelli et al., 1997). Auch neonatale primäre Mikroglia und N9-Zellen, eine neonatale Mikroglia-Zelllinie, exprimieren SR-A (El Khoury et al., 1996; Husemann and Silverstein, 2001).

Während der Alzheimer-Erkrankung wird SR-A verstärkt von aktivierten Mikroglia exprimiert, die mit den amyloiden Plaques assoziiert sind (Christie et al., 1996; Honda et al., 1998), was die Vermutung zulässt, dass SR-A, ähnlich wie CD36, in die AD-Pathogenese involviert ist (Husemann et al., 2002). In APP23-Mäusen, einem transgenen Mausmodell für AD, konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. SR-A wird hier von Mikroglia exprimiert, die mit parenchymalen und vaskulären

Amyloidablagerungen assoziiert sind (Bornemann et al., 2001). Ob die SR-A Expression allerdings durch eine direkte Interaktion von Mikroglia mit fA β und/oder durch Zytokine und Chemokine induziert wird, ist noch unzureichend geklärt (Husemann et al., 2002). SR-A scheint zumindest an der Bindung und Phagozytose von fA β 1-42 beteiligt zu sein (El Khoury et al., 1996; Paresce et al., 1996). In neonatalen Mikroglia SR-A-defizienter Mäuse wurde bis zu 50% weniger fluoreszenzmarkiertes fA β 1-42 gebunden und phagozytiert als in den Kontrollen (Chung et al., 2001; Husemann et al., 2001a). Allerdings zeigten SR-A^{-/-}-Mäuse, die das humane Amyloid-Vorläuferprotein überexprimierten (PDAPP), keine veränderte Pathologie im Vergleich zu den Wildtypkontrollen. Die Interaktion von SR-A und fA β scheint also keinen Effekt auf die Entwicklung der AD-Pathogenese zu haben (Huang et al., 1999). Folglich könnte die Funktion von SR-A mit der anderer SR's überlappen bzw. von ihnen kompensiert werden.

1.7 Chemokine

Chemokine sind Zytokine, die eine Superfamilie kleiner, induzierbarer, häufig proinflammatorischer Mediatoren bilden, die primär chemotaktisch wirken und verschiedene Subtypen von Leukozyten spezifisch aktivieren können. Mit über 40 eng verwandten Mitgliedern sind Chemokine die größte bekannte Zytokin-Familie (Balkwill, 1998). Das möglicherweise am besten untersuchte Chemokin ist CXCL8 (Interleukin-8), das im Jahre 1986 als erstes Chemokin von Marco Baggiolini entdeckt wurde. Aufgrund der Position der aminoterminalen Cysteine werden 4 Klassen unterschieden: α CXC, β CC, γ C und δ CX₃C (Premack and Schall, 1996; Baggiolini et al., 1997; Bazan et al., 1997; Legler et al., 1998; Zaballos et al., 1999). Chemokine vermitteln ihre Aktivität über G-Protein gekoppelte Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptoren (7-TMD) (Balkwill, 1998). Diese Rezeptoren werden entsprechend ihrer Liganden bezeichnet: CXCR (1-5), CCR (1-9), CR und CX₃CR (Xia, 2000).

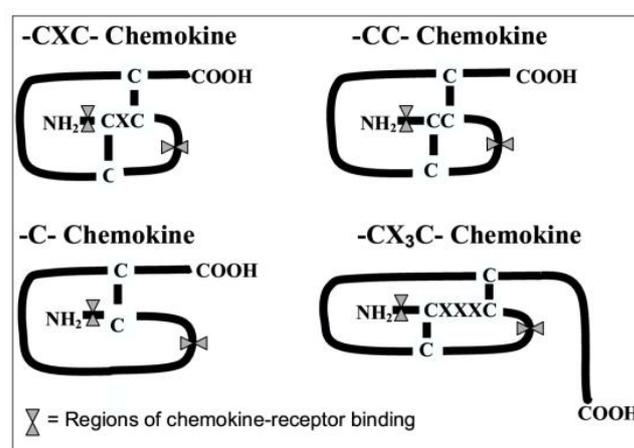


Abbildung 6: Chemokin-Familien. Chemokine können in 4 Klassen unterschieden werden. Sie vermitteln ihre Aktivität über G-Protein gekoppelte Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptoren (7-TMD) (www.rbej.com).

Neben ihrer Beteiligung bei entzündlichen Prozessen regulieren Chemokine auch die Formierung neuer Blutgefäße in der Wundheilung und Tumorgenese (Folkman and D'Amore, 1996). Weiterhin

sind CXCL12 und der Rezeptor CXCR4 in die neuronale Migration und axonale Entwicklung im ZNS involviert (Stumm and Höllt, 2007). CXCL12- und CXCR4-defiziente Mausembryonen zeigten eine abnormale zerebrale Entwicklung zusammen mit kardiologischen und hämatopoietischen Defekten (Ma et al., 1998; Zou et al., 1998).

Während einer Prion-Infektion werden die Chemokine CXCL10, CXCL13, CCL 6, CCL 9 und CCL 12 im ZNS stark überexprimiert. (Baker et al., 2002; Riemer et al., 2000; Riemer et al., 2004; Xiang et al., 2004) Über ihre mögliche Rolle oder Funktion während der Erkrankung wird derzeit noch spekuliert. So könnten sie möglicherweise in die Interaktion von Glia bzw. Glia und Neuronen involviert sein (Xia et al., 2000) und auch für die Migration von Mikroglia zu Regionen mit Neuronenschäden bzw. mit Amyloid-Ablagerungen verantwortlich sein. Möglich ist auch ein Induktionssystem zur Aktivierung von Mikroglia (Rappert et al., 2002).

1.7.1 CXCL13

CXCL13 (BLC, BCA-1) gehört zu der Familie der CXC-Chemokine. Es ist in der Peripherie als „*B-lymphocyte chemoattractant*“ bekannt, das spezifisch chemotaktisch auf B-Lymphozyten wirkt. CXCL13 wird sehr stark in den Follikeln der Peyerschen Plaques, der Milz und den Lymphknoten exprimiert (Gunn et al., 1998). Zu den Zellen, die CXCL13 exprimieren, gehören unter anderem FDC's und GCDC's (*germinal center dendritic cells*) (Vissers et al., 2001). CXCL13 ist wichtig für die Migration von B-Lymphozyten in die Follikel der sekundären lymphatischen Organe, was essentiell für ein funktionsfähiges Immunsystem ist (Legler et al., 1998). In der Peripherie vermittelt CXCL13 seine Aktivität vor allem über den Rezeptor CXCR5 (BLR-1), der von reifen B- und T-Zellen exprimiert wird (Legler et al., 1998; Gunn et al., 1998). CXCR 3 scheint aber ebenfalls ein möglicher Rezeptor für CXCL13 zu sein. Über diesen Rezeptor induziert CXCL13 eine Chemotaxis von aktivierten T-Zellen. Diese kann durch einen anti-humanen CXCR3-Antikörper inhibiert werden (Jenh et al., 2001). Zudem ist CXCL13 möglicherweise an der Migration von B- und T- Zellen in die Follikel der sekundären lymphatischen Organe, aber auch an der Interaktion von DC's mit B- und T-Zellen beteiligt zu sein (Vissers et al., 2001).

Im ZNS wurde CXCL13 bislang kaum beschrieben. Es konnte festgestellt werden, dass es während der Scrapie-Pathogenese im ZNS stark überexprimiert wird (Riemer et al., 2000). Seine möglichen Funktionen im ZNS bzw. während der Erkrankung sind bisher nicht bekannt.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die Scavenger Rezeptoren CD36 und SR-A wurden bereits im Zusammenhang mit Alzheimer beschrieben, wo sie im erkrankten Gehirn als Rezeptoren für fA β 1-42 fungieren (Coraci et al., 2002; El Khoury et al., 2003). Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von CD36 und SR-A auf die Scrapie-Pathogenese zu untersuchen. Dazu sollten CD36-, SR-A- und CD36/SR-A-Knockout-Mäuse im Vergleich zu C57Bl/6-Kontrollmäusen mit dem Scrapie-Stamm 139A intracerebral und intraperitoneal infiziert werden. Zunächst sollten die Überlebenszeiten der Tiere verglichen werden und im Anschluss

wichtige Parameter der Scrapie-Pathogenese im Gehirn untersucht werden. Ein Teil der Untersuchungen sollte auf immunhistologischer Ebene erfolgen (Astrozytose, Mikrogliose, PrP^{Sc}-Ablagerung, spongiforme Veränderungen). Die so erlangten Ergebnisse sollten durch Expressionsanalysen (real-time QPCR) bestätigt und ergänzt werden.

Chemokine sind praktisch bei allen Erkrankungen des ZNS stark hochreguliert. Zu den Liganden des Chemokin-Rezeptors CXCR3 gehören CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13 und CCL21. CXCL13 kann als Ligand von CXCR3 und CXCR5 theoretisch die Migration von T- und B-Zellen induzieren, die aber, wie bereits erwähnt, bei einer Scrapie-Infektion im Gehirn nicht auftritt. Der Rezeptor CXCR3 wird jedoch im ZNS von Mikroglia, Astrozyten und Neuronen exprimiert, was darauf hinweist, dass neben einer möglichen Beteiligung an der Einwanderung von Lymphozyten in das ZNS, CXCR3-Liganden bei der Kommunikation zwischen Glia bzw. zwischen Glia und neuronalen Zellen auch eine Rolle spielen könnten. Das derzeitige Verständnis der Funktion von CXCR3-Liganden im ZNS ist, insbesondere was die Kommunikation zwischen Glia bzw. Glia und Neuronen betrifft, bestenfalls als lückenhaft zu bezeichnen. Die Funktion der CXCR3-Liganden im ZNS ist möglicherweise nur zu verstehen, wenn angenommen wird, dass verschiedene CXCR3-Liganden die verschiedenen Rezeptor-exprimierenden Zelltypen (Mikroglia, Astrozyten, Neuronen sowie eventuell Oligodendrozyten) unterschiedlich adressieren. Andernfalls ist eine Situation in der Mikroglia, Astrozyten und Neuronen den Rezeptor CXCR3 exprimieren und gleichzeitig große Mengen an CXCR3-Liganden sezerniert werden, nur schwer zu erklären. Die Rolle der CXCR3-Liganden bei der Aktivierung von Glia und der chronischen Neurodegeneration bedarf daher weiterer Untersuchungen, nicht zuletzt um zu klären, ob CXCR3 ein potentielles Ziel für eine therapeutische Intervention bei chronisch neurodegenerativen Erkrankungen darstellt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll mithilfe von Expressionsstudien im Gehirn uninfizierter und Scrapie-infizierter Mäuse die Rolle von CXCL13, das während der Scrapie-Pathogenese frühzeitig und stark hochreguliert wird, untersucht werden. Des Weiteren sollen CXCL13-transgene Mäuse generiert und molekularbiologisch sowie immunhistologisch charakterisiert werden. Weiterhin soll untersucht werden, ob die konstitutive, astrozytäre Überexpression von CXCL13, die durch die Verwendung eines GFAP-Promotors erreicht werden soll, den Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen beeinflusst.

Die Untersuchungen zur Aufklärung der Rolle und Funktion von Scavenger Rezeptoren und Chemokinen während der Scrapie-Pathogenese sollen zu einem besseren Verständnis der TSE-Pathogenese führen.

2 Material

2.1 Allgemeine Materialien und Bezugsquellen

2.1.1 Versuchstiere

C57Bl/6-Mäuse	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, sowie Weill Medical College of Cornell University, New York, USA
SR-A-defiziente Mäuse	Weill Medical College of Cornell University, New York, USA
CD36-defiziente Mäuse	Weill Medical College of Cornell University, New York, USA
CD36/SR-A-defiziente Mäuse	Weill Medical College of Cornell University, New York, USA
CXCL13-transgene Mäuse	eigene Zucht

Die C57Bl/6-Maus-Linie aus den USA sowie die SR-A bzw. die CD36-defizienten Mäuse sind alle von den CD36/SR-A-defizienten Mäuse durch Kreuzung mit C57Bl/6 abgeleitet, und wurden dann von Dr. M. Febbraio als eigene Linien weitergeführt. Die ursprüngliche CD36/SR-A Linie war bereits über 6 Generationen auf C57Bl/6 rückgekreuzt. Sie besitzen also alle den gleichen genetischen Hintergrund von C57Bl/6. Gleiches gilt auch für die CXCL13-transgenen Mäuse.

2.1.2 Scrapie-Stamm

Für die Infektionsversuche wurde der Erregerstamm 139A verwendet (zur Verfügung gestellt von R.H. Kimberlin, Edinburgh/UK) (Pattison and Jones, 1968).

2.1.3 Zelllinien

Für die Transfektionen wurde ausschließlich die humane Glioblastoma-Zelllinie SNB-19 verwendet (Gross et al., 1985).

2.1.4 *E. coli*-Stämme

Für sämtliche Klonierungen wurden TOP10 Shot® Electrocomp™ *E. coli* (Invitrogen) verwendet.

Diese Zellen enthalten folgende genetische Marker:

F^- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* *D(ara-leu)*7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*.

2.1.5 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Life Technologies, San Fransisco/USA
Ameisensäure (98-100%)	Merck, Darmstadt
Ammonium Nickel(II) Sulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Brij 35-Lösung	Merck, Darmstadt
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Casein	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Citronensäure-Monophosphat	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Taufkirchen
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Eosin G	Chroma, Köngen
Esel-Normalserum	Dianova, Hamburg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Guanidiniumthiocyanat	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Gibco BRL, Eggenstein
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	TSI, Zeven
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Fluka, Taufkirchen

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhypochlorid	Sigma, Deisenhofen
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraffin	Roth, Karlsruhe
Pepton	Difco, Detroit/USA
Sephadex-G25	Pharmacia, Freiburg
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Gibco BRL, Eggenstein
Tissue freezing medium	Jung, Nussloch
Tris	Sigma, Deisenhofen
Trizol	Invitrogen, Leek/NL
Tween 20	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe

2.1.6 Fertigkits

Dneasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
DuoSet ELISA Development System mouse I-TAC/CXCL11	R&D Systems, Wiesbaden
First-Strand cDNA Synthese-Kit	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Megaprime DNA-labelling Kit	Amersham Pharmacia, Braunschweig
RNeasy Protect Mini Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Quantikine mouse BLC/BCA-1 ELISA	R&D Systems, Wiesbaden

2.1.7 Enzyme und Proteine

BLC (M-17) Blocking peptide	Santa Cruz, Santa Cruz/USA
CIP	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
DNase I	Ambion, Huntingdon/UK
Klenow-Fragment	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Boeringer, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Recombinant murine GM-CSF	Peprtech, Rocky Hill/USA
RNase A	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
Uracil-N-Glycosylase	USB Corp., Cleveland/USA

2.1.8 Sonstige Materialien

8 well Platten (PET Blot)	Nunc, Roskilde/DK
Blotting Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Dako-Pen	Dako, Carpintera/USA
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Development Folder	Tropix, Bedford/UK
Dynabeads	Dynal Biotech ASA (Invitrogen), Oslo/Norwegen
DPX (Eindeckmedium)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Einbettkassetten	Roth, Karlsruhe
Falcon-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Glaswaren	Schott, Mainz
Histokinetten	Leica, Solms
Nitrocellulosemembran	Bio-Rad, Richmond/USA
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Optische Deckel für TaqMan-PCR	Applied Biosystems, Foster City/USA
Optische Röhrchen für TaqMan-PCR	Applied Biosystems, Foster City/USA

PCR-Pipettenspitzen mit Aerosolschutz	Biozym, Hess. Oldendorf
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen	Roth, Karlsruhe
PVDF-Membran	Millipore, Bedford/UK
Reaktionsgefäße	Neolab, Heidelberg
Sarstedt-Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Sterile Spritzen und Kanülen	Braun, Melsungen
Zellkultur Flaschen	TPP AG, Trasadingen/Schweiz
Zellkultur Testplatten	TPP AG, Trasadingen/Schweiz

2.2 Puffer und Lösungen

2.2.1 Selbsthergestellte Puffer und Lösungen

Ampicillin Lösung	10 mg/ml Ampicillin (1:500 verdünnt)
Assay-Puffer (pH 9.5)	100 mM Tris; 100 mM NaCl
Blotpuffer	48 mM Tris; 38 mM Glycin; 0,037% SDS
Citrat-Puffer (pH 6.0)	1,8 mM Citronensäurelösung, 8,2 mM Na-Citratlösung
DNA-Auftragspuffer	
FKS/PBS (10%), 100ml	10 ml FKS, 90 ml PBS
Kanamycin Lösung	10 mg/ml Kanamycin (1:400 verdünnt)
Laemmli-Elektrophoresepuffer	250 mM Tris/HCl; 1%SDS; 1,92 M Glycin
Lysis-Puffer WB	10 mM Tris/HCL (pH 7,5); 100 mM NaCL; 10 mM EDTA; 0,5 % Triton-X 100; 0,5 % Na-deoxcholat
NTM	100 mM Tris/HCl (pH 9,5); 100 mM NaCl; 50 mM MgCl ₂
PBS (pH7.2), 10x	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Proteinase K Puffer	10 mM Tris; 100 mM NaCl; 0,5 % Brij 35
Stopplösung	20 mM EDTA/TBS
TAE-Puffer	0,04 M Tris; 0,001 M EDTA
TBS	50 mM Tris; 1 M NaCl

TBST	TBS; 0,00% (w/v) Tween20
TNE-Puffer	50 mM Tris/HCL (pH 7,5); 150 mM NaCL; 5 mM EDTA

2.2.2 Fertiglösungen

Blot-Transfer-Puffer	Ambion, Huntingdon/UK
Denaturierungs-Gel-Puffer (10x)	Ambion, Huntingdon/UK
DNA-Längenstandard 100bp	Invitrogen, Leek/NL
DNase-Puffer (10x)	Ambion, Huntingdon/UK
Formaldehyd-Load-Puffer	Ambion, Huntingdon/UK
Formaldehydlösung 4%; phosphatgepuffert	Roth, Karlsruhe
Glycergel	Dako, Carpinteria/USA
Hybridisierungspuffer (10x)	Ambion, Huntingdon/UK
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
MOPS (10x)	Ambion, Huntingdon/UK
PCR Master Mix	Promega, Madison, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Phusion Master Mix	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
SYBR-Green Master Mix	Stratagene, La Jolla/USA
Trypsin Sol 0,25 %	Gibco BRL, Eggenstein
Wash Solution	Ambion, Huntingdon/UK

2.3 Antikörper, Konjugate und Substrate

AEC	Dako, Carpinteria/USA
Anti-4H11	Pers. Mitteilung
Anti-6H4	Prionics, Planegg-Martinsried
Anti-Aß 1-40	Chemicon, Temecula/USA

Anti-A β 1-42	Chemicon, Temecula/USA
Anti-BLC (M-17)	Santa Cruz, Santa Cruz/USA
Anti-CD36 (V-19)	Santa Cruz, Santa Cruz/USA
Anti-Galektin-3	Abcam, Cambridge/UK
Anti-GFAP	Dako, Carpinteria/USA
Anti-GFAP Cy3	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Iba-1	Wako, Neuss
Anti-SRA (A-20)	Santa Cruz, Santa Cruz/USA
BCIP-Färbelösung (4ml)	0,1 g BCIP; 4 ml DMF
CDP-Star	Tropix, Bedford/USA
DAB (3,3 Diaminobenzidine)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EaK-Bio	Amersham, Little Chalfont/UK
EaZ-Bio	Amersham, Little Chalfont/UK
EaZ-Cy2	Dianova, Hamburg
ICSM-18	Pers. Mitteilung
NBT-Färbelösung (4ml)	0,2 mg Nitro Blue Tetrazolium; 2,8 ml DMF; 1,2 ml Ethanol
Streptavidin horseradish peroxidase conjugate	Amersham, Little Chalfont/UK
Thioflavin	Sigma-Aldrich, Steinheim
ZaM-AP	Dako, Carpinteria/USA

2.4 Medien

2.4.1 Medien zur Kultivierung von *E.coli*

LB Medium (pH 7.5)	10 g Pepton/Trypton; 10 g NaCl; 5g Hefeextrakt
LB Agar	wie LB Medium: 1,5 % Agar
SOC	Invitrogen, Leek/NL

2.4.2 Medien zur Kultivierung von SNB19-Zellen

Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (D-MEM) Gibco BRL, Eggenstein

2.4.3 Medien zur Kultivierung von Follikulären Dendritischen Zellen (FDC's)

RPMI-1640 Sigma-Aldrich, Steinheim

2.5 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

pCR2.1-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pEGFP-1/GFAP	Pers. Mitteilung H. Kettenmann
pEGFP-N1	Clontech, Mountain View/USA
pBLC400v	Eigenes Konstrukt
pBLC400u	Eigenes Konstrukt
pBLC600v	Eigenes Konstrukt
pBLC600u	Eigenes Konstrukt

2.6 Oligonukleotid-Primer

Alle Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert und geliefert.

Primer zur Herstellung der Konstrukte:

TB1	5'-GAT CGA TCG AGG ATC CGA GCT AAA GGT TGA ACT CCA CCT C-3'	Amplifizierung der murinen CXCL13-Sequenz; Einbringen einer BamHI-Schnittstelle
TB2	5'-GAT CGA TCG AGG ATC CGA GCT AAA GGT TGA ACT CCA CCT CCA GCC ACC ATG AGG CTC AGC ACA GCA ACG CTG C-3'	Amplifizierung der murinen CXCL13-Sequenz; Einbringen einer BamHI-Schnittstelle und einer modifizierten Kozak-Sequenz
TB3	5'-GAT CGA TCG AGC GGC CGC GAA CAT ATC TAA AAT TCA GAG CAG G-3'	Amplifizierung der murinen CXCL13-Sequenz; Einbringen einer NotI-Schnittstelle; verkürzte 3'UTR

TB4	5'-GAT CGA TCG AGC GGC CGC CAA CGG AGC TTG AGC ATT CCC TCT C-3'	Amplifizierung der murinen CXCL13-Sequenz; Einbringen einer NotI-Schnittstelle
TB5	5'-CAT CGC CAG TCT AGC CCA CT-3'	Kontrolle der Transformanden; Typisierung der transgenen Mäuse
TB6	5'-GAA CAT ATC TAA AAT TCA GAG CAG G -3'	Kontrolle der Transformanden
TB7	5'-CCT CTA CAA ATG TGG TAT GGC TG-3'	Typisierung der transgenen Mäuse
TB8	5'-TTC TAG GCC TGT ACG GAA GTG TTA C-3'	Sondenherstellung für Northern von CXCL13-Expression
TB9	5'-CAC TGC ATT CTA GTT GTG GTT TGT CC-3'	Sondenherstellung für Northern von CXCL13-Expression
β-Aktin hin	5'-CGC TCG TTG CCA ATA GTG AT-3'	Sondenherstellung für Northern von β-Aktin-Expression Kontrolle der cDNA
β-Aktin rück	5'-AAG GCC AAC CGT GAA AAG AT-3'	Sondenherstellung für Northern von β-Aktin-Expression Kontrolle der cDNA

Primer für die quantitative *real-time* PCR:

GFAP	hin	5'-GCG GGA GTC GGC CAG TTA CC-3'
	rück	5'-GAC CTC ACC ATC CCG CAT CT-3'
GAPDH	hin	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'
	rück	5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'
Galektin-3	hin	5'-GCT GCT GGC CCT TAT GGT GT-3'
	rück	5'-CAA AGG GGA AGG CTG ACT GT-3'
Iba-1	hin	5'-GCT GAA GGC CCA GCA GGA AG-3'
	rück	5'-GCT GAA CGT CTC CTC GGA GC-3'
CXCL13 (BLC)	hin	5'-GAG GCT CAG CAC AGC AAC GCT GC-3'
	rück	5'-GGA GCT CTT CTC TTA CTC ACT GG-3'
CXCL13_2 (BLC)	hin	5'-GAA GCC CAT TAC ACA AAC TT-3'
	rück	5'-GGG CGT AAC TTG AAT CCG AT-3'

CXCL10 (IP-10)	Hin rück	5'-AAG TGC TGC CGT CAT TTT CT-3' 5'-ATA ACC CCT TGG GAA GAT GG-3'
CXCL9 (Itac)	hin rück	5'-GCT GCG ACA AAG TTG AAG TGA-3' 5'-GTT TTA CTA CAC ACA GAG ATG C-3'
Lysozym-M	hin rück	5'-GGG AAA CAG CAG TCG TGT G-3' 5'-CTG GGA ACA TCC TCT CAA GG-3'
CCL3 (MIP-1 α)	hin rück	5'-ACT GCC CTT GCT GTT CTT CT-3' 5'-CTG CCG GTT TCT CTT TAG TCA-3'
OAS	hin rück	5'-GGT CTC TGA GCT TCA AGC TGA G-3' 5'-TAC TGT GGA GGC AAT GGC TTC-3'
RAGE	hin rück	5'-TCC CGA TGG CAA AGA AAC AC-3' 5'-TGG GCA GAG ATG GCA CAG GT-3'
CCL5 (Rantes)	hin rück	5'-TGC CCA CGT CAA GGA GTA TT-3' 5'-CAG GAC CGG AGT GGG AGT A-3'

2.7 Geräte

Name	Bezugsquelle
Blotkammer, Gießvorrichtung, Power Supply	BioRad, Richmond/USA
Digitalkamera	Zeiss, Jena
Einbettautomat	Mikrom, Walldorf
Elektrophoresekammer, Gießvorrichtung, Power Supply	BioRad, Richmond/USA
Elektrotransformationsgerät	BioRad, Richmond/USA
Entwässerungsautomat	Leica, Solms
Feinwaagen	Sartorius, Göttingen
Histokinetten	Leica, Solms
Hybridisierungsofen	Heraeus, Hanau
Kryostat	Mikrom, Walldorf

Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Magnetic Immunostaining Trays	Cellpath, Newton/UK
Magnetrührer	IKA, Staufen
Mikroskop	Zeiss, Jena
Mikrowelle	Sharp, Hamburg
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Real Time PCR Cycler	Stratagene, La Jolla/USA
Schlittenmikrotom	Mikrom, Walldorf
Spectrophotometer	Amersham, Little Chalfont/UK
Stereomikroskop	Leica, Solms
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen	Heraeus, Hanau
Trockenschränke	Heraeus, Hanau
Ultra-Turrax	IKA, Staufen
Vortex-Mixer	Neolab, Heidelberg
Wasserbad	Vogel, Oostsingel/NL
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

3 Methoden

3.1 Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit infektiösem Material

Der Scrapie-Erreger wird der Risikogruppe 2 zugeordnet. Es gibt keinerlei Hinweise darauf, dass Scrapie auch humanpathogen ist. Es wurde in allen Laboren Schutzkleidung getragen. Bei Arbeiten im Tierstall und im Histologiebereich sowie bei Arbeiten mit hoch infektiösem Material wurden spezielle, autoklavierbare Schutzkittel getragen. Beim Schneiden mit Mikrotom und Kryotom wurden Unterhandschuhe aus schnittfester Faser, schnitt- und stichfeste Nitrilhandschuhe, sowie eine OP-Maske getragen. Glaswaren und Einwegmaterialien wurden in getrennten Edelstahlwannen autoklaviert (134 °C; 1 h; 3,3 bar). Die Desinfektion hitzelabiler, wiederverwendbarer Gegenstände erfolgte über Nacht in 0,3 M NaOH und 2 % SDS. Kontaminierte Flächen wurden mit 2 M NaOH (1 h Einwirkzeit) desinfiziert.

3.2 Tierversuch

3.2.1 Tierhaltung

CD36/SRA-Knockout-Mäuse, alters- und geschlechtsgleiche Kontrollmäuse (C57Bl/6-Mäuse), sowie CXCL13 transgene Mäuse und ihre Wurfgeschwister wurden im Robert Koch-Institut in einem klimatisierten Tierstall bei 20 °C und einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Nahrung und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Der Gesundheitszustand wurde regelmäßig durch veterinärmedizinische Kontrollen überwacht, wobei die Tiere auf verschiedene Viren, Bakterien und Parasiten getestet wurden. Somit konnte sichergestellt werden, dass die Tiere frei von anderen Infektionen waren.

3.2.2 Infektion, Diagnostik und Tötung der Versuchstiere

Für die Infektion wurden 5-6 Wochen alte Mäuse verwendet. Sie wurden intracerebral (i.c.) und intraperitoneal (i.p) mit verschiedenen Infektionsdosen (10^{-1} bzw. 10^{-5}) eines zehnpromzentigen Hirnhomogenats infiziert. Das Hirnhomogenat stammte aus einem Pool terminal erkrankter Mäuse, die mit dem Scrapie-Stamm 139A (zur Verfügung gestellt von R.H. Kimberlin, Edinburgh/UK) infiziert waren. Es wurden jeweils 20 µl des Hirnhomogenats gespritzt. Die Tiere wurden zweimal wöchentlich auf das Auftreten typischer Scrapie-Symptome untersucht. Hierzu wurden folgende Kriterien für die klinische Diagnostik zugrunde gelegt: Verhalten (Apathie und Nervosität), Konstitution (Gewichtsverlust und Beschaffenheit des Fells) und Bewegungsstörungen (Ataxie). Ein Teil der infizierten Tiere wurde bereits zu einem frühen Zeitpunkt, 125 Tage nach der Infektion, getötet. Dieser Zeitpunkt entsprach einem klinisch asymptomatischen Krankheitsstadium. Die restlichen Tiere wurden jeweils bei Erreichen des terminalen Krankheitsstadiums getötet. Dieser Zeitpunkt wurde erreicht, wenn aufgrund der klinischen Symptomatik mit dem Tod der Tiere innerhalb der nächsten 48 h zu rechnen war. Dazu zählten ein starker Gewichtsverlust, eine Hinterbeinlähmung und völlige

Bewegungslosigkeit. Die Tötung erfolgte durch Genickbruch. Nach der Entnahme der Gehirne und Milzen für die nachfolgenden Untersuchungen wurden die Tierkörper obduziert, um mögliche Veränderungen anderer Organsysteme feststellen zu können. Die Entnahme der Organe erfolgte unmittelbar nach der Tötung. Je nach Verwendungszweck wurden sie unterschiedlich fixiert (siehe Punkt 3.3.1).

3.2.3 Statistik

Die statistischen Unterschiede bei den Überlebenszeiten zwischen den einzelnen Gruppen wurden mithilfe des „logrank test“ ermittelt. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse ab einem Wert von $p < 0,05$ bewertet.

3.3 Immunhistochemie

3.3.1 Gewebefixierung

Nach der Entnahme der Organe wurden sie je nach Verwendungszweck unterschiedlich fixiert. Eine Fixierung des Gewebes ist notwendig, um eine postmortale Veränderung des Gewebes zu verhindern. Die hierfür verwendeten Fixierungslösungen verhindern zum einen die Autolyse durch Inaktivierung lysosomaler Enzyme. Zum anderen wird durch sie das Wachstum von Fäulnisbakterien und Schimmelpilzen unterbunden, die verfallsartige Veränderungen verursachen (Verwesung). Zugleich stabilisieren Fixative Zellen und Gewebe (Strukturfestigung), so dass diese vor mechanischen Verletzungen während der Gewebeerarbeitung und des Färbeprozesses geschützt sind.

Gewebe, die für Paraffinschnitte vorgesehen waren, wurden zunächst für 24 Stunden bei 4 °C in einer 4 %-igen phosphatgepufferten Formaldehydlösung fixiert. Danach wurden sie für mindestens 48 h in eine 2 %-ige Formaldehydlösung überführt. Schließlich wurden sie in Einwegkassetten gegeben und für 4 h in 70 %-igem Ethanol inkubiert. Anschließend erfolgte eine Gewebeentwässerung und die Einbettung der Gehirne in Paraffin. Hierfür wurden die Organe in einer Paraffinausgießstation mittels einer Histokinette und der umgedrehten Einwegkassette in schnittfähige Paraffinblöcke gegossen.

Für Gefrierschnitte bestimmtes Gewebe wurde direkt nach der Entnahme in Förmchen (Kryomoulds) mit TissueTak über flüssigem Stickstoff zu schnittfähigen Blöcken gefroren, die anschließend bei -80 °C gelagert wurden.

Gewebe, das für den Western Blot oder zur RNA-Isolierung vorgesehen war, wurde sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.3.2 Anfertigung von Gewebeschnitten

Paraffinschnitte wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms bei einer Schnittdicke von 6 µm in horizontaler Schnittrichtung bei Raumtemperatur angefertigt. Die Schnitte wurden zum Strecken in ein 50 °C warmes Wasserbad überführt und auf Objektträger aufgezogen. Bei den Objektträgern handelte es sich um silanisierte bzw. speziell beschichtete Objektträger (SuperFrostPlus), um ein späteres

Ablösen der Gewebeschnitte von den Objektträgern zu verhindern. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank getrocknet. Für den PET-Blot vorgesehene Paraffinschnitte wurden auf zugeschnittene Nitrocellulosemembranen aufgezogen und sofort bei 60 °C inkubiert. Sie wurden 1-2 Tage bei dieser Temperatur getrocknet.

Kryoschnitte wurden mit Hilfe eines Kryotoms bei einer Schnittdicke von 8 µm in vertikaler Schnittrichtung bei -20 °C angefertigt. Mithilfe eines Streckplättchens wurden die Schnitte bereits beim Schneidevorgang geglättet. Anschließend wurden sie auf spezielle Objektträger (SuperFrostPlus, StarFrost) aufgezogen und für 10 min bei RT inkubiert. So konnten die Schnitte antrocknen, bevor sie für 10 min in -20 °C kaltem Aceton fixiert wurden. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 1 h bei RT getrocknet und danach bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.3.3 ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex)

In der Immunhistochemie wird die ABC-Methode, die zu den indirekten histologischen Nachweismethoden zählt, meist der direkten Methode mit einem konjugierten Primärantikörper vorgezogen, da sie weitaus sensitiver ist. Durch Verwendung eines Sekundärantikörpers können viel mehr Enzymmoleküle mit verschiedenen Epitopen des Primärantikörpers reagieren, wobei das Signal verstärkt wird (mehr Enzymmoleküle binden am Ort des Antigens).

Die ABC-Methode nutzt außerdem die starke Bindungsaffinität des Glykoproteins Avidin oder Streptavidin zum Vitamin Biotin. Die freien Bindungsstellen des Biotins werden durch das Avidin des anschließenden Peroxidasekomplexes gebunden.

Die Methode sieht vor, dass zunächst das darzustellende Antigen im Gewebe durch den unkonjugierten Primärantikörper erkannt und gebunden wird. Anschließend wird ein Biotin-gekoppelter Zweit- bzw. Sekundärantikörper aufgetragen, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Durch eine darauffolgende Inkubation mit einem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, der an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet, kann das Antigen sichtbar gemacht werden. Das Enzym Peroxidase des Komplexes ermöglicht mit 2,3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) oder 3,3-Diaminobenzidine (DAB) als Substratchromogen eine Färbung. AEC bildet ein rosenrotes Endprodukt, das in Alkohol löslich ist. Daher wird das Präparat mit einem wässrigen Eindeckmedium (Aquatex) eingedeckelt. AEC ist leider empfindlich gegenüber fortschreitender Oxidation und starker Lichteinwirkung. Es bleicht mit der Zeit aus, deshalb wird es im Dunkeln gelagert. DAB hingegen führt zu einem braunen Endprodukt und ist stark unlöslich in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln. Daher können die Schnitte entwässert und mit DPX eingedeckelt werden.

3.3.4 Verwendung von Fluoreszenz-Antikörpern

Für Fluoreszenz-Färbungen werden Sekundärantikörper verwendet, die mit einem Fluorchrom gekoppelt sind. Carbocyanine sind hierfür am besten geeignet. Zum einen gibt es das Carbocyanin Cy2, das grün fluoresziert. Es besitzt eine starke Leuchtintensität und gegenüber anderen Fluorchromen weist es eine sehr gute Langzeitstabilität auf. Sein Exzitationsmaximum liegt bei 490 nm und sein Emissionsmaximum bei 508 nm.

Indocarbocyanin Cy3 ist ebenfalls ein leuchtintensives und photostabiles Fluorchrom, das rot fluoresziert. Die relativ hydrophilen Cy3 konjugierten Nachweisreagenzien zeigen kaum unspezifische Bindungen an biologische Gewebe. Sein Exzitationsmaximum liegt bei 550 nm und es weist ein Emissionsmaximum von 570 nm auf.

Für die gleichzeitige Detektion zweier verschiedener Antigene im gleichen Gewebe sind Carbocyanin-Doppelmarkierungen eine geeignete Methode. Hierbei wird das Gewebe mit einem Cocktail aus zwei Primärantikörpern verschiedener Wirtsspezies inkubiert und anschließend folgt eine Inkubation mit nicht kreuzreaktiven fluorchromierten Sekundärantikörpern zur zeitgleichen Visualisierung.

3.3.5 Verwendung von Thioflavin-S

Thioflavin-S ist ein fluoreszierender Farbstoff, der aus einer Mischung von Komponenten besteht, die aus der Methylierung von Dehydrothiotoluidin mit Sulfin-Säure resultiert. Es wird verwendet, um Amyloid-Plaques zu visualisieren.

Das extrinsische Fluorophor ist in der Lage über kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkungen an bestimmte Bereiche von Proteinen zu binden, so auch an die β -Faltblattstrukturen des Amyloids. Zudem kommt es zu einem Fluoreszenzanstieg, wenn es an die fibrilläre Form von Proteinen bindet, wodurch man eine direkte Übersicht über das Wachstum fibrillärer Plaques bekommt. Wenn Thioflavin-S bindet, erfährt es eine charakteristische Verlagerung seines Exzitationsspektrums von 120 nm. Sein Emissionsmaximum liegt dann bei 482 nm.

3.3.6 Hämalaun-Eosin(HE)-Übersichtsfärbung

Die Hämalaun-Eosin-Färbung dient zur Übersichtsfärbung von Geweben. Sie kann verwendet werden, um die spongiformen Veränderungen des Gewebes zu beurteilen. Bei dieser Färbung werden durch das Hämalaun alle basophilen Gewebestandteile wie z.B. das Chromatin der Zellkerne blau angefärbt. Eosin hingegen färbt das Zytoplasma und die Interzellulärsubstanz rot an.

Die Schnitte wurden jeweils zweimal für 5 min in Xylol und Aceton entparaffiniert und in A. dest. gespült. Die Färbung mit Hämalaun erfolgte für 1 min, nach mehrmaligem Spülen in Leitungswasser wurde für 3 min mit Eosin gegengefärbt. Die Schnitte wurden für 10 min in Leitungswasser gebläut, anschließend jeweils zweimal für 1 min in Aceton und Xylol dehydriert und mit DPX eingedeckelt.

3.3.7 Immunhistochemische Färbemethoden an Paraffinschnitten

3.3.7.1 Nachweis aktivierter Astrozyten (GFAP)

Aktivierte Astrozyten exprimieren auf der Oberfläche ihrer Zellfortsätze das gliäre fibrilläre saure Faserprotein (*glial fibrillary acidic protein* – GFAP), das mit Hilfe eines aus dem Kaninchen gewonnenen Antikörpers nachgewiesen werden kann.

Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert (3.3.6). Nach der Blockierung endogener Peroxidaseaktivität mit einem 1 %-igen H_2O_2 /Methanol-Gemisch für 20 min, wurden die Schnitte 5 min

in A. dest. gewaschen. Anschließend wurden sie 30 min mit 10 %-igem FKS/PBS geblockt. Es folgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper anti-GFAP (Verdünnung 1:1000 in 10 % FKS/PBS) für 1 h bei 37 °C. Die Schnitte wurden danach 2 x für 5 min mit PBS gewaschen und schließlich für eine weitere Stunde bei RT mit dem Sekundärantikörper anti-Kaninchen (Verdünnung 1:100 in 10 % FKS/PBS) inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS und der Zugabe des Streptavidin-HP-Konjugates für 1 h bei RT (Verdünnung 1:100 in 10 % FKS/PBS), erfolgte die Färbung mit DAB für 3 min. Die Schnitte wurden mit Hämalaun gegengefärbt, dehydriert und mit DPX eingedeckelt.

3.3.7.2 Nachweis aktivierter Mikroglia (Iba-1)

Für vergleichende immunhistochemische Analysen von aktivierten Mikroglia wurde der anti-Iba-1-Antikörper verwendet (*ionized calcium binding adapter molecule*).

Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert (3.3.6). Es folgten zwei Waschschriffe mit TBST für 5 min. Anschließend wurde die Peroxidaseaktivität mit einem 1 %-igen H₂O₂/Methanol-Gemisch für 20 min blockiert. Zwei Waschschriffe für jeweils 5 min in TBST schlossen sich an, bevor die Schnitte für 30 min bei RT in 10 %-igem FKS/TBST geblockt wurden. Schließlich folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-Iba-1 (Verdünnung 1:500 in 10 % FKS/TBST) ÜN bei 4 °C. Nach erneuten Waschschriffen wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper anti-Kaninchen (Verdünnung 1:100 in 10 % FKS/TBST) 90 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschschriffe und die Zugabe des Streptavidin-HP-Konjugates für 1 h bei RT (Verdünnung 1:200 in 10 % FKS/TBST). Die Färbung erfolgte mit DAB für 3 min nachdem die Schnitte diesmal 2 x 10 min mit TBST gewaschen wurden. Anschließend konnten sie mit Hämalaun gegengefärbt, dehydriert und mit DPX eingedeckelt werden.

3.3.7.3 Paraffin-Embedded Tissue Blot (PET-Blot)

Die PET-Blot Methode dient zum Nachweis von PrP^{Sc}. Sie ermöglicht eine genaue Differenzierung zwischen den beiden Protein-Formen PrP^{Sc} und PrP^C, zwischen denen kommerzielle Antikörper bislang nicht unterscheiden können. Durch die Behandlung der Gewebeschnitte mit dem Enzym Proteinase K wird das zelluläre PrP^C verdaut und so wird ausschließlich seine pathologische Isoform PrP^{Sc} in der anschließenden immunhistochemischen Färbung detektiert. Die Gewebeschnitte werden hierfür auf Nitrocellulosemembranen aufgezogen, wodurch sie den Proteinase K-Verdau morphologisch sehr viel besser überstehen als auf Objektträgern. Für die Durchführung des PET-Blots wurde ein modifiziertes Protokoll von Schulz-Schaeffer (Schultz-Schaeffer et al., 2000) verwendet.

Die Schnitte wurden für die Entparaffinierung zunächst 2 x 5 min in Xylol und je 5 min in einer absteigenden Isopropanolreihe (95 %, 80 %, 70 %, 50 %) inkubiert. Anschließend wurden sie 2 x 10 min in 0,1 % Tween 20/A. dest. permeabilisiert. Die Membranen wurden getrocknet, zugeschnitten und in 8 well plates auf einen Schüttler überführt, wo zunächst ein Waschschriff (3 x 10 min in TBST) durchgeführt wurde. Es folgte ein Proteinase K-Verdau (25ug/ml Proteinase K-Puffer) für 2 h bei 55 °C, an den sich wiederum ein Waschschriff (3 x 10 min in TBST) anschloß. Zur Denaturierung von PrP^{Sc} wurden die Schnitte für 10 min bei RT in 3 M Guanidin-Thiocyanat in Tris-Puffer inkubiert. Auf

einen weiteren Waschschrift (3 x 10 min in TBST) folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen in 0,2 % Casein/TBST für 30 min bei RT. Die Inkubation mit dem Primärantikörper 6H4 (Verdünnung 1:5000 in 0,2 % Casein/TBST) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach einem Waschschrift wurden die Schnitte 1 h bei RT mit dem konjugierten Zweitantikörper anti-Maus-AP (Verdünnung 1:2000 in 0,2 % Casein/TBST) inkubiert. Es folgten ein Waschschrift (3 x 10 min in TBST) und die Zugabe von NTM für 2 x 10 min. Die anschließende Färbung wurde mit NBT/BCIP durchgeführt (3-10 min bei Gehirnschnitten, 10-30 min bei Milzschnitten). Die Farbreaktion wurde mit Stopplösung abgestoppt und die Schnitte 3 x kurz in A. dest. gespült. Die Membranen wurden 1 h bei 55 °C getrocknet und zum Glätten zwischen zwei Objektträgern eingelegt. Diese wurden mit Tesafilm zusammengeklebt und unter dem Stereomikroskop ausgewertet.

3.3.8 Immunhistochemische Färbemethoden an Kryoschnitten

3.3.8.1 Nachweis von CXCL13 (BLC) im ZNS

Um CXCL13 im ZNS nachzuweisen, wurde ein Primärantikörper von Santa Cruz gewählt, der gegen ein Peptid gerichtet ist, das am C-Terminus des murinen CXCL13 gelegen ist {BLC (M-17)}.

Die Kryoschnitte wurden zunächst bei RT aufgetaut und mit PBS 5 min gewaschen. Anschließend wurden sie für 1 h mit 5 %-igem ENS/PBS geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-CXCL13 (Verdünnung 1:50 in 3% ENS/PBS) folgte ÜN bei 4 °C. Zwei Waschschriffe schlossen sich an, bevor die Schnitte mit dem Sekundärantikörper EaZ-Cy2 (Verdünnung 1:250 in 3 % ENS/PBS) 1 h bei RT inkubiert wurden. Da es sich bei dem Sekundärantikörper um einen Fluoreszenz-Antikörper handelte, wurden die folgenden Schritte im Dunkeln durchgeführt, indem die Schnitte mit Hilfe einer Styroporbox abgedeckt wurden. Nach erneuten Waschschriffen wurden die Schnitte in PolyMount-Medium eingedeckelt, das speziell für Fluoreszenz-gefärbte Schnitte verwendet wird. Die Präparate wurden im Dunkeln gelagert.

3.3.8.2 CXCL13-GFAP-Doppelmarkierung

Um eine Astrozyten-spezifische Expression von CXCL13 nachweisen zu können, wurde eine CXCL13-GFAP-Doppelmarkierung durchgeführt.

Sie wurde wie in 6.3.8.1 durchgeführt. Allerdings wurde beim Inkubieren mit dem Sekundärantikörper zusätzlich der fluoreszierende Antikörper anti-GFAP-Cy3 (Verdünnung 1:1000 in 3 % ENS/PBS) hinzugefügt. Dieser Primärantikörper ist direkt an das Fluorchrom Cy3 gekoppelt. Somit konnte anschließend eine zeitgleiche Visualisierung der Antigene erfolgen.

3.3.8.3 CXCL13-Thioflavin-Doppelmarkierung

Um eine mögliche Ko-Lokalisation von CXCL13 mit Amyloid-Plaques im Alzheimer-erkrankten Gehirn feststellen zu können, wurde eine CXCL13-Thioflavin-Doppelmarkierung durchgeführt. Thioflavin färbt amyloide Fibrillen (6.3.5).

Die Kryoschnitte wurden zunächst bei RT aufgetaut, mit PBS 5 min gewaschen und 30 min in einem 0,3 %-igen H₂O₂/Methanol-Gemisch bei RT inkubiert. Nach zwei Waschschritten (2 x 5 min in PBS) wurden sie für 1 h mit 5 %-igem ENS/PBS geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-CXCL13 (Verdünnung 1:50 in 3% ENS/PBS) folgte ÜN bei 4 °C. Zwei Waschschriffe (2 x 5 min in PBS) schlossen sich an, bevor die Schnitte mit dem Sekundärantikörper anti-Ziege (Verdünnung 1:150 in 3 % ENS/PBS) 1 h bei RT inkubiert wurden. Danach wurde erneut zweimal gewaschen und anschließend das Streptavidin-HP-Konjugat (Verdünnung 1:100 in 3 % ENS/PBS) dazugegeben. Die DAB-Färbung folgte nach erneuten Waschschriffen (2 x 5 min in PBS) für 3 min. Danach wurde zunächst zweimal mit PBS und anschließend noch 1 x 3 min mit A. dest. gewaschen. Die Schnitte wurden dann mit 1 % iger Thioflavin-S-Lösung (in A. dest.) für 20 min bei RT inkubiert. In 85 %igem EtOH folgte eine Differenzierung der Färbung für 40 min bei RT. Die Proben wurden schließlich gewässert und mit Aquatex eingedeckelt.

3.3.8.4 Nachweis von CD36 im ZNS

Um CD36 im ZNS nachzuweisen, wurde ein Primärantikörper von Santa Cruz gewählt, der gegen ein Peptid des N-terminalen Endes des humanen CD36 gerichtet ist {CD36 (V-19)}. Der Antikörper ist aber auch für die Detektion von CD36 aus Maus und Ratte geeignet.

Es wurde das gleiche Protokoll verwendet, dass auch für die Färbung von CXCL13 benutzt wurde (3.3.8.1). Die Antikörperverdünnungen entsprachen denen für die CXCL13-Färbung.

Zusätzlich zur Fluoreszenzmarkierung wurde eine Detektion mithilfe von DAB durchgeführt. Hierfür wurde ein EaZ-Sekundärantikörper eingesetzt (Verdünnung 1:250 in 3 % ENS/PBS , 1h, RT). Es folgten zwei Waschschriffe und die Zugabe des Streptavidin-HP-Konjugates für 1 h bei RT (Verdünnung 1:200 in 3 % ENS/PBS). Die Färbung erfolgte mit DAB für 3 min nachdem die Schnitte diesmal 2 x 10 min mit PBS gewaschen wurden. Anschließend konnten sie mit Hämalaun gegenfärbt, dehydriert und mit DPX eingedeckelt werden.

3.3.8.5 CD36-GFAP-Doppelmarkierung

Um nachweisen zu können, dass CD36 von Astrozyten im ZNS exprimiert wird, wurde eine CD36-GFAP-Doppelmarkierung durchgeführt.

Sie wurde wie in 3.3.8.1 durchgeführt. Allerdings wurde beim Inkubieren mit dem Sekundärantikörper zusätzlich der fluoreszierende Antikörper anti-GFAP-Cy3 (Verdünnung 1:1000 in 3 % ENS/PBS) hinzugefügt. Somit konnte anschließend eine zeitgleiche Visualisierung der Antigene erfolgen.

3.3.8.6 Nachweis von SR-A im ZNS

Für die Detektion von SR-A im ZNS, wurde ein Primärantikörper von Santa Cruz verwendet, der gegen ein Peptid des N-Terminus des murinen SR-A ist. Er kann für die Detektion beider SR-A Isoformen aus Maus und Ratte eingesetzt werden.

Es wurde das gleiche Protokoll verwendet, dass auch für die Färbung von CD36 benutzt wurde (3.3.8.4). Die Antikörperverdünnungen entsprachen denen für die CD36-Färbung.

3.3.8.7 SR-A-GFAP-Doppelfärbung

Da nicht vollständig geklärt ist, von welchen Zellen SR-A im ZNS exprimiert wird, wurde eine SR-A-GFAP-Doppelmarkierung durchgeführt, um eine eventuelle Astrozyten-spezifische Expression von SR-A nachweisen zu können.

Sie wurde wie in 3.3.8.1 durchgeführt. Allerdings wurde beim Inkubieren mit dem Sekundärantikörper zusätzlich der fluoreszierende Antikörper anti-GFAP-Cy3 (Verdünnung 1:1000 in 3 % ENS/PBS) hinzugefügt. Somit konnte anschließend eine zeitgleiche Visualisierung der Antigene erfolgen.

3.3.9 Auswertungsmethoden für Histologie und Immunhistochemie

Zur Auswertung der Färbungen wurde ein semiquantitatives Bewertungssystem angewendet. Mit Hilfe eines Maushirnatlas (Franklin and Paxinos, 2002) wurden in den sagittal geschnittenen Gehirnen 8 anatomische Regionen bestimmt: Kleinhirn, Hirnstamm, Medulla oblongata, Thalamus, Striatum, Hippocampus, Cortex und Bulbus olfactorius). Jede dieser Regionen wurde lichtmikroskopisch bei einer 400-fachen Vergrößerung durchgemustert und der Schweregrad der Veränderung der untersuchten Parameter (PrP^{Sc}-Ablagerung, Mikrogliose, Astrozytose, Vakuolisierung) bestimmt. Das gleiche Verfahren wurde für die PET-Blot-Schnitte mit Hilfe eines Stereomikroskops durchgeführt. Alle Auswertungen wurden an anonymisierten Schnitten von mindestens zwei Personen unabhängig voneinander durchgeführt.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.4.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* (analytischer und präparativer Maßstab)

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Es basiert auf der Verwendung von Silicagel-Membranen, an die DNA in Anwesenheit von chaotropen Salzen bindet und von Verunreinigungen gesäubert wird. Die hoch reine DNA kann dann mit Hilfe eines Puffers mit niedrigem Salzgehalt von der Membran eluiert werden. Mit dieser Methode kann die unangenehme Phenol/Chloroform-Extraktion vermieden werden. Für die Präparation wurde zunächst eine 3 ml ÜN-Kultur von *E.coli* angeimpft. Hierfür wurde LB-Medium mit entsprechender Antibiotikakonzentration verwendet. Die Kultur wurde bei 37 °C ÜN geschüttelt. Schließlich wurde sie am darauf folgenden Tag in einem Reaktionsgefäß herunterzentrifugiert und das entstandene Pellet wurde im Lysis-Puffer resuspendiert. Die nachfolgenden Schritte wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Um Plasmid-DNA im quantitativen Maßstab aus *E.coli* zu präparieren, wurde der Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen) eingesetzt, der auf der Verwendung von Anionen-Austauscher-Säulen basiert. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben.

3.4.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Gewebe

Zur Isolierung von genomischer DNA von Mäusen wurden Schwanzbiopsien verwendet. Das Gewebe wurde mit Proteinase K ÜN bei 55 °C verdaut und schließlich konnte aus dem entstandenen Lysat mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits (Qiagen) die genomische DNA isoliert werden. Es wurde das vom Hersteller vorgesehene Protokoll verwendet.

3.4.1.3 Isolierung von RNA aus Gewebe

Die RNA wurde mit Hilfe der Trizol-Methode aus Gewebe isoliert. Das Trizol-Reagenz stabilisiert bei der Homogenisierung der Proben die RNA, während Zellen und Zellbestandteile lysiert werden.

Die Organe, Gehirne oder Milzen, wurden mit 1 ml/100 mg Gewebe mit einem Ultra-Turrax für 3 x 10 sec in einem 50 ml Falcon homogenisiert. Die Homogenate wurden anschließend für 5 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um den entstandenen Schaum zu brechen. Nach vorsichtiger Resuspendierung wurden die Proben auf Sarstedt-Röhrchen verteilt und nochmals für 10 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in neue Sarstedt-Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden für 5 min bei RT inkubiert und schließlich mit 0,2 ml Chloroform/ml Trizol-Ausgangsmenge versetzt. Die Ansätze wurden 15 sec in der Hand geschüttelt und 3 min bei RT inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 12000 g und 4°C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in neue Sarstedt-Röhrchen überführt. Den Proben wurde darauf 0,5 ml Isopropanol/ml Trizol-Ausgangsmenge zugesetzt und wieder für 15 sec geschüttelt. Diesmal wurden sie für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 10 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml eiskaltem 75 %igem Ethanol gewaschen. Hierfür wurden die Proben 5 min bei 7500 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet bei 37 °C getrocknet, um jegliche Alkoholreste zu entfernen. Danach wurde es in 50 µl 0,1 %igem DEPC/A. dest gelöst und bei -80 °C eingefroren.

3.4.2 Aufreinigung von RNA und cDNA-Synthese

3.4.2.1 Reinigung der Gesamt-RNA von genomischer DNA

Kontaminationen der Gesamt-RNA mit genomischer DNA können bei RT-PCR-Analysen das Ergebnis verfälschen. Um diese zu vermeiden, wurden Verunreinigungen durch das Enzym DNase I entfernt.

Je 20 µg Gesamt-RNA wurden nach Zugabe von 3 µl DNase I und 3 µl DNase-Puffer (10x) mit 0,1 %igem DEPC/A. dest. auf 30 µl aufgefüllt und 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und weiter aufgereinigt.

3.4.2.2 Aufreinigung der Gesamt-RNA

Um die Gesamt-RNA von Enzym- und Pufferresten sowie eventuellen Kontaminationen zu reinigen, wurde das RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Hierbei wurde durch die Zugabe von Ethanol die selektive Bindung der Total-RNA an eine Silikagel-Membran ermöglicht, während Kontaminationen ausgewaschen wurden. Mit RNase-freiem Wasser wurde die Gesamt-RNA aus der Membran eluiert.

3.4.2.3 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA

Um Expressionsanalysen von der Gesamt-RNA machen zu können, wurde die Total-RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, da für die normale PCR bzw. für die quantitative RT-PCR DNA als Ausgangsmaterial benötigt wurde. Die hier eingesetzte Taq Polymerase zur Amplifikation der DNA war nicht in der Lage, RNA zu erkennen. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des first-strand cDNA Synthese Kits (Amersham) entsprechend den Angaben des Herstellers. Hierbei wurden Random-Hexamere als Primer und die Reverse Transkriptase des Moloney-Murine Leukämie Virus eingesetzt. Für jeden Reaktionsansatz wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der im Reaktionsansatz das Enzym durch Wasser ersetzt wurde, um in der späteren PCR Verunreinigungen mit genomischer DNA ausschließen zu können. Die Proben wurden zur Denaturierung der RNA-Sekundärstrukturen für 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe des Reaktionsmixes wurden die Proben für 1 h bei 37 °C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Um die Qualität der cDNA beurteilen zu können, folgte eine Aktin-PCR. β -Aktin ist ein sog. „housekeeping“-Gen, das ständig exprimiert wird und somit mittels PCR nachzuweisen sein mußte.

3.4.3 Amplifikation von DNA

3.4.3.1 Amplifikation von DNA über Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet (Innis and Gelfand, 1990). Mit Hilfe der PCR-Amplifikation können definierte DNA-Sequenzen aus einem komplexen DNA-Gemisch selektiv angereichert werden. Hierzu werden zwei DNA-Primer verwendet, von denen der eine zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereiches komplementär ist.

Die PCR-Reaktion bestand aus drei Schritten: Zuerst erfolgte eine Denaturierung der DNA in zwei Einzelstränge bei 95 °C. Darauf folgte das Annealing, bei dem sich die DNA-Primer an den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt anlagerten. Die hierbei verwendete Temperatur war von der Schmelztemperatur der Primer abhängig. Durch die hitzestabile Taq Polymerase wurden im letzten Schritt (Elongation) die komplementären DNA-Stränge synthetisiert. Diese erfolgte bei 72 °C. Durch zyklische Wiederholung dieser drei Schritte erreichte man eine exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz, da jeder neu gebildete Strang als Matrize für die Synthese eines weiteren Stranges

diente. Für die PCR wurde der PCR Master Mix (Promega) verwendet, der bis auf Primer, DNA und Wasser bereits alle Bestandteile, so auch die Taq DNA-Polymerase, des Reaktionsansatzes beinhaltet.

Es wurde folgender 25 µl Reaktionsansatz gewählt:

PCR Master Mix (Promega), 2 x	12,5 µl
PCR Wasser	9,5 µl
je Primer (10 µM)	1,0 µl
DNA	1,0 µl

Für eine Standard-PCR wurde folgendes Programm verwendet:

Aktivierung der DNA- Polymerase	10 min	95 °C	35 x
Denaturierung	30 sec	95 °C	
Annealing	30 sec	Primer-abhängig	
Elongation	1 min	72 °C	
Finale Polymerisation	5 min	72 °C	

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Herstellung der Transformationskonstrukte wurde anstatt der Taq DNA-Polymerase die Phusion DNA-Polymerase verwendet. Das aus *Pyrococcus* stammende Enzym ist in der Lage, längere DNA-Fragmente mit einem hohen Maß an Genauigkeit zu amplifizieren.

Die Reaktion wurde mit dem Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Finnzymes) durchgeführt.

	50 µl Reaktionsansatz
Phusion Master Mix (Finnzymes), 2 x	25 µl
PCR Wasser	ad. 50 µl
je Primer	0,5 µM
DNA	1 pg – 10 ng
DMSO	3 %

Für die Amplifikation mit der Phusion DNA-Polymerase wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Initiale Denaturierung	30 sec	98 °C	25 – 35 x
Denaturierung	5-10 sec	98 °C	
Annealing	10-30 sec	45-72 °C	
Elongation	15 sec/1 kb	72 °C	
Finale Polymerisation	5 min	72 °C	

3.4.3.2 Ganz-Zell-PCR aus *E.coli*

Zur schnellen Überprüfung von Transformanden kann eine PCR direkt aus *E. coli* Zellen durchgeführt werden. Diese Technik hat sich als zuverlässiges Mittel zur Vorauswahl richtiger Transformanden erwiesen. Hierzu muß das Zellmaterial allerdings frisch sein. Es sollte nur eine Kolonie für die PCR eingesetzt werden und die zu amplifizierenden Fragmente sollten nicht länger als 1,5 kb sein. Außerdem muß beachtet werden, dass die Elongationszeiten für eine erfolgreiche Amplifikation gegenüber Standard-PCR-Ansätzen verdoppelt werden müssen. Ansonsten wurden die PCR-Proben genauso angesetzt wie in 3.4.3.1.

3.4.4 Quantitative real-time PCR

Mit Hilfe der quantitativen real-time PCR kann eine Analyse der Expression bestimmter Gene durchgeführt werden. Diese Methode basiert auf der Amplifikation von cDNA mithilfe des Brilliant SYBR Green QPCR Master Mixes (Stratagene). Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I wird bei 528 nm angeregt und bindet an kleine Vertiefungen doppelsträngiger DNA. Allerdings ist er nicht sequenzspezifisch. Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt wird durch spezifische Primer festgelegt. Während mit Hilfe der Taq DNA-Polymerase die entsprechenden Amplifikate entstehen, binden mehrere Moleküle des Farbstoffes an der doppelsträngigen DNA. Durch die Bindung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches verstärkt und man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zur Zahl der vorhandenen Doppelstränge ist und das direkt während der PCR (real-time) mit Hilfe eines Lasers gemessen wird. Durch eine Detektionssoftware wird dies in einer Verlaufskurve auf einem Computer aufgezeichnet. Die Quantifizierung basiert schließlich auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten „Threshold“ oder Schwellenwert T.

Die Anzahl der Zyklen, die nötig sind, um den Schwellenwert zu erreichen, bezeichnet man als C_T -Wert. Je niedriger der C_T -Wert einer Probe ist, desto höher ist die Expression des untersuchten Gens. Im logarithmisch-linearen Verlauf dieser Kurve bedeutet jeder Zyklus (x) eine Verdoppelung an Template (2^x).

Um für alle Proben von derselben Menge an cDNA ausgehen zu können, wurde zunächst für alle Proben ein Referenzwert ermittelt, indem eine real-time PCR für das „housekeeping“-Gen Glyceraldehyd-3-Phosphat (GAPDH) durchgeführt wurde. Eine Expression dieses Gens ist unter verschiedenen Bedingungen immer gleich hoch. Aus den erhaltenen C_T -Werten wurde der niedrigste ausgewählt (der Ansatz mit der größten Menge cDNA) und die Differenz zwischen diesem und den Werten aller anderen Proben bestimmt. Der so für jede einzelne Probe erhaltene Differenzwert ΔC_T wurde bei allen weiteren real-time PCR-Durchgängen für spezifische Gene mit den dabei erhaltenen C_T -Werten verrechnet.

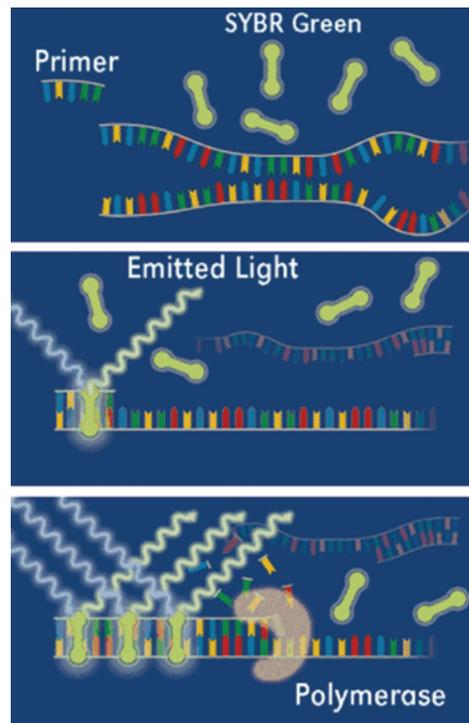


Abbildung 7: Wirkungsmechanismus des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green in einer real-time QPCR-Reaktion. Bei der Synthese eines neuen DNA-Doppelstranges binden mehrere SYBR-Green Moleküle an den neusynthetisierten Strang. Durch die Bindung des Farbstoffes wird die emittierte Fluoreszenz frei und die Intensität des Signals kann gemessen werden. Die Intensität ist direkt proportional zur Zahl der vorhandenen Doppelstränge (www.takaramirusbio.com)

Die für die real-time PCR verwendete Taq DNA-Polymerase liegt zunächst in inaktiver Form vor und wird bei einer Temperatur von 95 °C aktiviert. Durch diesen „hot start“ werden Fehlhybridisierungen der Primer verhindert und dadurch die Spezifität erhöht. Um mögliche Kontaminationen durch PCR-Produkte aus vorherigen Ansätzen zu eliminieren, wurde dem Reaktionsansatz Uracil-N-Glykosylase (UNG) zugesetzt.

Für jede cDNA wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Zusätzlich wurde die jeweilige Negativkontrolle mitgeführt, um eine eventuelle Kontamination der Proben mit Fremd-DNA bzw. genomischer DNA feststellen zu können. Es wurde für die zu vergleichenden Proben ein Master Mix angesetzt und in optische Röhrchen vorgelegt. Es wurde außerdem ein cDNA-freier Leerwert als Kontrolle mitgeführt.

Es wurde folgender Reaktionsansatz pro Probe verwendet:

Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix, 2 x	6,25 µl
je Primer (10 µM)	0,36 µl
RNase-freies Wasser	3,37 µl
Uracil-N-Glycosylase (1 Unit/µl)	0,125 µl
cDNA (1:20 mit tRNA/PCR-H ₂ O verdünnt)	2 µl

Die Reaktion wurde in einem Real Time Cycler (Stratagene) nach folgendem Programm durchgeführt:

Durchführung des UNG-Verdau	2 min	50 °C	
Aktivierung der DNA-Polymerase	10 min	95 °C	
Denaturierung der cDNA	30 sec	95 °C	45 x
Annealing	30 sec	Primer-abhängig	
Elongation	1 min	72 °C	

3.4.5 Klonierung von DNA

3.4.5.1 Dephosphorylierung von DNA

Um eine Religation von linearisierten Plasmiden in einer späteren Ligation zu vermeiden, wurden die 5'-Enden durch die „*calf intestinal alkaline phosphatase*“ (CIAP) (Invitrogen) dephosphoryliert. Dazu wurde 1 Unit des CIAP zum Restriktionsansatz gegeben. Für blunt-ends wurde der Ansatz 5 min bei 50 °C inkubiert, für 5'-Überhänge 5 min bei 37 °C. Um die CIAP zu inaktivieren konnte der Ansatz über ein Agarose-Gel gereinigt werden oder 15 min bei 65 °C inkubiert werden.

3.4.5.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung zweier oder mehrerer DNA-Fragmente ist mit der T4-DNA-Ligase möglich. Für die Ligation von Fragmenten, z.B. auch der Ligation in ein linearisiertes Plasmid, wurden 100 ng dephosphorylierte Plasmid-DNA mit 1 µl 10 x Ligase-Puffer, 0,5 Units T4-DNA-Ligase und bis zu 7,5 µl des oder der zu klonierenden Fragmente vermengt (10 µl Endvolumen). Nach einer Inkubation von 1 h bei RT oder ÜN bei 14 °C wurden 1-2 µl des Ansatzes in elektrokompente *E.coli*-Zellen transformiert (3.4.7).

3.4.5.3 Eluieren von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Für die schnelle Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Er basiert auf dem Einsatz von Silicagel-Membranen, an die die DNA bindet und schließlich hoch aufgereinigt eluiert wird.

3.4.6 Transformation elektrokompenter *E.coli*-Zellen

Zur Transformation von DNA aus Ligations-Ansätzen in elektrokompente *E.coli*-Zellen, wurde der Ligationsansatz zunächst gegen 1/8 TE dialysiert. 1 µl des Ansatzes wurde mit 50 µl elektrokompenten TOP 10 *E.coli*-Zellen (Invitrogen) in eine eisgekühlte Küvette gegeben. Die Transformation wurde am GenePulser II (BioRad) bei folgenden Einstellungen durchgeführt: Raise

2,50; μ Farad 25; 400 Ohm. Die Küvette wurde in die Transformationsvorrichtung des Gerätes eingespannt. Nach Betätigung des Pulse-Knopfes wurde sofort nach Ertönen des Signaltons die Küvette herausgenommen und die Zellen in ein Eppendorfgefäß mit 1 ml SOC-Medium (Invitrogen) überführt. Die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C und 300 rpm geschüttelt. Anschließend wurden sie auf Selektivmedium ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

3.4.7 Analyse von DNA und RNA

3.4.7.1 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (A₂₆₀) in einem Spektrophotometer (Amersham) bestimmt.

3.4.7.2 Restriktions-Analyse von DNA

Zum Schneiden von DNA wurden Restriktions-Endonukleasen und die zugehörigen Puffersysteme der Firmen New England Biolabs (NEB) und Amersham Pharmacia nach Herstellerangaben verwendet.

Bei Verwendung zweier Enzyme wurde der Puffer gewählt, bei dem beide Enzyme die höchste Aktivität hatten, ohne jedoch Star-Aktivitäten aufzuweisen. War dies nicht möglich oder weniger optimal, so wurde die DNA zunächst mit dem einen Enzym geschnitten und dann mit 1 Volumen Isopropanol gefällt (10 min, 4 °C, 14000 rpm). Nach dem Waschen mit 70 % EtOH, nochmaligem Zentrifugieren und anschließendem Trocknen wurde das Pellet in einer geeigneten Menge A. dest. gelöst und nach Pufferzugabe die DNA mit dem zweiten Enzym restringiert.

Unterschieden sich die Enzyme lediglich in ihrer Optimaltemperatur, so wurde zunächst mit dem einen Enzym geschnitten, um danach das zweite Enzym nach der entsprechenden Inkubationszeit bei veränderter Temperatur hinzuzufügen.

3.4.7.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese basiert auf der Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Größe. Durch Zugabe von Ethidiumbromid in das Gel wird die DNA sichtbar gemacht. Es interkaliert zwischen benachbarten DNA-Basenpaaren und fluoresziert unter UV-Licht (366 nm) orange-rot.

Zur Auftrennung wurde eine horizontale Elektrophorese-Apparatur (BioRad) verwendet. Eine Suspension von 1 bis 1,5 % Agarose in TAE-Puffer wurde bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgekocht und auf ca. 60 °C abgekühlt. Anschließend wurde die Lösung mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration: 1-5 μ g/ml) und in einen Gelschlitten mit eingestecktem Gelkamm gegossen. Nach dem Erstarren wurde der Gelkamm gezogen und der Schlitten in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Apparatur gelegt.

Die Proben wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt (10 %). Als Größenstandard wurde eine 100 bp- oder 1 kb-DNA-Leiter (NEB) mit aufgetragen (10 µl). Die Elektrophorese erfolgte bei 100-120 V in TAE-Puffer. Die DNA wurde anschließend unter UV-Licht kontrolliert.

3.4.7.4 Auftrennung von RNA durch denaturierende Formaldehyd-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA wurden Formaldehyd-Gele verwendet. Die 1 %ige Agaroselösung beinhaltete Denaturierungs-Gel-Puffer (10 x) (Ambion) und wurde mit 0,1 % igem DEPC/A. dest. aufgefüllt. Die Proben wurden so angesetzt, dass 10 µg der Gesamt-RNA mit Formaldehyd-Load-Dye (3 x) (Ambion) und Ethidiumbromid (Endkonzentration 50µg/ml) versetzt und 10 min bei 65 °C denaturiert wurden.

Die Elektrophorese wurde bei 40 V in MOPS-Puffer (Ambion) durchgeführt. Nach der Auftrennung, die ungefähr 90 min dauerte, wurde die Qualität unter UV-Licht überprüft.

3.4.7.5 Transfer und Detektion von RNA auf Membranen (Northern Blot)

3.4.7.5.1 Transfer von RNA (Northern Blot)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der RNA-Proben (siehe 3.4.5.3) wurde die RNA mittels Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N+) transferiert. Hierfür wurde die abwärtsgerichtete Methode gewählt. Es wurden trockene Whatman-Papiere auf einen Stapel von Einmalhandtüchern (ca. 3 cm) gelegt. Es folgten mit Transferpuffer (Ambion) angefeuchtete Whatman-Papiere. Darauf wurde die angefeuchtete Membran gelegt und nochmals mit etwas Puffer befeuchtet. Schließlich wurde das Gel auf die Membran überführt. Um Luftblasen zu vermeiden, wurde kurz mit einer Einmalpipette über das Gel gerollt. Es folgten weitere angefeuchtete Whatman-Papiere und ein langer Streifen Filterpapier, der ebenfalls angefeuchtet war und als Puffer-Brücke diente. Ein Ende befand sich in einem mit Transferpuffer gefüllten Reservoir, um zu gewährleisten, dass der Blot gleich bleibend feucht blieb und somit die Kapillarkraft durchgängig wirken konnte. Der Blot wurde mit einem Gewicht beschwert und mit Folie abgedeckt, um den Transfer zu verbessern. Der Blot-Vorgang dauerte 90 min. Anschließend wurde die Membran im MOPS-Laufpuffer kurz geschwenkt und bei 80 °C für 20 min gebacken, wodurch die RNA kovalent an die Membran gebunden wurde. Bis zur Hybridisierung wurde die Membran in einer Folie bei -20 °C aufbewahrt.

3.4.7.5.2 Herstellung radioaktiver Sonden

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonden wurde mit Hilfe des Megaprime DNA-labelling-Systems (Amersham) durchgeführt. Nach Denaturierung des zu markierenden DNA-Doppelstranges erfolgte der Nukleotideinbau des [α ³²P]-dCTP durch die Klenow-Polymerase, wobei Random-Hexamere als Primer dienten. Die Reaktion wurde wie vom Hersteller angegeben angesetzt und für 1 h bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt. Anschließend wurden nicht eingebaute Radionukleotide über eine G25-Sephadexsäule abgetrennt. Diese wurde zuvor mit TE-Puffer äquilibriert und im Anschluß mit der

zugegebenen Probe für 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Einbau der Radioaktivität durch Messung eines Aliquots im Szintillationszähler bestimmt. Es wurden ausschließlich Sonden verwendet, die nach dem Einbau der Radioaktivität mindestens einen Wert von 1×10^9 dpm/ μ g DNA aufwiesen.

3.4.7.5.3 Hybridisierung

Die Membran wurde zunächst mit Hybridisierungspuffer (Ambion) für mindestens 4 h bei 42 °C im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Anschließend wurde die zuvor radioaktiv-markierte und denaturierte Sonde ($1,5 \times 10^6$ dpm/ml Hybridisierungslösung) zugegeben und die Membran über Nacht bei 42 °C h hybridisiert. Danach wurden die Blots zunächst mit der low-stringency Waschlösung und anschließend mit der high-stringency Waschlösung gewaschen, um unspezifisch gebundene Radioaktivität zu entfernen. Im Anschluß wurde die Membran feucht in Folie eingeschweißt und bei -80 °C autoradiographiert. Danach konnten die Filme eingescannt und die Signale analysiert werden.

3.4.7.5.4 Wiederverwendung von Northern Blot-Filtern durch Strippen

Zur erneuten Verwendung der Blots wurde die gebundene Radioaktivität durch zehnminütiges Kochen in 0,1 % SDS entfernt.

3.5 Proteinbiochemie

3.5.1 Analyse von Proteinen

3.5.1.1 Herstellung von Homogenaten aus Gehirn und Milz

Die Organe wurden zunächst gewogen und TBS (25 mg CaCl_2 /100 ml) zugegeben (1 ml/0,1 g), um ein 10 %iges Homogenat herzustellen. Das Gewebe wurde mit Hilfe von Ultraschall zerkleinert und homogenisiert. Danach schloss sich ein Verdau mit 0,25 % Collagenase (1 mg/10 μ l) an.

Homogenate die für einen PrP^{Sc}-Nachweis vorgesehen waren, wurden schließlich noch mit Proteinase K (25 μ g/ml) 1 h bei 37 °C verdaut.

Für Homogenate, die im ELISA eingesetzt werden sollten, wurden die Organe im 10fachen Volumen TBS (pH 8,0), das Proteinase-Inhibitoren (1 Tablette/10 ml) enthielt, mittels Ultraschall homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.5.1.2 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der SDS-PAGE können Proteine der Größe nach aufgetrennt werden. Durch das SDS werden Proteine denaturiert und mit einer gleichmäßig verteilten negativen Ladung versehen, so dass ihre Wanderungsgeschwindigkeit im Gel nur von ihrer Größe bestimmt wird.

Die Proteinproben wurden mit LPP-Auftragspuffer versetzt und durch Kochen für 5 min denaturiert. 20 µl des Ansatzes wurden zusammen mit 1 µl Längenstandard (MagicMarkerXP) aufgetragen. Die Polyacrylamidkonzentration betrug im Trenngel 12,5 % und im Sammelgel 5 %. Das Gel wurde wie folgt hergestellt:

Komponenten	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid	3,1 ml	1,25 ml
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	1,25 ml	1,25 ml
20 % SDS	50 µl	50 µl
A. dest.	4,3 ml	3,07 ml
TEMED	10 µl	10 µl
10 % (w/v) APS	30 µl	50 µl

Der Gellauf erfolgte zunächst 15 min bei 100 V und dann bei 200 V. Er wurde beendet, als die Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte. Als Laufpuffer wurde Laemmli-Elektrophoresepuffer verwendet.

3.5.1.3 Transfer und Detektion von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

3.5.1.3.1 Transfer von Proteinen (Western Blot)

Mit Hilfe des Western Blots können Proteine spezifisch nachgewiesen werden. Proteine eines SDS-Gels werden elektrophoretisch auf eine Membran übertragen (geblottet) und können durch eine Antikörper-Reaktion detektiert werden. In diesem Fall wurde der Western Blot zur Detektion von PrP^{Sc} eingesetzt.

Die Blot-Membran, bestehend aus Polyvinylidendifluorid (PVDF), wurde zunächst in 20 ml Methanol aktiviert, bevor 80 ml Blotpuffer zugegeben wurden. Die Membran wurde auf zwei mit Blotpuffer befeuchtete Whatman-Papiere gelegt. Das Gel wurde vorsichtig auf die Membran überführt und zwei weitere befeuchtete Whatman-Papiere folgten. Es wurde für 20 min bei 200 V pro Membran in einer Blotkammer geblottet. Die Membran konnte anschließend getrocknet werden, um sie zu einem späteren Zeitpunkt weiterzuverwenden. Allerdings musste sie dann nochmals in Methanol aktiviert werden. Ansonsten wurde die Membran gleich nach dem Blot für eine Antikörper-Reaktion eingesetzt.

3.5.1.3.2 Detektion von Prion-Protein PrP^{Sc}

Für die Detektion von PrP^{Sc} wurde die Membran nach dem Blotten 3 x kurz in TBST geschwenkt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper ICSM 18 (Verdünnung 1:5000 in TBST) ÜN bei 4 °C. Anschließend wurde die Folie 3 x kurz und 2 x 10 min mit TBST gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde AP-konjugiertes anti-Maus IgG aus der Ziege (Verdünnung 1:5000 in TBST) bei einer Inkubationsdauer von 1 h verwendet. Nach dreimaligem, kurzen Spülen mit TBST wurde die Membran noch mal 2 x 10 min mit TBST gewaschen. Schließlich wurde sie 2 x 5 min mit Assaypuffer vorinkubiert, auf Filterpapier getrocknet und anschließend mit 5 ml CDP-Star (Verdünnung 1:50 in Assaypuffer) für 5 min benetzt. Die Membran wurde nochmals zwischen Filterpapier getrocknet, in eine Development-Folder überführt und in eine Film-Kassette eingelegt. Nach 1 h konnte ein Film aufgelegt und entwickelt werden.

3.5.1.4 Immunpräzipitation von PrP^{Sc} mit dem Antikörper 15B3

Für die Immunpräzipitation von PrP^{Sc} wurde der von Prionics hergestellte monoklonale Antikörper 15B3 verwendet, der spezifisch PrP^{Sc} erkennt. Sowohl das PK-resistente PrP^{Sc} als auch nicht-resistentes PrP^{Sc} sollen durch 15B3 gebunden werden. Der Antikörper wurde mit den vom Hersteller mitgelieferten Puffern eingesetzt.

Zunächst wurden die für die Immunpräzipitation verwendeten Dynabeads (Invitrogen) vorbereitet. Hierfür wurden die Dynabeads resuspendiert und 1-2 min gevortext. Für 8 Proben wurden 2 x 250 µl dieser Dynabeadssuspension in je ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, da für die Immunpräzipitation zwei verschiedene Ansätze gemacht werden sollten. Nachdem die Eppendorfgefäße 1 min auf einen Magnetständer gestellt wurden, wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Anschließend folgte die Zugabe von 5 Vol. Coatingpuffer (500 µl Puffer/ 100 µl Dynabeads), was einer Pufferzugabe von je 1250 µl entsprach. Nachdem alles gevortex wurde, wurde dieser Schritt anschließend noch einmal wiederholt. Schließlich wurden die Ansätze unterschiedlich behandelt. Zum ersten wurde der Antikörper 15B3 (2 µg/ 100 µl Dynabeads) zugegeben. Der zweite erhielt keine Antikörperzugabe. Die Ansätze wurden 2 h bei RT schüttelnd inkubiert. Danach wurde erneut der Überstand entfernt und Coatingpuffer zugegeben. Das ganze erfolgte zweimal. Schließlich wurden die Dynabeads mit 250 µl Coatingpuffer überschichtet und bei 4 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Für die Immunpräzipitation wurden zunächst 30 µl 10 %igem Milzhomogenat mit 60 µl Homogenisierungspuffer verdünnt. 10 µl dieses verdünnten Hirnhomogenats wurden dann zu 435 µl Immunpräzipitationspuffer gegeben und gevortext. Schließlich folgte die Zugabe von je 30 µl gecoateten Dynabeads. Die Probenansätze wurden 2 h bei RT schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden sie auf einen Magnetständer gestellt und der Überstand wurde abgenommen. Die Probenansätze wurden insgesamt dreimal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Nachdem der gesamte Puffer schließlich entfernt wurde, erfolgte die Zugabe von 25 µl 2x SDS Loadingpuffer je Probe. Die Ansätze wurden gevortext und 5 min gekocht. Anschließend wurden sie kurz anzentrifugiert und 2 min auf einen Magnetständer gestellt. Der Überstand wurde abgenommen und auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen.

3.5.1.5 Detektion von Proteinen durch ELISA

Der ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) ist eine immunologische Nachweismethode von Proteinen. Dieser Mikrotiterplattentest ist so konzipiert, dass Antikörper oder Antigene in die Vertiefung von Polyvinylchlorid- oder Polystyrolplatten aufgezogen werden. In einer bestimmten Abfolge werden die Vertiefungen dann weiter mit Antikörpern, Antigen und enzymkonjugierten Antikörpern beschichtet. Der Nachweis des Antigens erfolgt über eine enzymatische Farbreaktion.

Der hier verwendete Quantikine mouse BLC/BCA-1/CXCL13 ELISA von R&D Systems wurde den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt.

3.5.1.6 Detektion von PrP^{Sc} in Dendritischen Zellen mittels Western Blot

Dendritische Zellen, die zuvor aus dem Knochenmark von Wildtyp- und CD36/SR-A-defizienten Mäusen isoliert wurden (siehe) und anschließend mit PrP^{Sc} infiziert wurden, wurden aus den Wells der Zellkulturschalen geschabt, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und herunterzentrifugiert. Die Zellen wurden im nächsten Schritt lysiert. Hierfür wurde 1 ml Lysispuffer WB auf die Zellen gegeben und geschwenkt. Der Ansatz wurde 10 min bei RT inkubiert und anschließend in ein neues Eppendorfgefäß überführt und herunterzentrifugiert. 500 µl des Überstandes wurden in ein 15 ml Falkongefäß pipettiert. Es folgte die Zugabe von 1 µl 1 %iger Proteinase K. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend durch die Zugabe von 1 %igem Pefabloc gestoppt. Zu allen Proben wurde das 5 fache Volumen Methanol zugefügt und die Proteine bei -20 °C ÜN präzipitiert. Am nächsten Tag wurden die Überstände abzentrifugiert (25 min, 3500 rpm, 4 °C). Die Präzipitate wurden in 25 µl TNE-Puffer resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 12,5 µl 3 x SEB Loadingpuffer. Die Ansätze wurden 5 Minuten gekocht und kurz auf Eis abgekühlt. Von jeder Probe wurden 15 µl auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Auftrennung sowie der Transfer und die Detektion des PrP^{Sc} wurden wie in 3.5.1.2 und 3.5.1.3 durchgeführt.

3.6 Zellkultur

3.6.1 Kultivierung von SNB19-Zellen

Die Zelllinie SNB19 wurde in Dulbecco's MEM (D-MEM) mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5-10 % CO₂ inkubiert. Wenn sie konfluent gewachsen waren, wurden sie alle 3-5 Tage 1:10 gesplittet. Hierfür wurde zunächst der Zellüberstand abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen, um alle FKS-Reste zu entfernen. FKS hemmt die Aktivität von Trypsin. Anschließend wurden die Zellen mit 1-2 ml Trypsin Sol 0,25 % bei 37 °C inkubiert. Nach 5 min wurden 5 ml Medium zugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren eine homogene Zellsuspension erzielt. Diese wurde für 5 min bei 1200 g und RT zentrifugiert. Der ÜS wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert. Je 0,5 ml der Zellsuspension wurden in eine neue Zellkulturflasche gegeben, in der bereits 8 ml Medium vorgelegt

wurden. Die Zellen wurden durch leichtes Schwenken der Flasche gleichmäßig verteilt und bei 37 °C und 5-10 CO₂ inkubiert.

3.6.2 Transfektion von SNB19-Zellen

Um die Expressionskonstrukte auf ihre Effizienz zu testen bevor sie in Mäuse injiziert wurden, wurden sie in die Zelllinie SNB19 transformiert. Damit die Zellen überhaupt in der Lage sind, Nukleinsäuren aufzunehmen, werden sie mit speziellen Chemikalien behandelt, die die Zelloberfläche porös machen. So kann die DNA durch die Zellwand in die Zelle gelangen. In diesem Fall wurde Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) verwendet, das stabile Komplexe mit der DNA ausbildet.

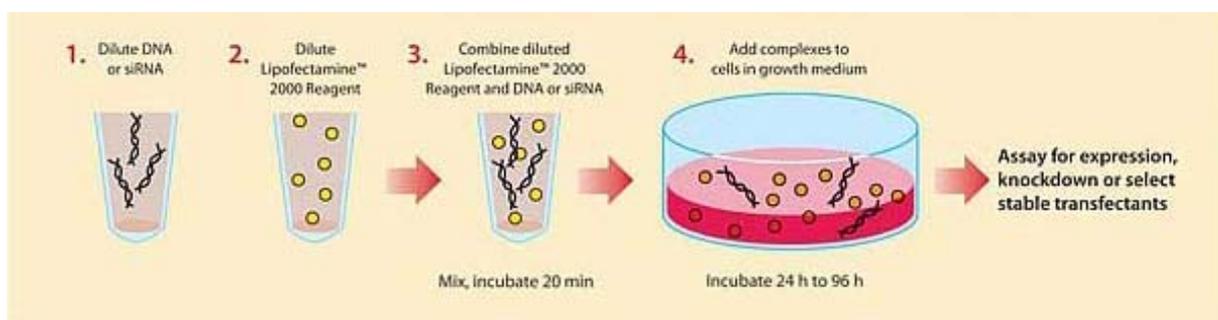


Abbildung 8: Transfektion mit Lipofectamine™ 2000. DNA bildet mit Lipofectamine™ 2000 stabile Komplexe, mit denen die Zelllinie sehr einfach transfiziert werden kann. Dabei werden die gebildeten Komplexe einfach auf die Zellen gegeben und für 24 h bis 96 h inkubiert. Dabei zeigt das Reagenz eine geringe Zelltoxizität. (www.invitrogen.com).

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion 2×10^5 Zellen/500 µl Medium (ohne Antibiotika, da diese während der Transfektion zum Zelltod führen!) in 24-well Platten ausgesät. Nach weiterem Mediumwechsel hatten sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Zelldichte von etwa 90-95%. Schließlich wurden 0,8 µg der DNA, mit der transfiziert werden sollte, in 50 µl des gleichen Mediums (D-MEM, 10 % FKS, ohne Antibiotika) verdünnt und vorsichtig gemischt. Als Kontrollvektor wurde pEGFP-N1 (Clontech) mitgeführt. Dieser Vektor codiert für eine Variante des GFP-Proteins, das fluoreszierende Eigenschaften besitzt. Er bietet eine einfache Möglichkeit, den Erfolg einer Transfektion zu beurteilen, da die transfizierten Zellen auf grüne Fluoreszenz untersucht werden können. Des Weiteren wurden 2 µl Lipofectamine™ 2000 in 50 µl Opti-MEM I Medium verdünnt. Der Ansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert und schließlich wurde er zur verdünnten DNA zugefügt. Die DNA und das Lipofectamine™ 2000 wurden 20 min bei RT belassen, damit sich Komplexe ausbilden konnten. Anschließend wurden die 100 µl des Ansatzes zu dem entsprechenden well pipettiert. Durch vorsichtiges Schwenken der Platte, wurde der Komplex verteilt. Die Zellen wurden dann für 24-48 h bei 37 °C und 5-10 CO₂ inkubiert. Der Zellüberstand wurde nach 24h und nach 48 h abgenommen. Die Zellen selber wurden lysiert und zusammen mit den Überständen bei -20 °C eingefroren.

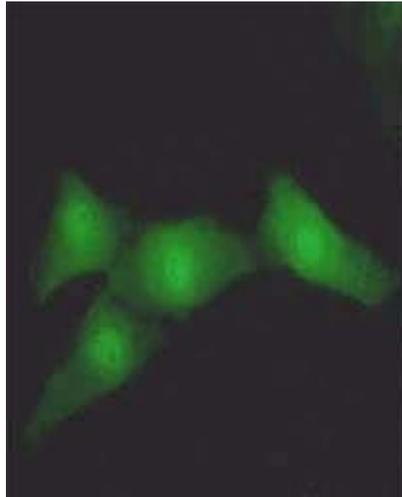


Abbildung 9: Transfektion mit pEGFP-N1. Der Vektor pEGFP-N1 bietet eine gute Möglichkeit, die Transfektionsrate zu bestimmen. Das Protein GFP besitzt fluoreszierende Eigenschaften. Nach erfolgreicher Transfektion leuchten die transfizierten Zellen grün, was gut unter einem Mikroskop beobachtet werden kann (www.biomicro.sdstate.edu).

3.6.3 Herstellung und Kultivierung von dendritischen Zellen aus Mäusen

Zur Herstellung von dendritischen Zellen wurden Mäusen im Alter von 6 Wochen verwendet. Hierfür wurden Knochenmarkszellen aus 3 CD36/SR-A-defizienten Mäusen und aus 3 Wildtypkontrolltieren isoliert.

Zunächst wurden die Tiere betäubt und mit einem Genickbruch getötet. Nachdem der Unterleib der Mäuse mit Alkohol eingesprüht wurde, wurden die beiden Hinterbeine am Hüftknochen abgetrennt. Muskel und Haut wurden so gut wie möglich von den Knochen entfernt, die anschließend in eiskaltes PBS gegeben wurden.

In der Zwischenzeit wurde RPMI-Medium ohne FKS, aber mit Antibiotika (Streptomycin und Penicillin, 1 %) und β -Mercaptoethanol (1,55 μ l auf 500 μ l) vorbereitet. 6 ml des Mediums wurden in einer Zellkulturschale vorgelegt.

Die Knochen wurden nun aus dem PBS genommen und mit autoklavierten Mullbinden, die in 70 %igem Isopropanol getränkt waren, abgerieben. Anschließend wurden die Knochen im Medium geschwenkt, um den Alkohol zu entfernen. Im nächsten Schritt wurde eine Spritze mit einer 25G – Kanüle mit Medium aufgezogen. Die Kanüle wurde direkt ins Knochenmark gestochen, um dieses mit dem Medium in eine neue Zellkulturschale herauszuspülen. Die Zellklumpen des Knochenmarks wurden mit einer Pasteurpipette so lange resuspendiert, bis eine homogene Zelllösung vorlag. Dieser Vorgang wurde mit allen Knochen wiederholt.

Die gewonnenen Zellen wurden anschließend in ein Falcon überführt und herunterzentrifugiert (1200-1300 rpm, 10 min; 4 °C). Das alte Medium wurde abgenommen und das Zellpellet mit 5 ml Lysispuffer resuspendiert und 3 min bei RT inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Danach wurden die Zellen über ein Sieb „filtriert“ und in einem neuen Falcon aufgefangen. Es wurden 20 ml frisches RPMI-Medium, das neben den Antibiotika nun auch 5 % FKS enthielt, zu den Zellen gegeben. Der Ansatz

wurde bei 1200 rpm und 4 °C 10 min zentrifugiert. Nachdem das alte Medium abgenommen wurde, wurde das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert.

Anschließend wurden die Zellen gezählt. Dabei sollte etwa eine Zellzahl von $4,2 \times 10^7$ Zellen insgesamt herauskommen. Die kugelig erscheinenden Zellen wurden in RPMI-Medium mit 5 % FKS auf eine Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Hierzu wurden die Zellen erneut zentrifugiert (1200 rpm; 10 min; 4°C) und in soviel Medium aufgenommen, um die entsprechende Zellzahl einzustellen. Das Medium enthielt nun als weitere Komponente GM-CSF (1:500 verdünnt, Grundkonzentration: 10 µg/ml). Die Zellen wurden anschließend in 24-well Platten kultiviert. Hierfür wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension pro Well pipettiert ($1,5 \times 10^6$ Zellen/well/ml).

Die Zellen wurden ÜN bei 37 °C und 5-10 % CO₂ inkubiert. Dabei bildeten sie kleine Auswüchse aus und waren weniger adherent. Je nachdem wie adherent sie noch waren, wurde am zweiten Tag unterschiedlich viel Überstand abgenommen. Bei sehr adherenten Zellen bis zu 800 µl Medium. Waren die Zellen weniger adherent wurden nur etwa 500 µl Medium abgenommen. Anschließend wurde genauso viel Medium wieder zugeführt, so dass die Konzentration des GM-CSF wieder 0,02 µg/ml entsprach. Dieser Schritt wurde am 4. Tag wiederholt.

Die Zellen wurden schließlich am 6. Tag geerntet. Sie hatten inzwischen kleine spitze Auläufer ausgebildet und waren als schwimmende Zellen im Mikroskop zu erkennen. Sie wurden nun in den Wells resuspendiert und in ein Falcon überführt. Die Wells wurden anschließend nochmals mit 500 µl warmen Medium (RPMI, 10 % FKS ohne GM-CSF) ausgespült. Die erhaltene Zellsuspension wurde kurz anzentrifugiert (1100 rpm, 10 min, 4 °C) und in 2 ml frischem Medium (10 % FKS, ohne GM-CSF) resuspendiert. In ein 15 ml Falcon wurden nun 4 ml BSA (30 %) gegeben. Die Zellen wurden langsam auf das BSA geschichtet. Der Ansatz wurde bei 2500 rpm und 4 °C 10 min zentrifugiert. Die Bremse wurde ausgeschaltet. In der Zwischenzeit wurden 10 ml frisches Medium in ein 50 ml Falcon vorgelegt. Anschließend wurde der Zellring, der bei der Zentrifugation entstanden ist, vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und in das Falcon überführt. Das Medium wurde auf 40 ml aufgefüllt. Es folgten zwei Zentrifugationsschritte (1700 rpm, 20 min, 4 °C und 1200 rpm, 10 min, 4 °C). Schließlich wurden die Zellen in 2 ml RPMI-Medium aufgenommen (5 % FKS, GM-CSF 1:500) und gezählt. Sie wurden auf 1×10^6 Zellen/ml gebracht und in 6-well Platten ausgesät (3 ml/well). Nun konnten die erhaltenen dendritischen Zellen für weitere Experimente verwendet werden.

3.6.4 Infektion von dendritischen Zellen mit PrP^{Sc}

Für die Infektion der dendritischen Zellen, die wie in 3.5.3 hergestellt wurden, wurden die Zellen zunächst mit LPS behandelt. Dies sollte zur Ausdifferenzierung der Zellen dienen. Hiefür wurden 30 µl LPS pro well (Endkonzentration 10 ng/ml) dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurden die Zellen mit 10 µl eines 10 %igem Hirnhomogenats versehen. Hierbei wurden zwei Ansätze gemacht. Einmal mit Scrapie-infiziertem Hirnhomogenat und zum anderen mit Hirnhomogenat, das von einer nicht-infizierten Maus stammte. Die infizierten Zellen wurden nach 48 h geerntet. Die Menge des phagozytierten PrP^{Sc} sollte anschließend wie in 3.5.1.6 beschrieben, detektiert werden.

3.7 Expressionskonstrukte

3.7.1 Das Konstrukt pBLC400v

Für die funktionelle Analyse des Chemokins CXCL13 (BLC) sollte ein Konstrukt zur Generierung transgener Mäuse hergestellt werden.

Hiefür wurde zunächst die Sequenz des murinen CXCL13 innerhalb des offenen Leserahmens aber mit einer verkürzten 3'UTR amplifiziert (7.1.1). Hierbei wurden an den Enden des Produkts jeweils eine BamHI- und eine NotI-Schnittstelle angefügt. Für die Amplifikation des 400 bp großen Fragments wurden die Primer TB2 und TB3 verwendet (2.6). Mithilfe des vorwärtsgerichteten Primers wurde in der PCR die Kozak-Sequenz verändert, wodurch sie optimiert werden sollte. Das mit BamHI und NotI geschnittene Fragment wurde in den linearisierten Expressionsvektor pEGFP-1/GFAP (bereitgestellt von Helmut Kettenmann, Berlin-Buch) ligiert. Dieser Vektor enthielt neben einer Kanamycin-Resistenzkassette eine GFAP-Promotor-Expressionskassette, die eine Astrozyten-spezifische Expression im ZNS ermöglichen sollte (Abb. 10).

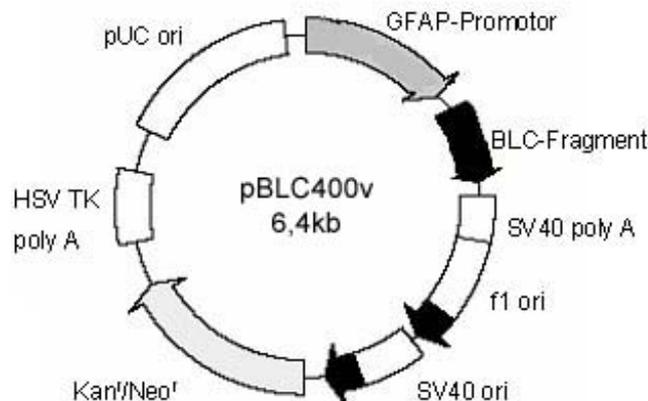


Abbildung 10: Das Plasmid pBLC400v. Eingezeichnet sind die Schnittstellen der zur Klonierung, Verifizierung und Linearisierung verwendeten Restriktionsendonukleasen.

Mit dem fertigen Konstrukt wurde anschließend die humane Zelllinie SNB19 transfiziert. Die Protein-Expression wurde mithilfe des Quantikine mouse BLC/CXCL13-ELISA Kits (R&D Systems) quantifiziert. Anschließend wurde das funktionelle 3kB-Fragment, das GFAP-Promotor und CXCL13-Sequenz beinhaltetete, aus dem Vektor mit BglII, DraIII und BspHI herausgeschnitten um damit schließlich transgene Mäuse zu generieren, wobei die Pronuclei-Methode angewendet wurde (in Kooperation mit Uwe Klemm, Berlin). Bei dieser Methode werden befruchtete Eier aus einer Spendermaus isoliert und mehrere Gen-Kopien in die Eier injiziert. Danach werden diese in eine pseudoschwangere Maus reimplantiert. Die Jungtiere werden mithilfe einer DNA-Analyse genotypisiert. Diese bestand hier aus einer DNA-Isolierung aus Mäuse-Schwänzen und anschließender PCR mit spezifischen Primern.

3.7.2 Das Konstrukt pBLC400u

Ein weiteres Konstrukt für die spätere Generierung von CXCL13-transgenen Mäusen sollte getestet werden. Dieses entsprach dem Konstrukt pBLC400v (3.7.1). Allerdings war seine Kozak-Sequenz nicht verändert. Für die Amplifikation des wurden die Primer TB1 und TB3 verwendet (2.6).

3.7.3 Das Konstrukt pBLC600v

Das Konstrukt pBLC600v entsprach dem Konstrukt pBLC400v (3.7.1). Seine 3' UTR war hingegen nicht verkürzt. Für die Amplifikation des Fragments wurden die Primer TB2 und TB4 verwendet (2.6).

3.7.4 Das Konstrukt pBLC600u

Für die funktionelle Analyse des Chemokins CXCL13 (BLC) wurde ein viertes Konstrukt hergestellt, das darauf getestet wurde, ob es zur Generierung von transgenen Mäusen geeignet ist. Es entsprach dem Konstrukt pBLC400v (3.7.1), aber seine Kozak-Sequenz wie auch seine 3' UTR waren nicht verändert. Für die Amplifikation des Fragments wurden die Primer TB1 und TB4 verwendet (2.6).

4 Ergebnisse

4.1 Expressionsanalyse von CD36 und SR-A im ZNS

4.1.1 Immunhistologische Untersuchung der Expression von CD36 im ZNS

In der Peripherie wird CD36 von einer Reihe unterschiedlicher Zelltypen exprimiert, zu denen Makrophagen, mikrovaskuläre Endothelzellen, Thrombozyten, Adipozyten und Kardiomyozyten gehören (Febbraio et al., 2001). Die Expression im ZNS ist bislang kaum untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, dass CD36 im humanen adulten Gehirn von Mikroglia nur schwach exprimiert wird (Coraci et al., 2002). Eine starke Expression von CD36 konnte jedoch in von Monozyten stammenden humanen Makrophagen detektiert werden (Huh et al., 1995). Hier sollte die Expression von CD36 im ZNS nicht-infizierter und Scrapie-infizierter Mäuse untersucht und immunhistologisch dargestellt werden.

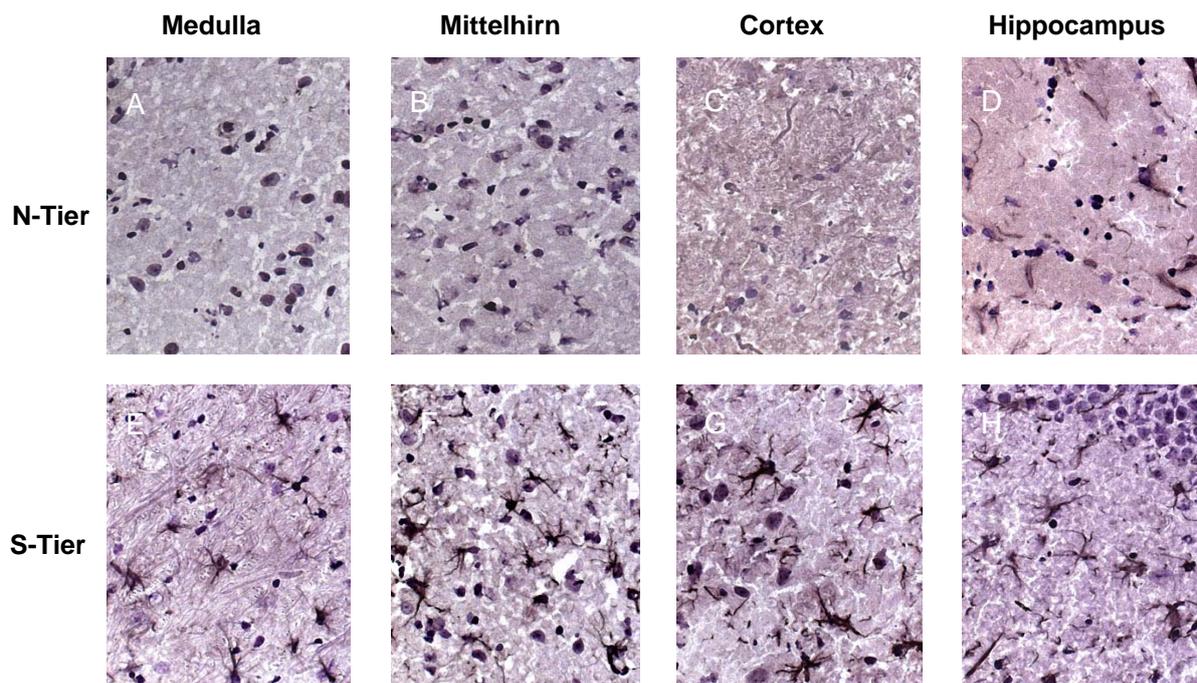


Abbildung 11: Expression von CD36 im ZNS. Es konnte gezeigt werden, dass CD36 im nicht-infizierten Gehirn (N-Tier) kaum exprimiert wird (A-C). Lediglich im Hippocampus konnte eine leichte Expression detektiert werden (D). Im Scrapie-infizierten Gehirn (S-Tier) wiesen alle Hirnregionen eine starke CD36-Expression auf, wie hier am Beispiel von Medulla (E), Mittelhirn (F), Cortex (G) und Hippocampus (H) gezeigt wird. (Vergrößerung 400x)

Es konnte im nicht-infizierten Gehirn nur eine leichte Expression von CD36 im Hippocampus (Abb. 11, D) detektiert werden. Im Scrapie-infizierten Gehirn hingegen wird CD36 sehr stark in allen Hirnregionen, wie z.B. Medulla, Mittelhirn, Cortex und Hippocampus exprimiert (Abb. 11, E-H).

Das morphologische Erscheinungsbild der CD36-exprimierenden Zellen deutete daraufhin, dass es sich nicht, oder zumindest nicht ausschließlich, um Mikroglia bzw. Makrophagen, sondern größtenteils

um aktivierte Astrozyten handelte. Um nachzuweisen, dass CD36 im ZNS von aktivierten Astrozyten exprimiert wird, wurde eine Doppelfärbung mit anti-CD36 (Abb. 12, A) und anti-GFAP (Abb. 12, C) durchgeführt. Die übereinander gelegten Aufnahmen (Abb. 12, B) zeigen eine eindeutige Übereinstimmung. CD36 wird von aktivierten Astrozyten im ZNS exprimiert.

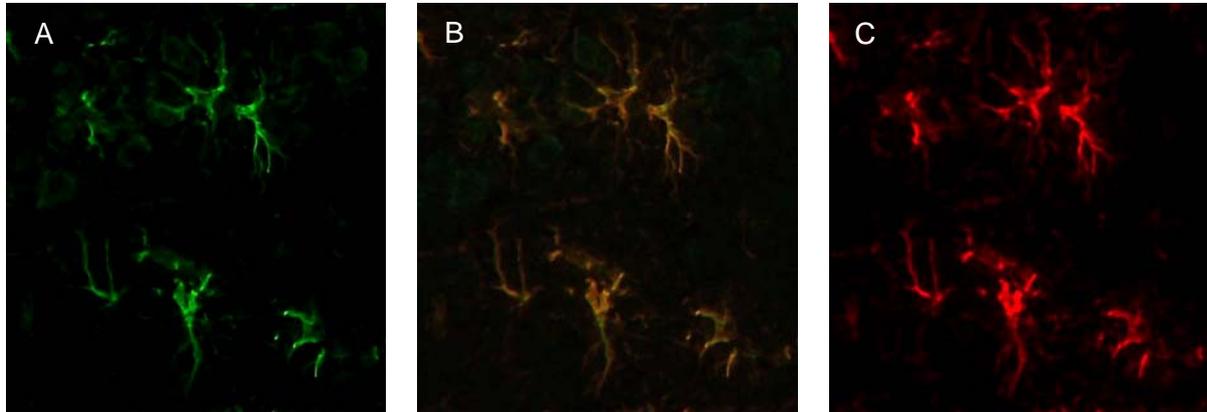


Abbildung 12: CD36-Expression im ZNS. Der Antikörper gegen GFAP war direkt an Cy3 gekoppelt. Für den Nachweis von anti-CD36 wurde ein Cy2-konjugierter Sekundärantikörper verwendet. Es wurden für die Aufnahme der jeweiligen Färbung unterschiedliche Filter verwendet, wodurch zwei Aufnahmen der gleichen Hirnregion entstanden (A und C), die anschließend mithilfe des Computer-Programms Photoshop übereinander gelegt wurden (B). Es zeigte sich eine eindeutige Übereinstimmung. CD36 wird von aktivierten Astrozyten im ZNS exprimiert. (Vergrößerung 400x)

4.1.2 Immunhistologische Untersuchung der Expression von SR-A im ZNS

SR-A wird in erster Linie in der Peripherie konstitutiv von mononuklearen Phagozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und Kupfferschen Stern-Zellen in verschiedenen Organen wie Milz, Leber, Herz und Darm exprimiert (Yamada et al., 1998). Im Gehirn erwachsener Mäuse findet man SR-A in geringem Maße auf Mato-Zellen (perivaskuläre Makrophagen) (Christie et al., 1998; Honda et al., 1998).

Für SR-A konnte keinerlei Expression im uninfizierten Gehirn detektiert werden (Abb. 13, A - D). Im Scrapie-infizierten Gehirn hingegen wurde eine Expression beobachtet, die aber im Vergleich zu CD36 deutlich schwächer war. Die SR-A Expression im Scrapie-infizierten Gehirn zeigte sich in allen untersuchten Hirnregionen wie z.B. Medulla, Mittelhirn, Thalamus und Hippocampus (Abb. 13, E - H).

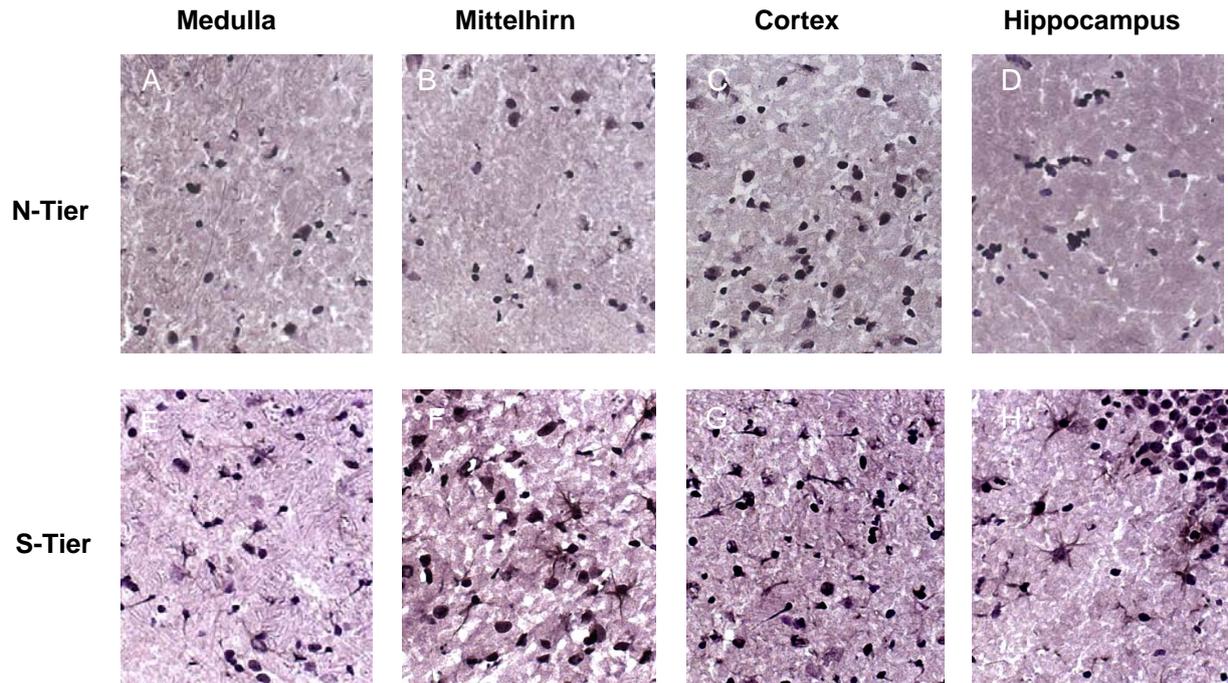


Abbildung 13: Expression von SR-A im ZNS. SRA wird im uninfizierten Gehirn (N-Tier) in keiner Hirnregion exprimiert, wie man hier am Beispiel von Medulla (A), Mittelhirn (B), Thalamus (C) und Hippocampus (D) sehen kann. Im Scrapie-infizierten Gehirn (S-Tier) hingegen lässt sich eine Expression detektieren. Gezeigt sind Medulla (E), Mittelhirn (F), Thalamus (G) und Hippocampus (H). (Vergrößerung 400x)

Das morphologische Erscheinungsbild deutete auf eine Expression durch Glia hin. Um den Zelltyp genau zu bestimmen, der SR-A im ZNS exprimiert, wurde auch hier eine Doppelfärbung mit anti-GFAP und anti-SR-A durchgeführt, die eindeutig belegte, dass SR-A ebenfalls von aktivierten Astrozyten im ZNS exprimiert wird (Abb. 14).

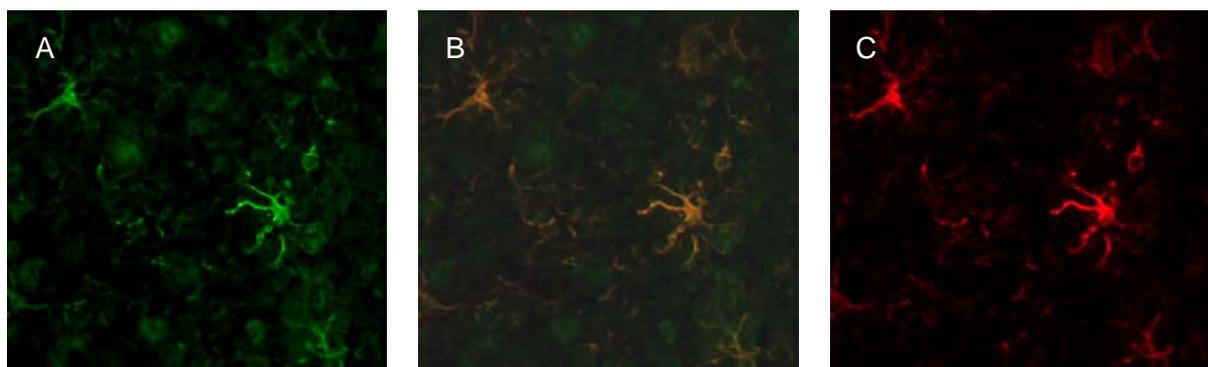


Abbildung 14: SR-A-Expression im ZNS. Mithilfe einer Doppelfärbung mit anti-SR-A (A) und anti-GFAP (C) sollte nachgewiesen werden, dass SR-A im ZNS von aktivierten Astrozyten exprimiert wird. Die übereinander gelegten Aufnahmen (B) zeigen, dass SR-A auch von aktivierten Astrozyten im ZNS exprimiert wird. (Vergrößerung 400x)

4.2 Infektionsstudien an CD36/SR-A-Knockout-Mäusen

Da die Scavenger Rezeptoren CD36 und SR-A im Scrapie-infizierten Gehirn eine deutliche Expressionssteigerung zeigen, sollte deren Einfluss auf die Scrapie-Pathogenese genauer untersucht werden.

Hierzu wurden sowohl CD36-defiziente, SR-A-defiziente, CD36/SR-A-defiziente Mäuse als auch Wildtyp-Kontrollmäuse mit dem gleichen genetischen Hintergrund C57Bl/6 intracerebral mit einem 10^{-4} verdünnten 10%igen Hirnhomogenat infiziert, das aus einer Scrapie-infizierten Maus im terminalen Krankheitsstadium stammte (3.2.2). Für die Untersuchungen der histopathologischen Veränderungen in der asymptomatischen Phase der Infektion wurde eine Gruppe der Mäuse zum Zeitpunkt 125 dpi getötet. Gehirn und Milz wurden entnommen und ihrem Verwendungszweck entsprechend fixiert. Die zweite Gruppe der Tiere wurde erst beim Erreichen des terminalen Krankheitsstadiums getötet. Auch hier wurden Gehirn und Milz entnommen und fixiert. Des Weiteren wurden entsprechende Mäuse intraperitoneal mit einem 10^{-1} und 10^{-2} verdünnten 10%igem Hirnhomogenat infiziert. Hier wurde jeweils ein Teil der Mäuse zu folgenden Zeitpunkten getötet: 30dpi, 60dpi und 100dpi. Die verbleibenden Tiere wurden erst zum terminalen Krankheitszeitpunkt getötet. Auch bei diesem Infektionsversuch wurden Gehirn und Milz entnommen und entsprechend fixiert.

4.2.1 Vergleich der Überlebenszeiten

Zunächst wurden die Überlebenszeiten von SR-A-, CD36-, CD36/SR-A-Knockout-Mäusen und Wildtypkontrollen für die intrazerebrale und intraperitoneale Infektion verglichen. Die Tiere wurden getötet, wenn sie den terminalen Krankheitszustand erreicht hatten. Die jeweilige Infektionsdosis, die Art der Infektion sowie die Anzahl der infizierten Tiere sind in Tabelle 1 und Diagramm 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Überlebensdaten (dpi) der Scrapie-infizierten SR-A-, CD36- und CD36/SR-A-Knockout-Tiere sowie der C57Bl/6-Kontrolltiere. Die Überlebenszeiten sind für die jeweiligen Infektionsversuche angegeben. Die statistischen Unterschiede bei den Überlebenszeiten wurden mithilfe des „logrank test“ ermittelt. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse ab einem Wert von $p < 0,05$ bewertet: * $p < 0,0002$, ** $p < 0,0024$, *** $p < 0,0005$.

Verdünnung des 10% Hirnhomogenats	SR-A-KO-Tiere	CD36-KO-Tiere	CD36/SR-A-KO-Tiere	C57Bl/6-Kontrolltiere
10^{-4} i.c.	192 ± 8 (n=8)	203 ± 15 (n=7)	183 ± 5 (n=8)*	205 ± 8 (n=7)*
10^{-1} i.p.	193 ± 7 (n=6)	201 ± 10 (n=6)	180 ± 8 (n=6)**	198 ± 8 (n=6)**
10^{-2} i.p.	207 ± 13 (n=6)	-	182 ± 6 (n=6)***	219 ± 15 (n=6)***

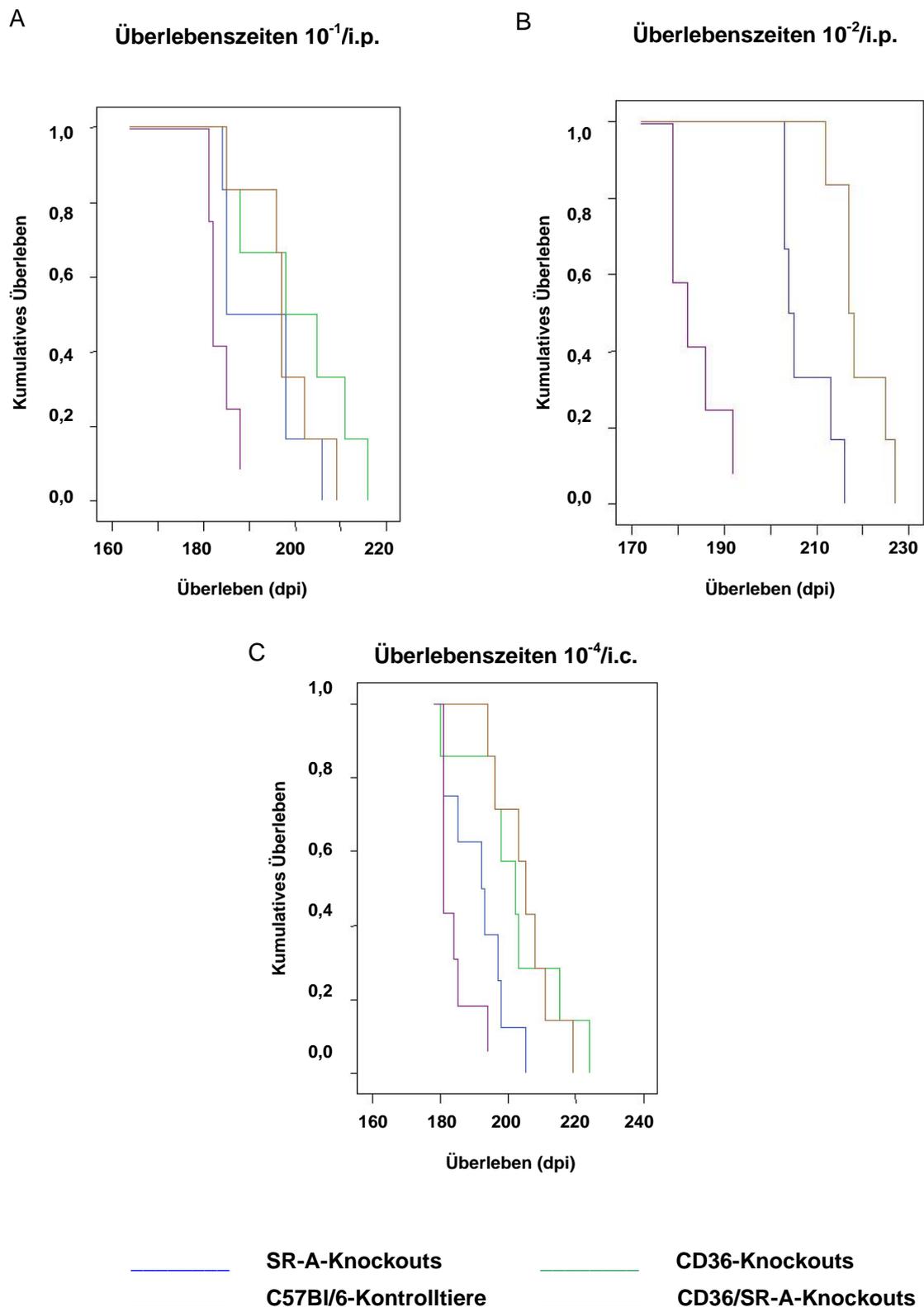


Diagramm 1: Kaplan-Meier Kurven zur Darstellung der Überlebenszeiten der Scrapie-infizierten Knockout-Mäuse und C57Bl/6-Kontrolltiere. Im Vergleich sind die Scrapie-infizierten Knockout-Mäuse und die entsprechenden C57Bl/6-Kontrolltiere der jeweiligen Infektionsversuche dargestellt. Besonders die CD36/SR-A-Knockout-Tiere zeigen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen hochsignifikant verkürzte Überlebenszeiten in allen Infektionsversuchen.

Aus Tabelle 1 und Diagramm 1 ist zu entnehmen, dass die intrazerebral infizierten SR-A-Knockout-Mäuse durchschnittlich nach 192 ± 8 dpi das terminale Krankheitsstadium erreichten. Die Wildtypkontrollen erreichten dieses Stadium im Durchschnitt erst nach 205 ± 8 dpi. Dies entspricht einem Unterschied von 13 Tagen. Die CD36-Knockout-Mäuse starben durchschnittlich nach 203 ± 15 dpi. Damit starben sie lediglich zwei Tage früher als die Wildtypkontrolltiere. Bei den Überlebenszeiten für die intraperitoneale Infektion war zu beobachten, dass die SR-A-defizienten Tiere im Durchschnitt 5 bzw. 12 Tage vor den Wildtypkontrollen starben. Die CD36-Knockout-Mäuse lebten im Durchschnitt 3 Tage länger als die C57Bl/6-Kontrollmäuse.

Die intrazerebral infizierten CD36/SR-A-Knockout-Mäuse erreichten durchschnittlich nach 183 ± 5 dpi das terminale Krankheitsstadium. Dies entspricht einem Unterschied von 22 Tagen gegenüber den Wildtypkontrollen und ist statistisch signifikant ($p < 0,0002$, logrank test; Diagramm 1, C). Bei der intraperitonealen Infektion starben die Knockout-Tiere ebenfalls früher. Hier ergab sich eine Überlebenszeit von 180 ± 8 dpi bei der 10^{-1} i.p.-Infektion, woraus sich ein Unterschied von 18 Tagen gegenüber den Kontrolltieren ergibt und ebenfalls statistisch signifikant ist ($p < 0,0024$, logrank test; Diagramm 1, A). Bei der 10^{-2} i.p.-Infektion starben die CD36/SR-A-Knockout-Tiere sogar durchschnittlich 31 Tage früher als die Wildtypkontrollen ($p < 0,0005$, logrank test; Diagramm 1, B). Diagramm 1 und Tabelle 1 geben einen Überblick über diese Ergebnisse.

4.2.2 Immunhistologische Untersuchungen der Scrapie-infizierten Knockout-Mäuse

Während der Scrapie-Infektion des ZNS können charakteristische histopathologische Veränderungen wie PrP^{Sc}-Ablagerungen, Mikrogliaaktivierung, Astrozytose und spongiforme Veränderungen beobachtet werden. Diese Parameter wurden bei den Scrapie-infizierten Knockout-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren immunhistologisch untersucht. Zu den Hirnregionen, die untersucht wurden, gehörten Hippocampus, Cortex, Cerebellum, Thalamus, Striatum/Septum, Medulla oblongata und das Mittelhirn.

Da das lymphoretikuläre System (LRS), zu dem auch die Milz gehört, bei der peripheren Replikation und Akkumulation von PrP^{Sc} eine entscheidende Rolle zu spielen scheint, wurde die PrP^{Sc}-Ablagerung zusätzlich in den Milzen der intraperitoneal infizierten Tiere untersucht.

4.2.2.1 PrP^{Sc}-Ablagerungen im Gehirn nach i.c.-Infektion

Als zentrales Ereignis der Scrapie-Pathogenese gilt die Ablagerung von PrP^{Sc} im Gehirn. Der Nachweis von PrP^{Sc} wurde mithilfe des PET-Blots durchgeführt.

4.2.2.1.1 PrP^{Sc}-Ablagerung im asymptomatischen Stadium der Infektion (125 dpi)

Die PET-Blot-Analysen der asymptomatischen Phase (125 dpi) zeigten Unterschiede in der PrP^{Sc}-Ablagerung zwischen den verschiedenen Tiergruppen.

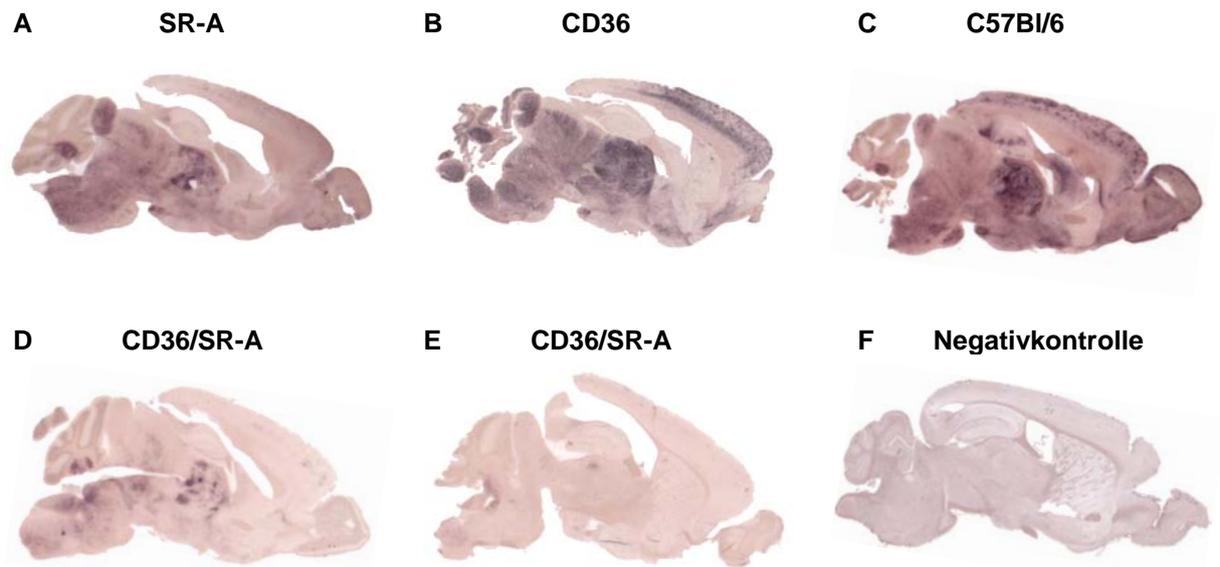


Abbildung 15: PET-Blot-Analyse zur Ablagerung von PrP^{Sc} bei den Knockout-Mäusen im Vergleich zu den C57Bl/6-Kontrolltieren zum Zeitpunkt 125 dpi. Die SR-A- und CD36-Knockout-Mäuse (A und B) zeigten zum Zeitpunkt 125 dpi eine ähnliche Ablagerung von PrP^{Sc} wie die Wildtyp-Kontrollen (C). Die CD36/SR-A-Knockout-Tiere (D und E) zeigten hingegen eine deutlich schwächere PrP^{Sc}-Ablagerung im Vergleich zu den Wildtypkontrollen. Ein Tier, das mit nicht-infektiösem Hirnhomogenat behandelt wurde, diente zur Negativkontrolle (F). Es zeigte keinerlei Signal.

Bei den SR-A-Knockout-Tieren konnte im Vergleich zu den C57Bl/6-Kontrolltieren eine ähnlich starke Ablagerung von PrP^{Sc} festgestellt werden. Beide Tiergruppen zeigten Ablagerungen im Hippocampus, Thalamus, Kleinhirn und Cortex (Abb. 15, A und C). Bei den CD36-Knockout-Mäusen und den Wildtypkontrollen konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Menge und Lokalisation der Ablagerung waren bei den CD36-Knockout-Mäusen und den C57Bl/6-Kontrolltieren vergleichbar (Abb. 15 B und C).

Die PET-Blot-Analysen der CD36/SR-A-Knockout-Tiere zeigten hingegen, dass die Ablagerung von PrP^{Sc} bei den C57Bl/6-Kontrolltieren deutlich stärker war im Vergleich zu den Knockout-Mäusen. Die Wildtyp-Kontrollen zeigten vermehrte Ablagerungen im Hippocampus, Thalamus, Kleinhirn und Cortex (Abb. 15, C). Bei den Knockout-Tieren war lediglich eine schwache Ablagerung im Thalamus und im Bereich des Stammhirns zu erkennen (Abb. 15, D und E). Die Negativkontrolle zeigte keinerlei Ablagerungen (Abb. 15, F).

4.2.2.1.2 PrP^{Sc}-Ablagerung im terminalen Stadium der Infektion

Zum terminalen Krankheitszeitpunkt konnten keinerlei Unterschiede zwischen den Scrapie-infizierten Tiergruppen festgestellt werden. Die SR-A-, CD36- und CD36/SR-A-Knockout-Mäuse zeigten im Vergleich zu den Wildtypkontrollen alle eine gleich starke PrP^{Sc}-Ablagerung auf (Abb. 16). Die Ablagerungen von PrP^{Sc} waren über den gesamten Schnitt verteilt. Besonders starke Signale konnten im Cortex, Hippocampus und Thalamus beobachtet werden (Abb. 16 A-E). Bei den Negativkontrollen konnte keine PrP^{Sc}-Ablagerung nachgewiesen werden (Abb. 16 F).

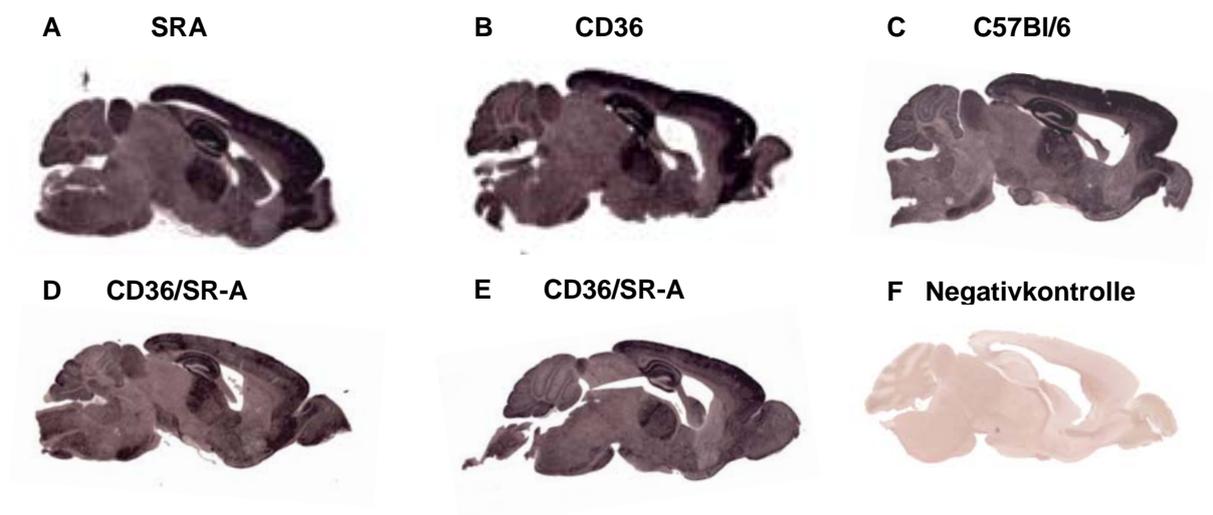


Abbildung 16: PET-Blot-Analyse zur Ablagerung von PrP^{Sc} bei den Knockout-Mäusen im Vergleich zu den C57Bl/6-Kontrolltieren zum terminalen Krankheitszeitpunkt. Bei den SR-A-, CD36- und CD36/SR-A-Knockout-Tieren als auch bei den Wildtyp-Kontrollen konnte eine gleich starke Ablagerung von fehlgefaltetem Prion-Protein festgestellt werden. Die Negativkontrolle zeigte wie erwartet keine Ablagerung.

4.2.2.2 PrP^{Sc}-Ablagerungen in der Milz nach i.p.-Infektion

Nach einer peripheren Infektion mit Prionen zeigt sich in der Milz bereits eine hohe Infektiösität noch bevor der Erreger im ZNS nachweisbar ist. Vor allem in den follikulären dendritischen Zellen (FDC's) der Milz findet eine Prion-Replikation statt (Kitamoto et al., 1991). Der Nachweis von PrP^{Sc} wurde mithilfe des Western Blots und des PET-Blots für unterschiedliche Zeitpunkte durchgeführt. Dabei wurde für den Western Blot der ICSM 18 Antikörper und für den PET-Blot der 6H4-Antikörper eingesetzt. Die Tiere, die untersucht wurden, waren intraperitoneal infiziert worden.

4.2.2.2.1 Western Blot (30, 60 und 100 dpi; i.p.-Infektion)

Die Western Blot-Analyse zur Ablagerung von PrP^{Sc} in der Milz wies bei allen Proben die charakteristischen drei Banden des fehlgefalteten Prion-Proteins mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 30 kDa auf, die der unglykosylierten, einfach- und zweifach glykosylierten Form des PrP^{Sc} entsprechen.

Zum Krankheitszeitpunkt 30 dpi konnte sowohl bei den intraperitoneal infizierten SR-A-Knockout-Tieren als auch bei den CD36-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen eine ähnliche PrP^{Sc}-Ablagerung in den Milzen beobachtet werden (Abb. 17 und 18).

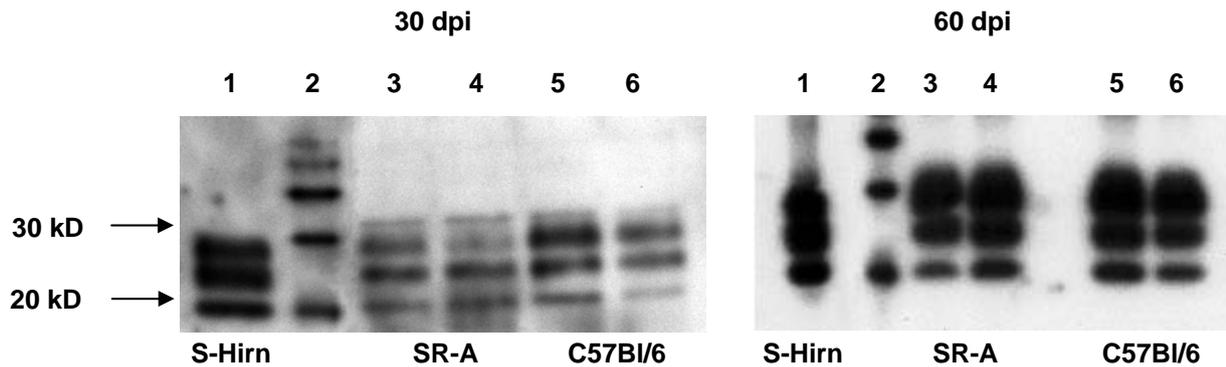


Abbildung 17: PrP^{Sc}-Ablagerung in der Milz SR-A-defizienter Tiere im Vergleich zu Wildtypkontrollen zu den Zeitpunkten 30 und 60 dpi. Zum Zeitpunkt 30 und 60 dpi konnte eine ähnliche PrP^{Sc}-Ablagerung in den Milzen der SR-A-Knockout-Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen detektiert werden. (Spur 1: S-Hirn, Spur 2: Marker, Spur 3/4: SR-A, Spur 5/6: C57Bl/6)

60 Tage nach der Infektion waren ebenfalls keine eindeutigen Unterschiede detektierbar. Die PrP^{Sc}-Ablagerung in den SR-A- und CD36-Knockout-Tieren entsprach annähernd der, die in den Wildtyp-Tieren beobachtet wurde (Abb. 17 und 18).

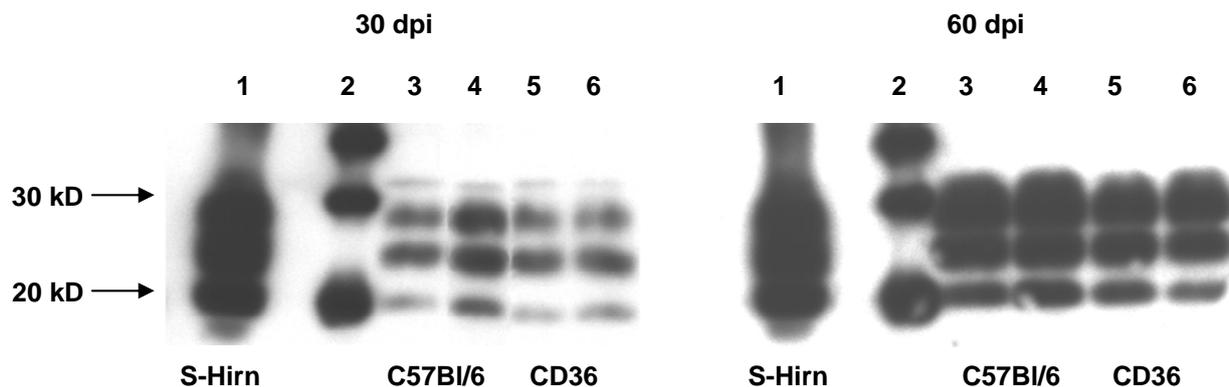


Abbildung 18: PrP^{Sc}-Ablagerung in der Milz CD36-defizienter Tiere im Vergleich zu Wildtypkontrollen zu den Zeitpunkten 30 und 60 dpi. Zum Zeitpunkt 30 und 60 dpi konnte eine ähnlich starke PrP^{Sc}-Ablagerung in den Milzen der Wildtyp-Tiere im Vergleich zu den CD36-Knockout-Tieren detektiert werden. (Spur 1: S-Hirn, Spur 2: Marker, Spur 3/4: C57Bl/6, Spur 5/6: CD36)

Allerdings ergaben die Western Blot-Analysen sehr deutliche Unterschiede zwischen den CD36/SR-A-Knockout-Mäusen und den Wildtypkontrollen. Für die Zeitpunkte 30 und 60 dpi konnte für die CD36/SRA-Knockout-Mäuse im Vergleich zu den C57Bl/6-Kontrolltieren ein deutlich schwächeres Signal detektiert werden (Abb. 19).

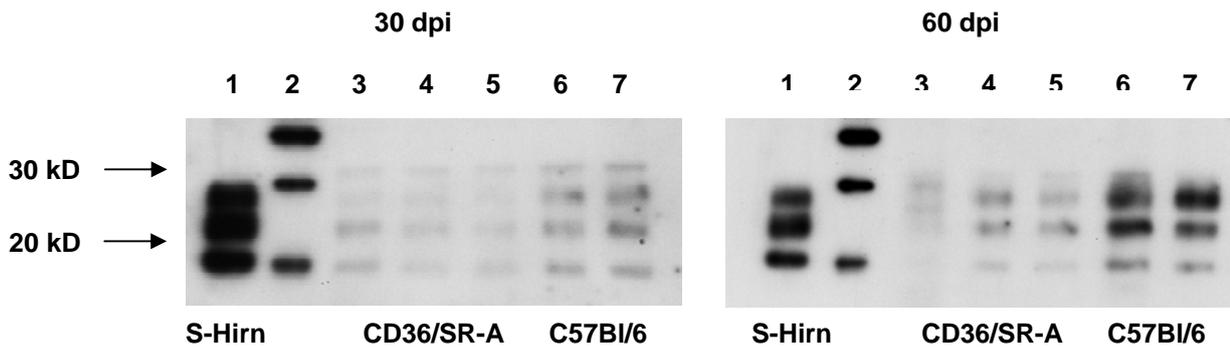


Abbildung 19: PrP^{Sc}-Ablagerung in der Milz zu den Zeitpunkten 30 und 60 dpi. Zu den Zeitpunkten 30 dpi und 60 dpi konnte eine schwächere PrP^{Sc}-Ablagerung in den Milzen der CD36/SR-A-Knockout-Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen detektiert werden. (Spur 1: S-Hirn, Spur 2: Marker, Spur 3/4/5: CD36/SR-A, Spur 6/7: C57Bl/6)

Zum Zeitpunkt 100 dpi konnten keine eindeutigen Unterschiede in der PrP^{Sc}-Ablagerung zwischen den einzelnen Tiergruppen mithilfe des Western Blots mehr detektiert werden. Die Einzel-Knockout-Tiere aber auch die CD36/SR-A-Knockout-Tiere zeigten eine ähnliche PrP^{Sc}-Ablagerung im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen (Abb. 20 A und B). Der zuvor detektierte Unterschied in der PrP^{Sc}-Ablagerung zwischen den CD36/SR-A-Knockout-Tieren und Wildtypkontrollen konnte zum Krankheitszeitpunkt 100 dpi kaum noch festgestellt werden (Abb. 20 B).

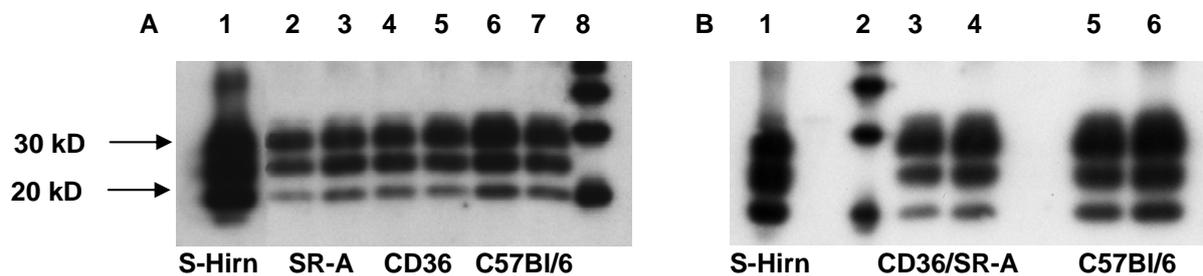


Abbildung 20: PrP^{Sc}-Ablagerung in der Milz zum Zeitpunkt 100 dpi. Es konnte für die SR-A-Knockout-Tiere und für die CD36-Knockout-Tiere eine kaum schwächere PrP^{Sc}-Ablagerung im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen in der Milz zum Zeitpunkt 100 dpi beobachtet werden (A). Für die CD36/SR-A-Knockout-Tiere konnte nur noch eine etwas schwächere PrP^{Sc}-Ablagerung im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen (B). (A: Spur 1: S-Hirn, , Spur 2/3: SR-A, Spur 4/5: CD36. Spur 6/7: C57Bl/6 Spur 8: Marker. B: Spur 1: S-Hirn, Spur 2: Marker, Spur 3/4: CD36/SR-A, Spur 5/6: C57Bl/6)

4.2.2.2 Pet-Blot (60 dpi; i.p.-Infektion)

Da die CD36/SR-A-Knockouts eine deutlich schwächere PrP^{Sc}-Ablagerung in den Milz aufwiesen, wurde für diese Tiergruppe im Vergleich zu den Wildtypen neben den Western Blot-Analysen auch eine PET Blot-Analyse von Milzen durchgeführt, die 60 Tage nach der Infektion entnommen wurden.

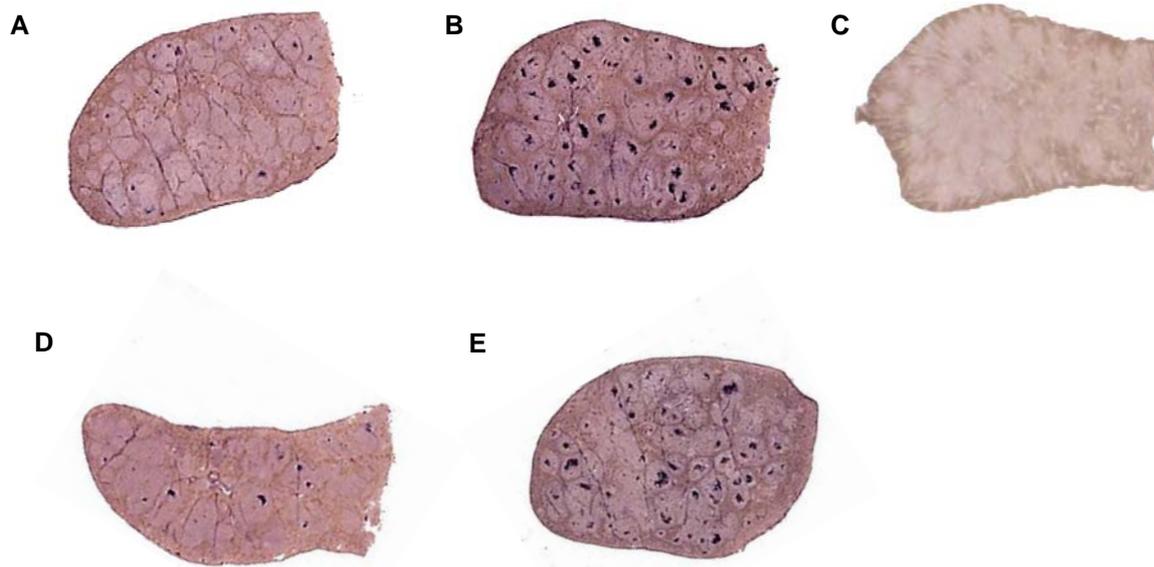


Abbildung 21: PET-Blot-Analyse der PrP^{Sc}-Ablagerung in Milzen zum Krankheitszeitpunkt 60 dpi. Die Ablagerung von fehlgefaltetem Prion-Protein war bei den Scrapie-infizierten Knockout-Tieren (A und D) schwächer im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen (B und E). Bei den mock-infizierten Mäusen (C) konnte kein PrP^{Sc} detektiert werden.

Die PET Blot-Analyse der Milzen konnte die Ergebnisse des Western Blots bestätigen. Auch hier konnte für das asymptotische Stadium 60 dpi eine deutlich schwächere PrP^{Sc}-Ablagerung bei den CD36/SR-A-Knockout-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen festgestellt werden (Abb. 21). Sowohl bei den Knockout-Tieren als auch bei den Wildtyp-Kontrollen fanden sich die Ablagerungen in den Lymphfollikeln der Milz, die die B-Zell-Regionen darstellen und sich in der weißen Pulpa der Milz befinden.

4.2.2.2.3 Immunpräzipitation aller PrP^{Sc}-Isoformen (60 dpi; i.p-Infektion)

Da die allgemein verwendeten Antikörper zur Detektion von Prion-Protein sowohl PrP^{Sc} als auch PrP^C binden, wird im Western Blot und auch im PET Blot vor dem spezifischen Nachweis von PrP^{Sc} ein Proteinase K-Verdau durchgeführt. Hierbei gehen PK-sensitive Anteile oder Zwischenstufen des PrP^{Sc} verloren. Diese scheinen zwar bereits typische Strukturelemente der β -Faltblattform angenommen zu haben, jedoch noch nicht die für eine Proteinase-Resistenz erforderliche Umfaltungsstufe erreicht zu haben. Um diese potentiell vorhandenen PK-sensitiven Zwischenstufen des infektiösen Prion-Proteins nachzuweisen, wurde eine Immunpräzipitation von PrP^{Sc} mit dem Antikörper 15B3 durchgeführt (3.5.1.4). Der Antikörper ist in der Lage, jede Form des PrP^{Sc} zu detektieren. Für die Immunpräzipitation wurden Milzhomogenate des Krankheitsstadiums 60 dpi von CD36/SR-A-Mäusen und Wildtypkontrollen eingesetzt. Da die Knockout-Tiere im Vergleich zu den Wildtypen früher sterben, aber in den PET Blot- und Western Blot-Analysen eine verringerte PrP^{Sc}-Ablagerung in Gehirn und Milz aufweisen, sollte mit der Immunpräzipitation festgestellt werden, ob eine verstärkte

Akkumulation eines möglichen PK-sensitiven PrP^{Sc} bei den Knockout-Tieren auftritt, wodurch die verkürzten Überlebenszeiten eventuell erklärt werden könnten.

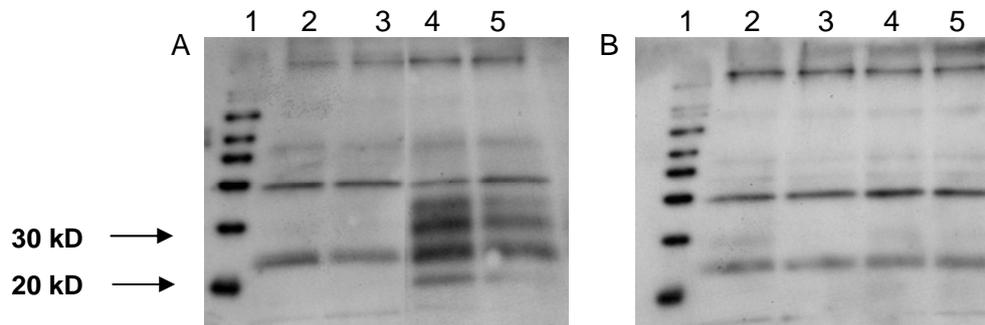


Abbildung 22: Immunpräzipitation von PrP^{Sc} mit dem Antikörper 15B3. Durch die Immunpräzipitation mit dem Antikörper 15B3 (A) konnte bei den Knockout-Tieren (A, Spur 2 und 3) im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (A, Spur 4 und 5) keine erhöhte Menge von PrP^{Sc} bzw. keine zusätzlichen Isoformen von PrP^{Sc} detektiert werden. Die Abbildung B zeigt die Immunpräzipitation ohne den Antikörper 15B3. Die detektierten Banden sind Hintergrund.

In Abbildung 22 zeigen alle Proben das gleiche Bandenmuster, was teils auf die unspezifische Bindung von Proteinen der Gewebehomogenate an die Dynabeads zurückzuführen ist.

Die beiden Proben der Wildtyp-Kontrollen (Abb. 22, A, Spur 4 und 5) zeigen zusätzlich zu diesen Banden das charakteristische Bandenmuster des PrP^{Sc}, während diese bei den Knock-out-Tieren (Abb. 22, A, Spur 2 und 3) kaum sichtbar sind. Damit wurde das Ergebnis des vorangegangenen Western Blots im Prinzip bestätigt. Neben einer verringerten Ablagerung des PK-resistenten PrP^{Sc} konnte auch eine schwächere Akkumulation von Gesamt-PrP bei den CD36/SR-A-Knockout-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren beobachtet werden.

4.2.2.4 Verimpfen von Milzen in tga20-Mäuse zum Nachweis infektiöser Prionen

Zum Nachweis der Infektiosität wurden tga20-Mäuse mit 10%igem Milzhomogenaten, die von infizierten Knockout-Tieren und Wildtypkontrollen stammten (60 dpi, i.p. 10^{-3}), intracerebral infiziert. Bei den tga20-Mäusen handelt es sich um transgene Tiere, die PrP^C stark überexprimieren (Fischer et al., 1996). Durch das Vorhandensein und die Überexpression von PrP^C sind diese Mäuse sehr empfindlich für Prion-Infektionen und zeigen eine deutlich verkürzte Inkubationszeit im Vergleich zu Wildtyptieren.

Es konnte festgestellt werden, dass sich die Milzhomogenate der verschiedenen Tiergruppen nur geringfügig bzgl. der Prion-Infektiosität unterscheiden ($p > 0,05$). Die infizierten tga20-Mäuse, die mit Milzhomogenaten infiziert wurden, die von SR-A-Knockout-Mäusen stammten, starben im Durchschnitt alle nach etwa 82 Tagen. Die Tiere, die mit Milzhomogenaten infiziert wurden, die von CD36/SR-A-Knockout-Mäusen stammten, starben nach durchschnittlich 85 Tagen. Die tga20-Mäuse aus der WT-Gruppe starben hingegen etwa 82 Tage nach der Infektion (Tabelle 2).

Tabelle 2: Überlebensdaten (dpi) von tga20-Mäusen nach Verimpfung von Milzhomogenaten zur Ermittlung der Infektiosität. Zum Nachweis der Infektiosität wurden tga20-Mäuse mit Milzhomogenaten (10%), die von infizierten Knockout-Tieren und Wildtypkontrollen stammten (60 dpi, i.p. 10^{-3}), intracerebral infiziert.

Milz von CD36/SR-A-KO-Tieren	Milz von SR-A-KO-Tieren	Milz von C57Bl/6-Kontrolltieren
85 ± 7 (n=6)	82 ± 3 (n=6)	82 ± 7 (n=6)

4.2.2.3 PrP^{Sc}-Akkumulation in dendritischen Zellen nach PrP^{Sc}-Infektion

Dendritische Zellen (DC's) sind Zellen des Immunsystems und haben eine wichtige Funktion bei der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation. DC's stellen eine heterogene Zellpopulation dar, die myeloide, lymphoide oder plasmazytoide Subpopulationen enthält (Rybner-Barnier et al., 2006; Ardavin et al., 2001). In ihrem Phänotyp ähneln sie Monozyten und Makrophagen mit denen sie auch einige Oberflächenmarker wie CD11b, F4/80 und CD68 gemeinsam haben (Aucouturier et al., 2002). Da PrP^C ebenfalls auf ihrer Oberfläche exprimiert wird, ist es durchaus möglich, dass die DC's als Prion-Replikationsort fungieren könnten. Aufgrund ihrer Fähigkeit, Antigene vom Ort ihrer Exposition ins lymphatische System zu transportieren, wird ebenfalls vermutet, dass DC's an der Neuroinvasion von Prionen beteiligt sind (Rybner-Barnier et al., 2006; Huang et al., 2002). So konnte auch gezeigt werden, dass DC's in der Lage sind, in das ZNS TSE-erkrankter Mäuse zu gelangen (Rosicarelli et al., 2005) und ohne Beteiligung anderer lymphatischer Faktoren PrP^{Sc} von der Peripherie in das ZNS zu transportieren (Aucouturier et al., 2002; Aucouturier et al., 2001).

Die CD36/SR-A-Knockout-Tiere zeigten in den vorangegangenen PET Blot- und Western Blot-Analysen eine schwächere PrP^{Sc}-Akkumulation in der Milz im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Der Grund hierfür könnte eine mögliche Hemmung der PrP^{Sc}-Aufnahme und Replikation sein, ausgelöst durch die Defizienz der beiden Scavenger Rezeptoren SR-A und CD36. Wie bereits beschrieben, werden diese unter anderem auch in der Peripherie exprimiert und sind unter anderem auch auf dendritischen Zellen zu finden (Becker et al., 2006). Da sie in der Lage sind, verschiedenste Liganden, wie z.B. β -Amyloid, zu binden und zu phagozytieren, sind sie vermutlich an der Aufnahme von PrP^{Sc} beteiligt.

Daher wurde untersucht, in wieweit die dendritische Zellen der CD36/SR-A-Knockout-Tiere noch in der Lage sind, PrP^{Sc} zu phagozytieren und aufzunehmen.

Für diese Untersuchung wurden dendritische Zellen aus dem Knochenmark von 6 Wochen alten Mäusen extrahiert (3.6.3) und mit PrP^{Sc} infiziert. Anschließend wurde von den infizierten Zellen ein Westernblot durchgeführt, um die von den Zellen akkumulierte PrP^{Sc}-Menge zu bestimmen.

Die Western Blot-Analyse der PrP^{Sc}-infizierten dendritischen Zellen ergab eine deutliche schwächere Akkumulation von PrP^{Sc} in den aus CD36/SR-A-Knockout-Mäusen (Abb. 23, Spur 5) stammenden dendritischen Zellen im Vergleich zu denen aus Wildtyp-Mäusen isolierten Zellen (Abb. 23, Spur 3). Dies deutet daraufhin, dass sie in viel geringerem Maße in der Lage sind, PrP^{Sc} zu binden und zu

phagozytieren. Anscheinend wird dies durch die CD36/SR-A- Defizienz vermittelt. Die nicht-infizierten Zellproben (Abb. 23, Spur 2 und 4) zeigten wie erwartet keinerlei PrP^{Sc}-Akkumulation. Allerdings reichen die hier gezeigten Daten nicht aus, um eine eindeutige und fundierte Aussage machen zu können. Sie weisen lediglich daraufhin, dass die oben beschriebene Annahme, dass die Scavenger Rezeptoren vermutlich an der Aufnahme von PrP^{Sc} beteiligt sind, möglicherweise begründet ist.

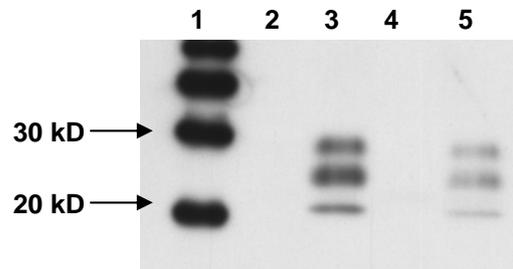


Abbildung 23: PrP^{Sc}-Ablagerung in dendritischen Zellen nach PrP^{Sc}-Infektion. Es konnte für die infizierten dendritischen Zellen aus CD36/SR-A-Knockout-Tieren (Spur 5) eine etwas schwächere PrP^{Sc}-Akkumulation im Vergleich zu den infizierten dendritischen Zellen aus Wildtyp-Mäusen (Spur 3) beobachtet werden. Spur 1: Marker; Spur 2: nicht-infizierte WT-Zellen; Spur 4: nicht-infizierte Knockout-Zellen.

4.2.2.4 Mikrogliaaktivierung

Als Folge der PrP^{Sc}-Ablagerung kommt es während der Scrapie-Pathogenese zu einer Aktivierung der Mikroglia (Williams et al., 1994; Campell et al., 1994). Aufgrund der Aktivierung kommt es auf diesen Zellen zu einer Expression verschiedener Proteine, die immunhistochemisch nachweisbar sind (Graeber et al., 1988). Für den immunhistologischen Nachweis von aktivierten Mikroglia wurde ein anti-Iba-1-Antikörper verwendet (*ionized calcium binding adapter molecule*) (3.3.7.2). Die histologischen Auswertungen erfolgten wie unter 3.3.9 angegeben.

4.2.2.4.1 Aktivierung von Mikroglia im asymptomatischen Stadium der Infektion (125dpi; i.c.-Infektion)

Mikroglia sind gleichmäßig über alle Hirnregionen verteilt und weisen meist eine verzweigte Morphologie auf, die als ramifiziert bzw. ruhend bezeichnet wird (Streit et al., 1988; Kreutzberg et al., 1996). Unter pathologischen Bedingungen wie z.B. neurodegenerativen Erkrankungen des ZNS werden die Mikroglia aktiviert (Kreutzberg et al., 1996). Durch diese Aktivierung kommt es zu einer morphologischen Veränderung der Zellen. Der Zellkörper vergrößert und die Ausläufer verkürzen sich (Streit et al., 1988; Kreutzberg et al., 1996). Eine solche Mikrogliaaktivierung konnte bei den untersuchten Tiergruppen bereits in der asymptomatischen Phase in fast allen Hirnregionen beobachtet werden. Lediglich im Cortex und Striatum konnten kaum aktivierte Mikroglia detektiert werden.

Die SR-A- und CD36-Knockout-Mäuse wiesen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen zum Krankheitszeitpunkt 125dpi eine ähnlich starke Mikrogliaaktivierung auf (Abb. 24, Diagramm 2). Die

aktivierten Mikroglia konnten außer im Cortex und Striatum in allen untersuchten Hirnregionen detektiert werden.

Die CD36/SR-A-Knockout-Tiere zeigten hingegen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen und den Einzel-Knockouts eine verringerte Mikrogliaaktivierung (Abb. 24, Diagramm 2). Die Unterschiede konnten vor allem in der Medulla, dem Thalamus und im Mittelhirn detektiert werden. Die Negativkontrollen, die mit nicht-infektiösem Hirnhomogenat behandelt wurden, zeigten keine Immunreaktivität.

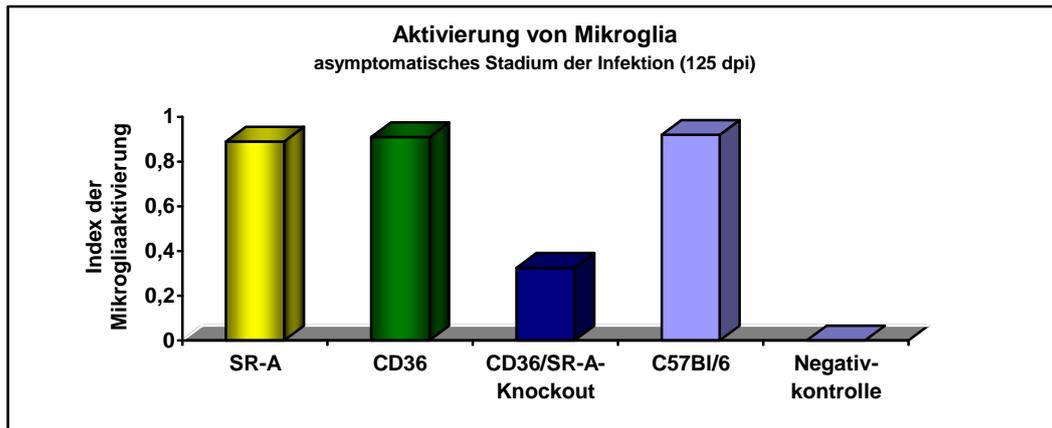


Diagramm 2: Vergleich der Aktivierung von Mikroglia zwischen SR-A-, CD36 sowie CD36/SR-A-Knockout-Mäusen, C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im asymptomatischen Stadium der Infektion 125 dpi. Die Aktivierung der Mikroglia ist in den CD36/SR-A-Knockout-Mäusen schwächer als in den übrigen Tiergruppen zum Zeitpunkt 125 dpi. Die Negativkontrollen zeigten keine Immunreaktivität gegen den Iba-1-Antikörper.

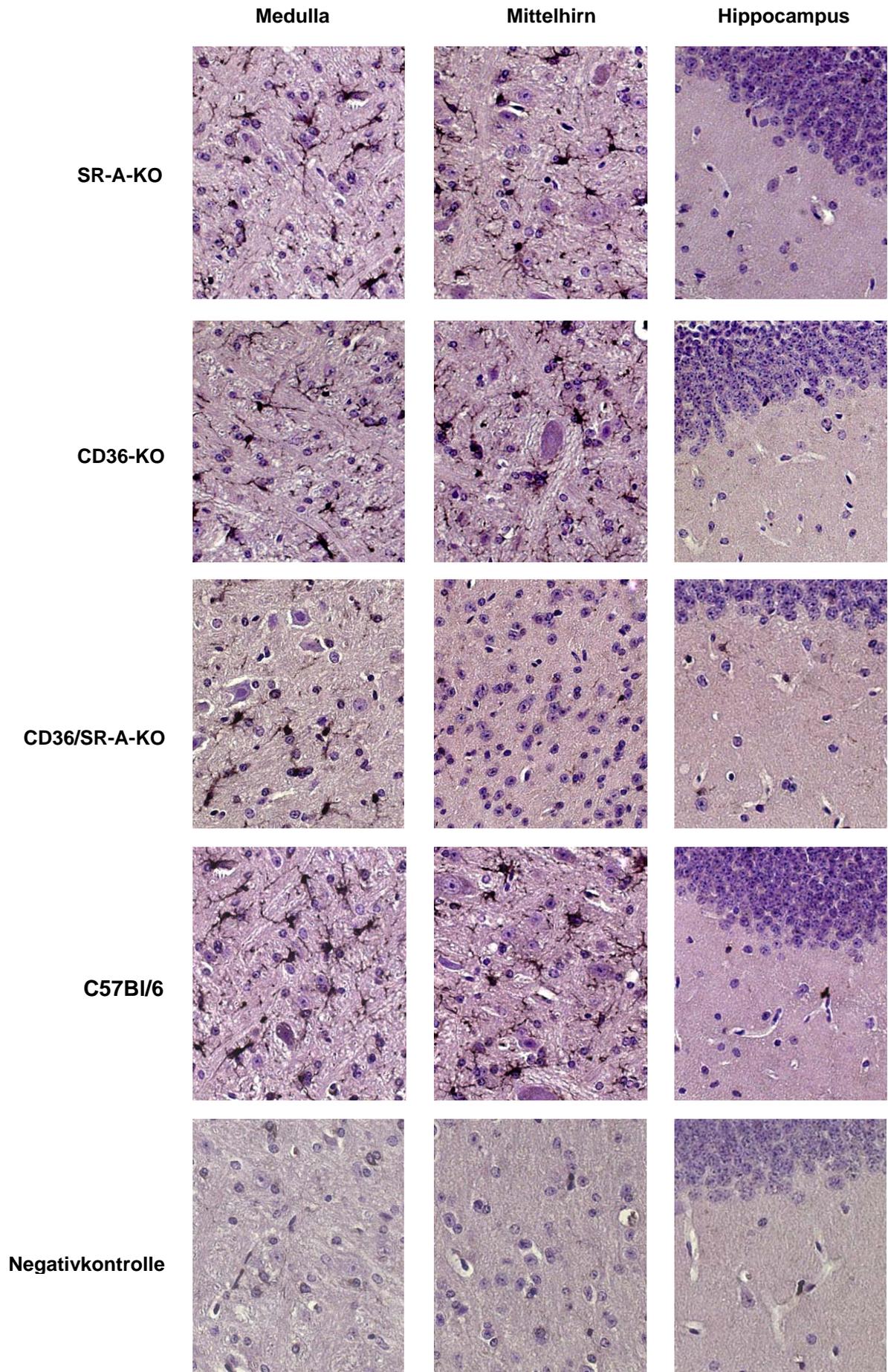


Abbildung 24: Iba-1-Expression in den Knockout-Mäusen im Vergleich zu C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im asymptomatischen Stadium der Infektion. Die Aktivierung von Mikroglia war bei den CD36/SR-A-Knockout-Tieren deutlich geringer im Vergleich zu den übrigen Tiergruppen. Die Unterschiede zeigten sich besonders in der Medulla und dem Mittelhirn. Im Hippocampus zeigten alle Tiergruppen eine ähnliche Expression von Iba-1. Bei den Negativkontrollen konnte keine Mikrogliaaktivierung festgestellt werden. (Vergrößerung 400x)

4.2.2.4.2 Aktivierung von Mikroglia im terminalen Stadium der Infektion

Im Verlauf der Scrapie-Infektion kommt es zu einer Zunahme der Mikrogliaaktivierung. Dies konnte sowohl in den Knockout-Mäusen als auch in den Wildtyp-Kontrollen beobachtet werden.

In den CD36/SR-A-Knockout-Mäusen konnten die anfänglichen Unterschiede in der Iba-1-Expression in einigen Hirnregionen zum asymptomatischen Krankheitszeitpunkt (125dpi) im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen und Einzel-Knockout-Tieren nicht mehr festgestellt werden. Zum terminalen Krankheitszeitpunkt zeigten die CD36/SR-A-Knockout-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen eher eine etwas stärkere Aktivierung von Mikroglia (Abb. 25, Diagramm 3). Dieser Unterschied konnte allerdings nur im Hippocampus und der Medulla nachgewiesen werden.

Die SR-A- und CD36-Knockout-Mäuse zeigten eine ähnlich starke Expression wie die Wildtyp-Kontrollen. Unterschiede zwischen den Tiergruppen konnten zum terminalen Krankheitszeitpunkt also kaum noch festgestellt werden. Die Negativkontrollen Tiere zeigten auch im terminalen Krankheitsstadium keine Anzeichen einer Mikrogliose (Abb. 25, Diagramm 3).

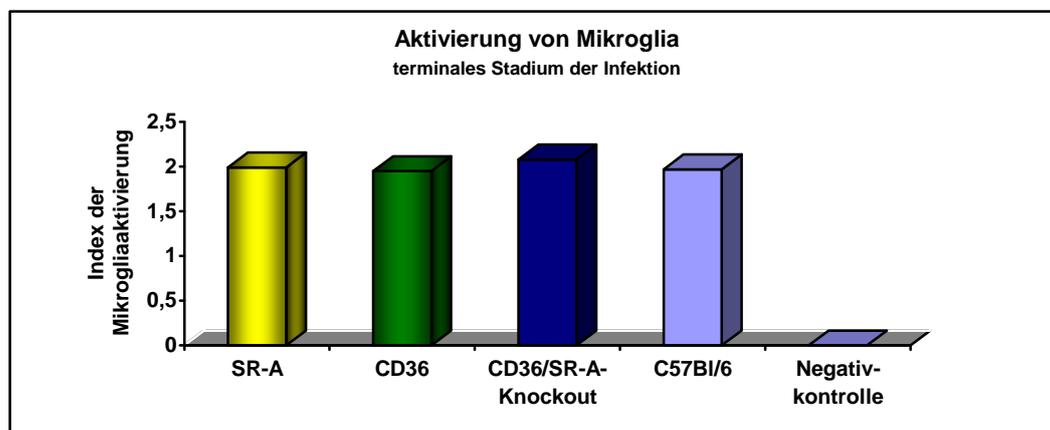


Diagramm 3: Vergleich der Aktivierung von Mikroglia zwischen SR-A-, CD36 sowie CD36/SR-A-Knockout-Mäusen, C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im terminalen Stadium der Infektion. Die Aktivierung der Mikroglia ist in allen untersuchten Tiergruppen etwa gleich stark. Die CD36/SR-A-Knockout-Tiere zeigten sogar eine etwas stärkere Mikrogliaaktivierung als die übrigen Tiere. Die Negativkontrollen zeigten keine Immunreaktivität gegen den Iba-1-Antikörper.

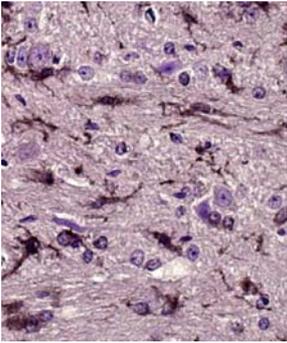
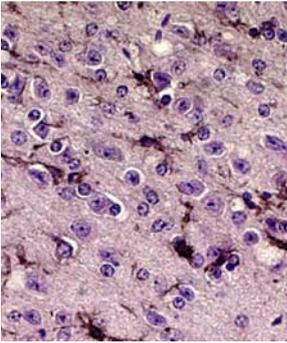
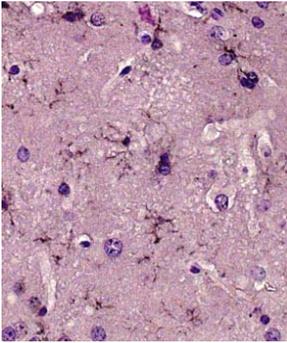
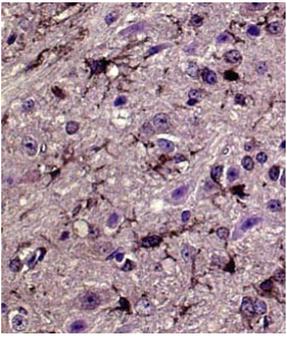
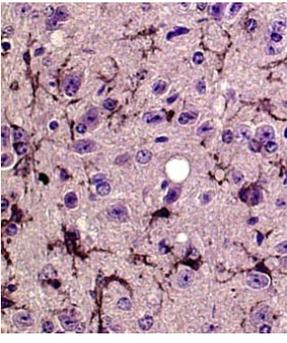
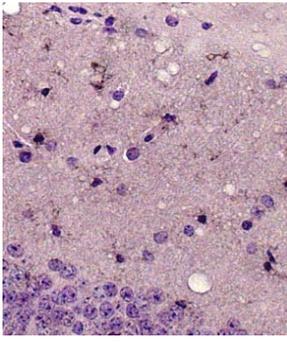
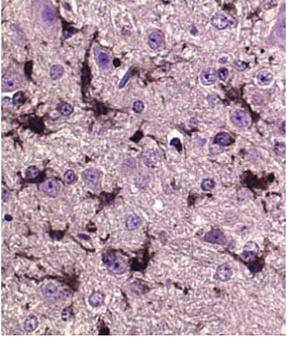
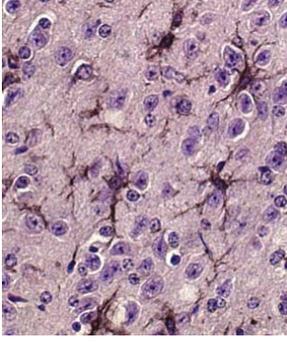
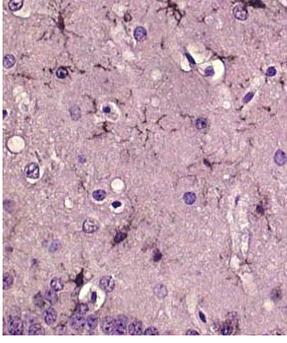
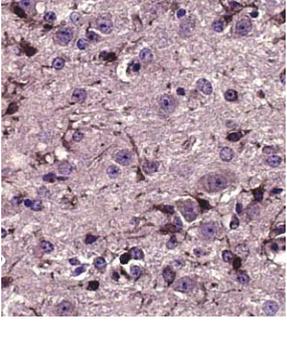
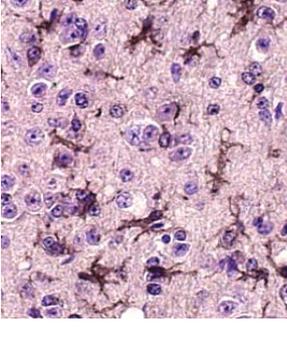
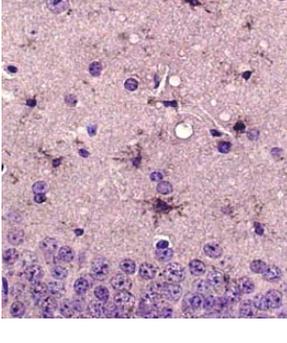
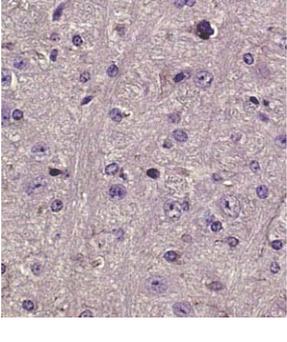
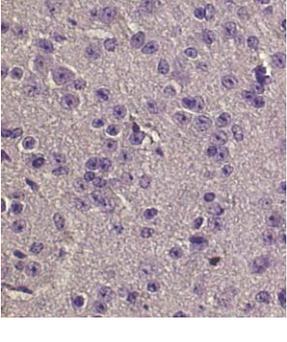
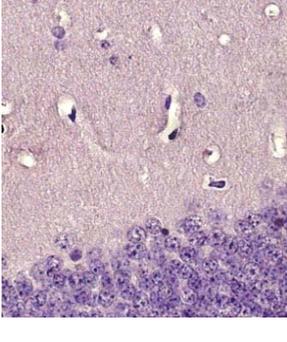
	Medulla	Mittelhirn	Hippocampus
SR-A-KO			
CD36-KO			
CD36/SR-A-KO			
C57Bl/6			
Negativkontrolle			

Abbildung 25: Iba-1-Expression in den Knockout-Mäusen im Vergleich zu C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im terminalen Stadium der Infektion. Die Untersuchung der Iba-1-Expression im terminalen Krankheitsstadium ergab geringe Unterschiede im Hippocampus. Hier zeigten die CD36/SR-A-Knockout-Tiere eine leicht erhöhte Expression gegenüber den Wildtyp-Kontrolltieren und den Einzel-Knockouts. In den übrigen Hirnregionen wie Medulla und Mittelhirn zeigten sich diese Unterschiede nicht. Die Negativkontrollen wiesen keine Mikrogliaaktivierung auf. (Vergrößerung 400x)

4.2.2.5 Astrozytenaktivierung

Während der Scrapie-Infektion werden neben Mikroglia auch Astrozyten aktiviert. Dabei kommt es zu einer Hypertrophie der Zellfortsätze (Wietgreffe et al., 1985; Dietrich et al., 1987) und damit verbunden zu einer Expression spezifischer Proteine, die immunhistochemisch nachgewiesen werden können. Unter anderem exprimieren aktivierte Astrozyten auf der Oberfläche ihrer Zellfortsätze das saure Gliafaserprotein GFAP (*glial fibrillary acidic protein*). Der immunhistochemische Nachweis von aktivierten Astrozyten wurde mithilfe eines anti-GFAP-Antikörpers erbracht (3.3.7.1). Die histologischen Auswertungen erfolgten wie unter 3.3.9 angegeben.

4.2.2.5.1 Aktivierung von Astrozyten im asymptomatischen Stadium der Infektion (125 dpi; i.c.-Infektion)

Die immunhistologischen Untersuchungen von Scrapie-infizierten C57Bl/6-Mäusen in der Vergangenheit zeigten bei 125 dpi eine massive Aktivierung von Astrozyten, die vor allem im Hirnstamm, Hippocampus und Kleinhirn zu beobachten war. Aber auch im Mittelhirn, Cortex und Thalamus konnte eine Astrozytose detektiert werden.

In den SR-A-, CD36-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen konnte zum Krankheitszeitpunkt 125 dpi eine gleich starke Astrozytenaktivierung detektiert werden (Abb. 26, Diagramm 4). Es konnten in allen untersuchten Hirnregionen GFAP-positive Zellen beobachtet werden. Die Negativkontrollen zeigten keinerlei Astrogliose.

Die Analyse der CD36/SR-A-Knockout-Tiere im Vergleich zu den C57Bl/6-Kontrolltieren und Einzel-Knockout-Tieren zeigte hingegen eine deutlich verringerte Aktivierung von Astrozyten (Abb. 26, Diagramm 4). Im frühen Stadium der Infektion (125 dpi) konnten vor allem im Cortex, Thalamus, Mittelhirn und der Medulla oblongata der CD36/SR-A-Knockout-Tiere deutlich weniger aktivierte Astrozyten nachgewiesen werden.

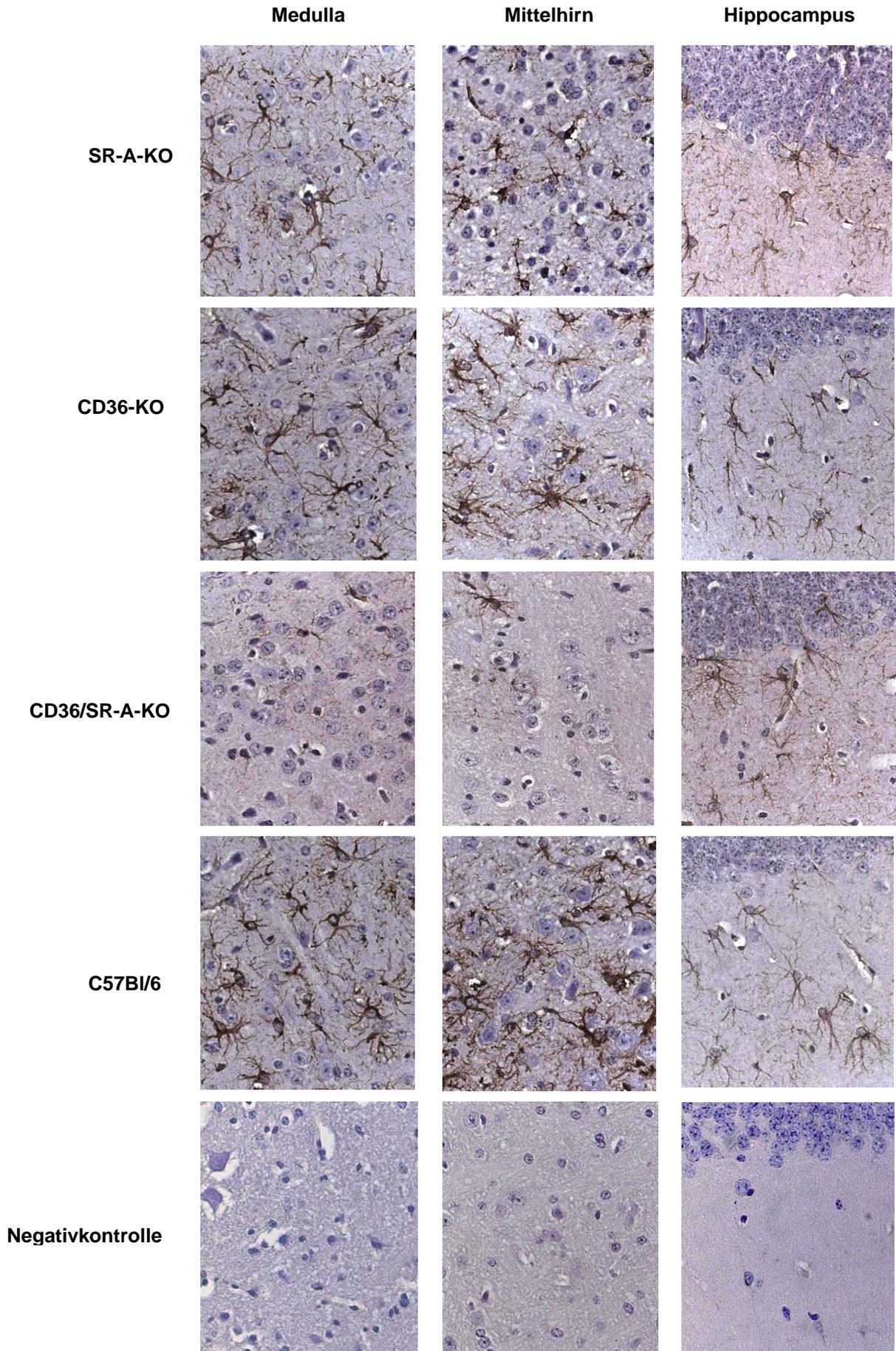


Abbildung 26: Expression von GFAP in den Knockout-Tieren im Vergleich zu C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen zum asymptomatischen Krankheitszeitpunkt 125 dpi. Die Aktivierung von Astrozyten war bei den CD36/SR-A-Knockout-Tieren deutlich geringer als bei den übrigen Tiergruppen zum Zeitpunkt 125 dpi. Dies konnte vor allem in der Medulla, Mittelhirn, Cortex und Thalamus beobachtet werden. Im Hippocampus konnte hingegen bei allen Tiergruppen eine ähnliche Expression festgestellt werden. Die Negativkontrollen zeigten keinerlei Astrozytose. (Vergrößerung 400x)

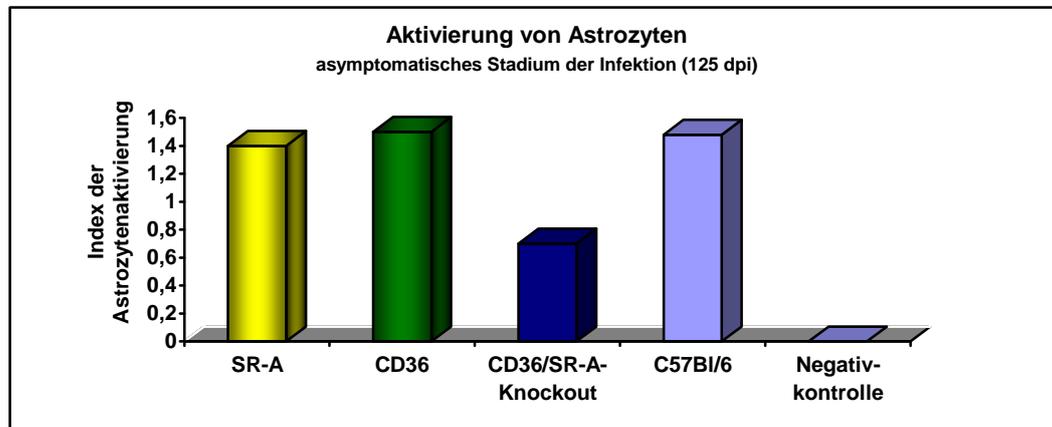


Diagramm 4: Vergleich der Aktivierung von Astrozyten zwischen SR-A-, CD36 sowie CD36/SR-A-Knockout-Mäusen, C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im asymptomatischen Stadium 125 dpi. Es konnte eindeutig eine schwächere Astroglieose in den CD36/SR-A-Knockout-Mäusen im Vergleich zu den anderen Tiergruppen zum asymptomatischen Krankheitszeitpunkt 125 dpi festgestellt werden. Die Negativkontrollen zeigten keinerlei Astrozytenaktivierung.

4.2.2.5.2 Aktivierung von Astrozyten im terminalen Stadium der Infektion

Neben der Mikrogliaaktivierung nimmt auch die Aktivierung von Astrozyten im Krankheitsverlauf zu (Lefrancois et al., 1994). Die Untersuchung der SR-A- und CD36-Knockout-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zum terminalen Krankheitszeitpunkt ergab keine eindeutigen Unterschiede im Grad der Astrozytenaktivierung (Abb. 27, Diagramm 5). Die stark fortgeschrittene Astroglieose konnte in allen untersuchten Hirnregionen detektiert werden.

Die Untersuchung der infizierten CD36/SR-A-Knockouttiere zum terminalen Krankheitszeitpunkt ergab hingegen leichte Unterschiede im Grad der Astrozytenaktivierung. Vor allem in den Hirnregionen Mittelhirn, Medulla und Hippocampus zeigten die CD36/SR-A-Knockout-Tiere eine leicht erhöhte Astrozytose im Vergleich zu den Wildtypkontrollen und den Einzel-Knockout-Tieren (Abb. 27, Diagramm 5). Dieser Unterschied konnte in anderen Regionen, wie z.B. dem Thalamus nicht beobachtet werden.

Bei den Negativkontrollen war ebenfalls eine beginnende Astrozytenaktivierung im Hippocampus und Kleinhirn zu erkennen (Abb. 27, Diagramm 5), die typisch für das fortgeschrittene Alter der Tiere ist (Westaway et al., 1994).

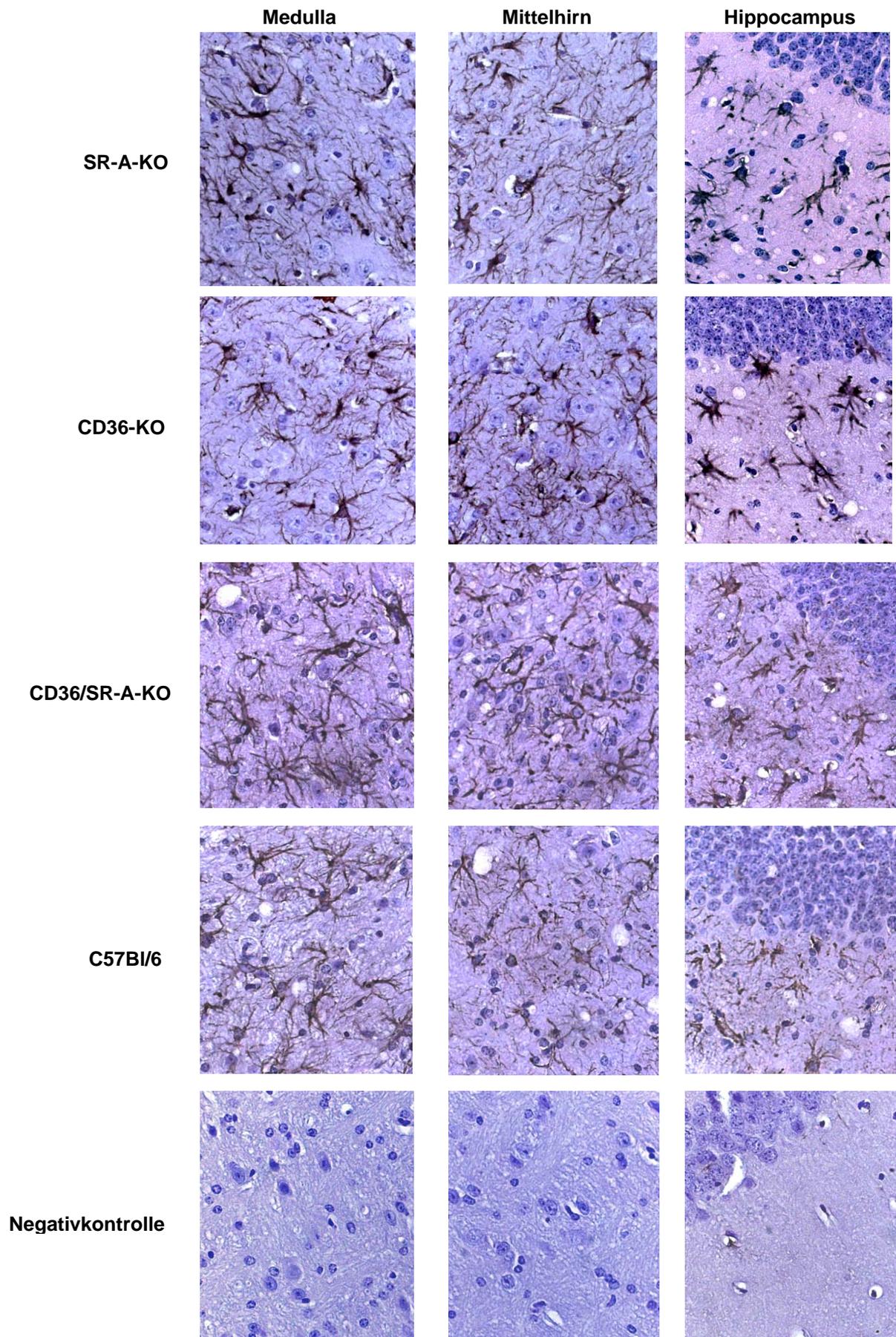


Abbildung 27: Expression von GFAP in den Knockout-Tieren im Vergleich zu C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen zum terminalen Krankheitszeitpunkt. Die Analyse der GFAP-Expression im terminalen Krankheitsstadium ergab eine leicht erhöhte Expression in den CD36/SR-A-Knockout-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen und Einzel-Knockouts. Dies konnte vor allem im Mittelhirn, Medulla und Hippocampus beobachtet werden. In den übrigen Hirnregionen wie z.B. im Thalamus war dieser Unterschied weniger zu erkennen. Die Negativkontrollen zeigten im Hippocampus und Kleinhirn eine beginnende Astrozytose, die typisch für das fortgeschrittene Alter der Tiere ist. (Vergrößerung 400x)

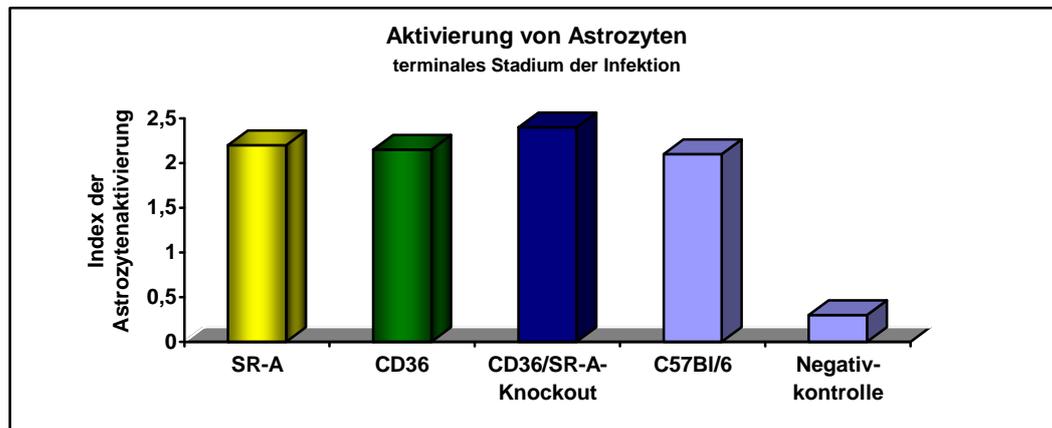


Diagramm 5: Vergleich der Aktivierung von Astrozyten zwischen SR-A-, CD36 sowie CD36/SR-A-Knockout-Mäusen, C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im terminalen Stadium der Infektion. Es konnte eine etwas stärkere Astrogliose in den CD36/SR-A-Knockout-Tieren im Vergleich zu den übrigen Tiergruppen zum terminalen Krankheitszeitpunkt festgestellt werden. Die Negativkontrollen zeigten eine leichte Astrozytenaktivierung, die allerdings auf das Alter der Tiere zurückzuführen ist.

4.2.2.6 Spongiforme Veränderungen/Vakuolisierung

Im Verlauf der Scrapie-Pathogenese kommt es neben der Gliose und PrP^{Sc}-Ablagerungen zu spongiformen Veränderungen im Hirngewebe (Jeffrey et al., 1992). Diese Vakuolisierung lässt sich durch eine Hämalaun-Eosin-Übersichtsfärbung nachweisen (3.3.6).

4.2.2.6.1 Vakuolisierung im asymptomatischen Stadium der Infektion(125 dpi; i.c.-Infektion)

Zum frühen Krankheitszeitpunkt der Scrapie-Infektion konnten bei allen Tiergruppen schwache spongiforme Veränderungen beobachtet werden (Abb. 28, Diagramm 6). Diese traten vor allem im Kleinhirn und Thalamus auf. Im Hippocampus, Mittelhirn und der Medulla konnte noch keinerlei Vakuolisierung beobachtet werden. Die Stärke der Vakuolisierung war bei den Knockout-Tieren und den C57Bl/6-Kontrolltieren 125 Tage nach der Infektion vergleichbar (Abb. 28, Diagramm 6). Bei den Negativkontrollen waren keine spongiformen Veränderungen des Gewebes zu beobachten.

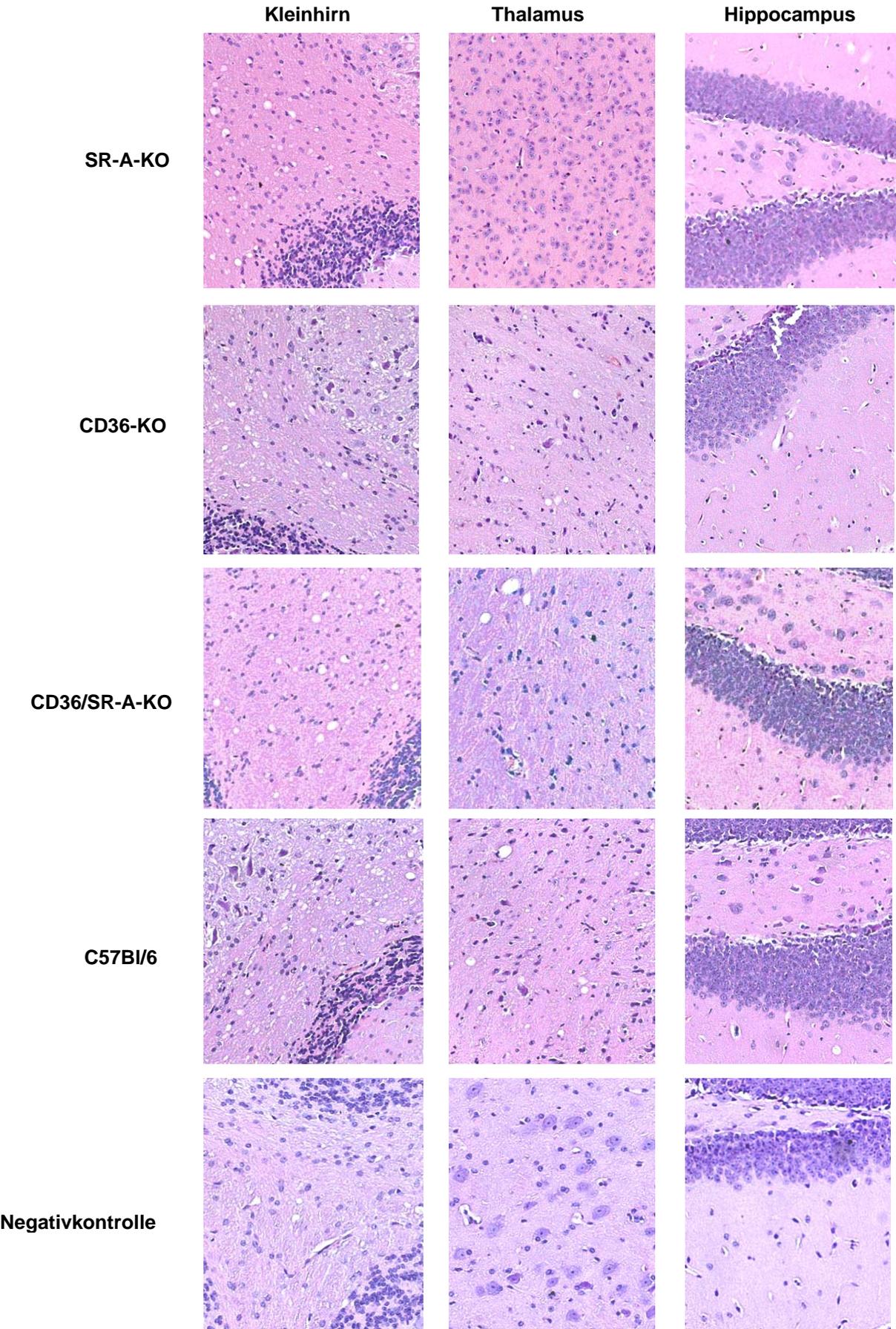


Abbildung 28: Vakuolisierung des Gewebes der Knockout-Mäuse im Vergleich zu C57Bl/6-Kontrolltieren zum asymptomatischen Krankheitszeitpunkt 125 dpi. Die Auswertung der Vakuolisierung des Hirngewebes zum Zeitpunkt 125 dpi ergab keine Unterschiede zwischen den Knockout-Tieren und den Wildtyp-Kontrollen. Bei den Negativkontrollen konnten keine spongiformen Veränderungen festgestellt werden. (Vergrößerung 200x)

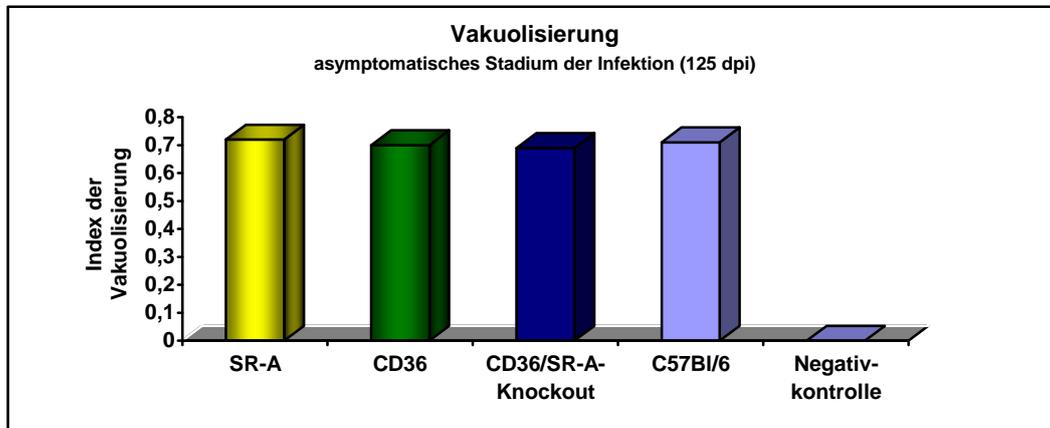


Diagramm 6: Vergleich der spongiformen Veränderungen zwischen SR-A-, CD36 sowie CD36/SR-A-Knockout-Mäusen, C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im asymptomatischen Stadium der Infektion. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen zum asymptomatischen Krankheitszeitpunkt festgestellt werden. Die Negativkontrollen zeigten keine Vakuolisierung des Gewebes.

4.2.2.6.2 Vakuolisierung im terminalen Stadium der Infektion

Im terminalen Krankheitsstadium konnten starke spongiforme Veränderungen in allen Scrapie-infizierten Tiergruppen beobachtet werden (Abb. 29, Diagramm 7). Sie waren über das gesamte Gehirn verteilt und betrafen somit alle untersuchten Hirnregionen. Bei den SR-A-, CD36- und den CD36/SR-A-Knockout-Mäusen konnte kein Unterschied in der Stärke der Vakuolisierung im Vergleich zu den Wildtypkontrollen festgestellt werden. Bei den Negativkontrollen waren nach wie vor keine spongiformen Veränderungen des Gewebes ersichtlich (Abb. 29, Diagramm 7).

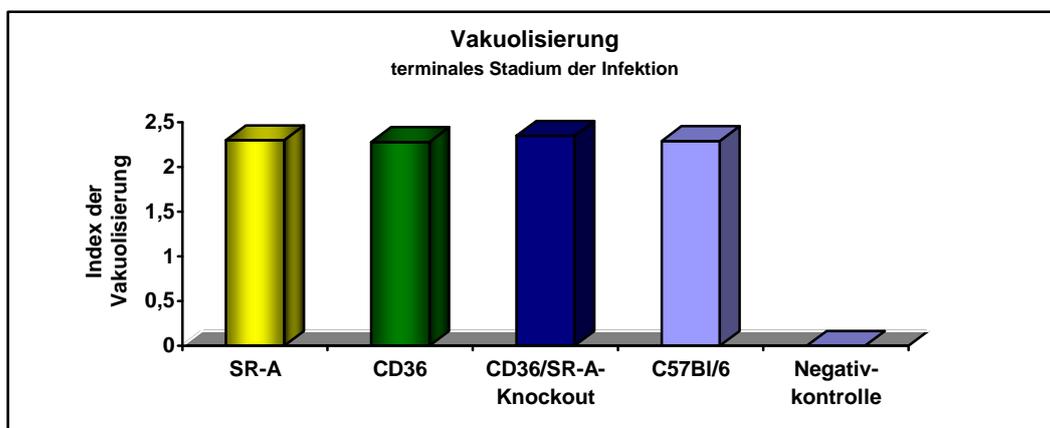


Diagramm 7: Vergleich der spongiformen Veränderungen zwischen SR-A-, CD36- sowie CD36/SR-A-Knockout-Mäusen, C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im terminalen Stadium der Infektion. Zum terminalen Krankheitszeitpunkt konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen festgestellt werden. Die Negativkontrollen zeigten auch hier keine Vakuolisierung des Gewebes.

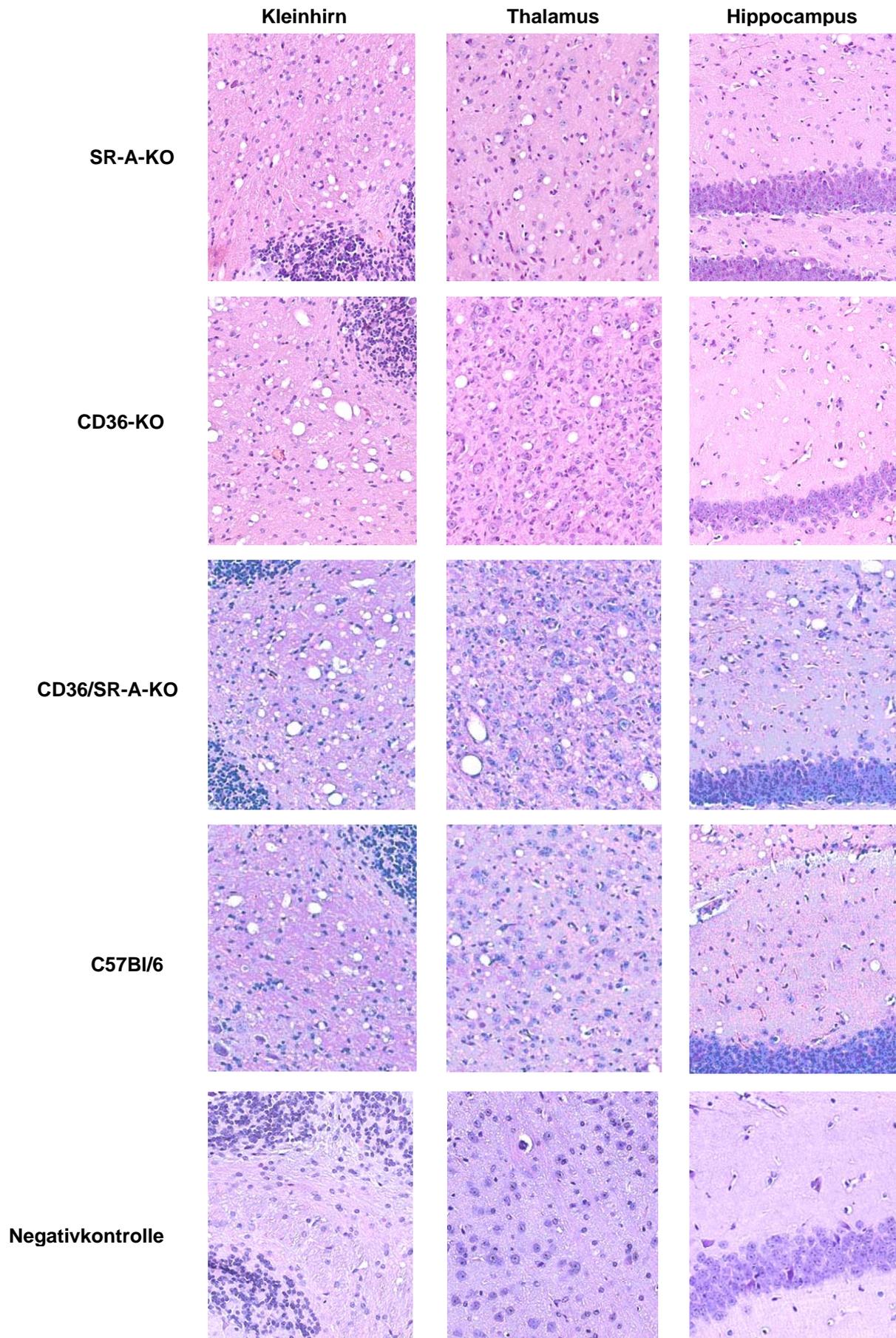


Abbildung 29: Vakuolisierung des Gewebes der Knockout-Mäuse im Vergleich zu C57Bl/6-Kontrolltieren zum terminalen Krankheitszeitpunkt. Im terminalen Stadium der Infektion konnten zwischen den SRA-, CD36- und CD36/SRA-Knockout-Tieren sowie den Wildtypen keinerlei Unterschiede festgestellt werden. Sie zeigten in den Hirnregionen Kleinhirn, Thalamus und im Hippocampus eine fortgeschrittene Vakuolisierung. In den Negativkontrollen konnten keine spongiformen Veränderungen beobachtet werden. (Vergrößerung 200x)

4.2.3 Expressionsanalyse ausgewählter Gene und Proteine in den CD36/SR-A-Knockout-Tieren

4.2.3.1 Expressionsanalyse ausgewählter Gene mittels real-time QPCR

Im Verlauf der Scrapie-Infektion des ZNS kommt es zu einer veränderten Expression zahlreicher Gene, die teilweise stark überexprimiert werden (Xiang et al., 2004; Riemer et al., 2004; Kopacek et al., 2000; Riemer et al., 2000). Zu diesen Genen gehören unter anderem GFAP, Lysozym M und OAS (2'-5'-Oligo-A-Synthetase).

Es sollte mithilfe der real-time QPCR untersucht werden, ob und wie sich die Expressionslevel ausgewählter Gene in den CD36/SR-A-Knockout-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren im Verlauf der Scrapie-Infektion verändern. Die CD36/SR-A-Knockout-Tiere zeigten ja bereits in den immunhistochemischen Untersuchungen deutliche Unterschiede gegenüber den Wildtyp-Mäusen im asymptomatischen Krankheitsstadium. Dies sollte nun mithilfe der real-time QPCR noch weiter untersucht werden. Hierfür wurde Total-RNA aus Gehirnen von je zwei repräsentativen Tieren untersucht. Von jeder Probe erfolgte eine 4-fach Bestimmung und zu jedem Versuch wurde eine Leerwertkontrolle sowie eine Negativ-Kontrolle der jeweiligen cDNA mitgeführt, um Kontaminationen auszuschließen. Als interner Standard diente das „housekeeping“-Gen GAPDH. In den Diagrammen werden die jeweiligen relativen Veränderungen der Expressionslevel zum Zeitpunkt 125 dpi und zum terminalen Krankheitszeitpunkt anhand von je zwei repräsentativen Einzelwerten pro Zeitpunkt gezeigt. Die Vergleichslevel der Wildtyp-Mäuse sind in diesen Diagrammen nicht gesondert dargestellt, sondern sind dem Wert 1 gleichgesetzt.

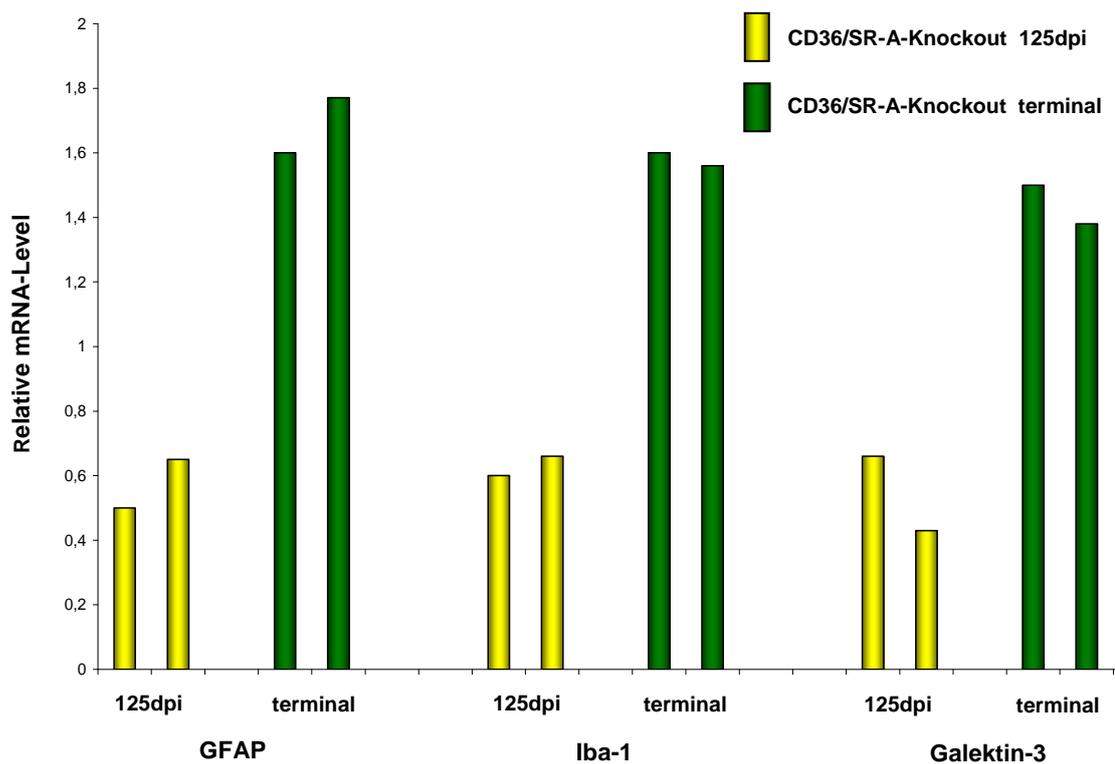


Diagramm 8: Expressionsanalyse der Gene GFAP, Iba-1 und Galektin-3 in den CD36/SR-A-Knockout-Tieren im Vergleich zum Wildtyp. Gezeigt sind die relativen RNA-Mengen der Knockout-Tiere im Vergleich zum Wildtyp. Die Expressionslevel der Wildtyp-Kontrollen sind dem Wert 1 gleich gesetzt. Alle drei Gene zeigten zum Zeitpunkt 125 dpi eine etwas geringere Expression in den CD36/SR-A-Knockout-Mäusen im Vergleich zu den C57Bl/6-Kontrolltiere. Zum terminalen Zeitpunkt war sie dagegen etwas erhöht.

Zunächst wurde die Expression der Gene GFAP, Iba-1 und Galektin-3 untersucht, die den Aktivierungsstatus der Astro- respektive Mikroglia widerspiegelt (Diagramm 8). Die Bestimmung der Expressionslevel für den Astrozytenaktivierungsmarker GFAP zeigte 125 Tage nach der Infektion eine 1,75-fach höhere Expression in den Wildtypkontrollen im Vergleich zu den Knockout-Tieren. Die Untersuchung zur Expression von Iba-1 ergab zum Zeitpunkt 125 dpi ebenfalls eine schwächere Expression in den CD36/SR-A-Knockout-Tieren. Dies gilt auch für Galektin-3. Zum terminalen Zeitpunkt waren die Expressionslevel aller drei Gene in den CD36/SR-A-Knockout-Tieren gegenüber den Wildtypen hingegen um das ca. 1,6-fache erhöht, was das Ergebnis der immunhistologischen Untersuchung bestätigt.

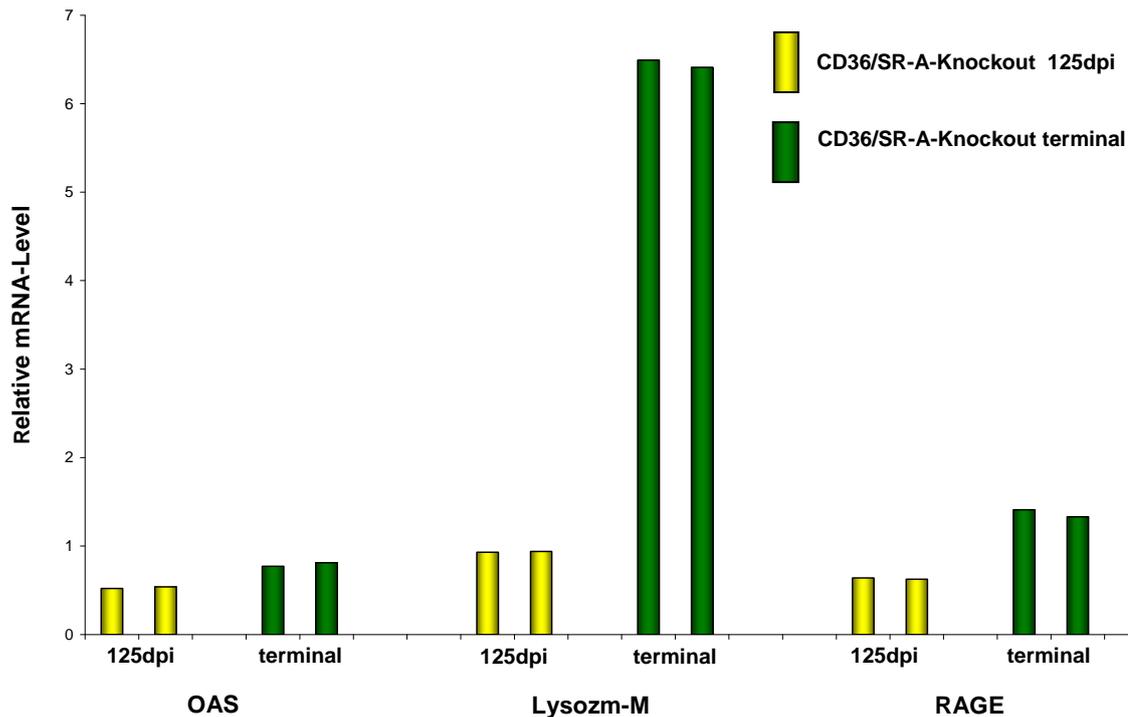


Diagramm 9: Quantitative Analyse der OAS-, Lysozym-M- und RAGE-Expression in den CD36/SR-A-Knockout-Mäusen.

Die Expressionsanalysen von OAS, Lysozym M und RAGE zum Zeitpunkt 125 dpi ergaben eine höhere Expression in den Wildtyp-Kontrolltieren im Vergleich zu den CD36/SR-A-Knockout-Tieren. Zum terminalen Zeitpunkt zeigte vor allem die quantitative Analyse der Lysozym-M-Expression eine verstärkte Expression in den Knockout-Tieren im Vergleich zu den C57Bl/6-Kontrollen.

Anschließend folgte die Quantifizierung der Expression für die Gene OAS, Lysozym M und RAGE (Receptor of Advanced Glycation End Product) (Diagramm 9). Die Expressionsanalyse für den Apoptosemarker OAS ergab zum Zeitpunkt 125 dpi eine 1,95-fach und zum terminalen Zeitpunkt nur eine 1,1-fach erhöhte Expression in den C57Bl/6-Kontrolltieren im Vergleich zu den Knockout-Tieren. Für Lysozym-M, das von aktivierten Mikroglia exprimiert wird, konnten für den Zeitpunkt 125 dpi keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen festgestellt werden. Allerdings ergab sich für den terminalen Krankheitszeitpunkt eine 6,45-fach erhöhte Expression in den Knockout-Tieren im Vergleich zu den Wildtypkontrollen. Die Quantifizierung der Expression für RAGE zeigte eine 1,6-fach höhere Expression in den Kontrolltieren im Vergleich zu den Knockout-Tieren. Im terminalen Krankheitsstadium hingegen konnte eine um das 1,4-fach verstärkte Expression in den CD36/SR-A-Knockout-Tieren gegenüber den Wildtypen beobachtet werden.

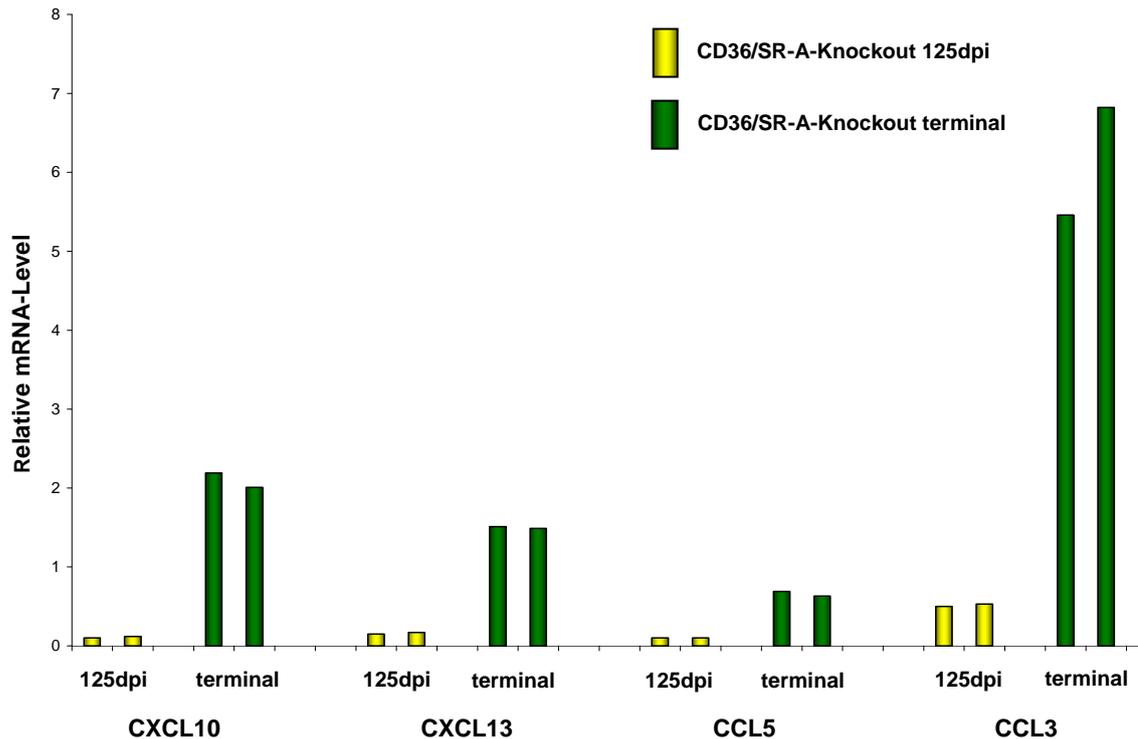


Diagramm 10: Quantitative Analyse der CXCL10-, CXCL13-, CCL5 und CCL3-Expression in den CD36/SR-A-Knockout-Tieren. Die Expressionsanalyse von CXCL10, CXCL13 und CCL5 ergab eine stark erhöhte Expression in den Wildtyp-Kontrolltieren im Vergleich zu den CD36/SR-A-Knockout-Tieren im asymptomatischen Stadium. Zum terminalen Zeitpunkt war hingegen die Expression von CXCL10 und CXCL13 in den Knockout-Tieren im Vergleich zu den Wildtypen erhöht. Auch für CCL3 konnte ein stark erhöhtes Expressionslevel in den Knockout-Tieren zum terminalen Zeitpunkt beobachtet werden.

Schließlich folgte die Expressionsanalyse für die Chemokine CXCL10 (IP-10), CXCL13 (BLC) und CCL5 (RANTES), sowie für CCL3 (MIP-1 α ; Macrophage Inflammatory Protein) (Diagramm 10). Für CXCL10, CXCL13 und CCL5 ergab sich jeweils eine stark erhöhte Expression in den Wildtypen gegenüber den Knockout-Tieren zum Zeitpunkt 125 dpi. Bei CXCL10 lag die Expression in den Wildtypkontrollen um das 9,5-fache höher im Vergleich zu den Knockout-Tieren. Für CXCL13 ergab sich eine 6,4-fach höhere Expression. Zudem zeigte diese Expressionsanalyse, dass CXCL13 und CXCL10 im Scrapie-infizierten Gehirn stark überexprimiert werden. Die Expressionsanalyse für CCL5 ergab eine etwa 10-fach stärkere Expression in den Wildtyp-Tieren im asymptomatischen Stadium der Infektion. Im terminalen Stadium der Infektion konnte hingegen für CXCL10, CXCL13 eine etwa 2,1- bzw. 1,5-fach erhöhte Expression in den Knockout-Tieren gegenüber den Kontrolltieren beobachtet werden. Bei CCL5 zeigte sich zu diesem Zeitpunkt allerdings eine 1,5-fach schwächere Expression in den Knockout-Tieren gegenüber den Kontrolltieren. Die Quantifizierung der Expression von CCL3 zeigte nur eine 1,9-fach erhöhte Expression in den Wildtypen im Vergleich zu den Knockout-Tieren zum Zeitpunkt 125 dpi. Zum terminalen Zeitpunkt konnte jedoch eine verstärkte Expression in den CD36/SR-A-Knockout-Tieren gegenüber den Kontrolltieren festgestellt werden. Sie lag etwa um das 6,1-fache über dem Expressionslevel der Wildtypen.

4.3 Expressionsanalyse von CXCL13 im ZNS

Schon im Vorfeld dieser Expressionsanalysen wurde durch Northern-Blot-Analysen festgestellt, dass CXCL13 während der Scrapie-Infektion im ZNS überexprimiert wird (Riemer et al., 2000), wodurch dieses Chemokin in den Fokus des Interesses gelangte. Real-time QPCR-Analysen bestätigten diese Ergebnisse (Diagramm 10 und 12). Es ergab sich eine stark erhöhte Expression von CXCL13 für die Scrapie-infizierten Gehirne. Sie war ca. 46-fach stärker als in den nicht-infizierten Gehirnen.

Im ZNS wurde die Expression und Funktion von CXCL13 bislang nicht beschrieben. Hingegen ist die Funktion von CXCL13 im lymphatischen System eingehend charakterisiert. Es wird hier stark exprimiert und kann beispielsweise in der Milz in hohen Mengen nachgewiesen werden. Seine Funktion umfasst die Rekrutierung von B-Lymphozyten in der Peripherie. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzlich verschiedene immunhistologische Untersuchungen zur Expression von CXCL13 im ZNS durchgeführt.

4.3.1 Immunhistologische Untersuchung der Expression von CXCL13 im nicht-infizierten Gehirn

Es wurde die normale Expression von CXCL13 im uninfizierten Gehirn dargestellt, wobei sich zeigte, dass eine geringe basale Expression von CXCL13 im uninfizierten Gehirn stattfindet. Diese war minimal im Bereich des Hippocampus, des Kleinhirns und etwas stärker im Corpus Callosum zu beobachten (Abb. 30, A). In den übrigen Hirnregionen konnte keinerlei CXCL13-Expression detektiert werden (Abb. 30, B).

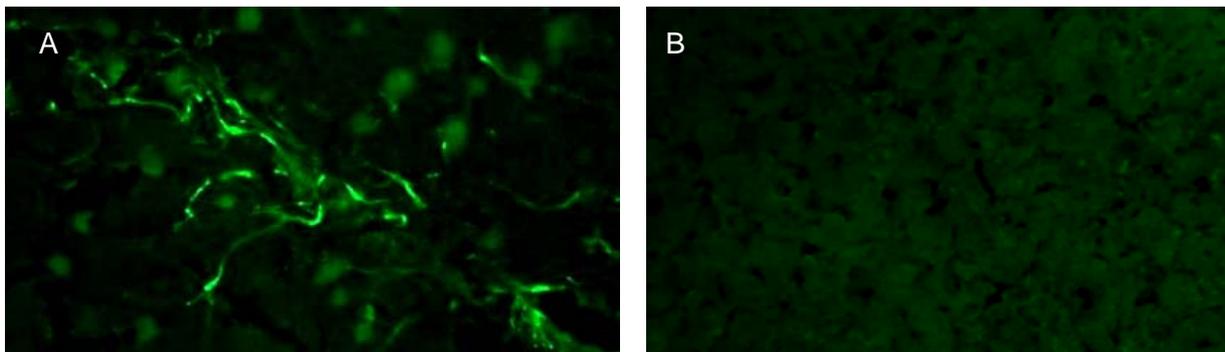


Abbildung 30: Expression von CXCL13 in nicht-infiziertem Hirngewebe. Im nicht-infizierten Gehirn konnte eine leichte Basalexpression von CXCL13 im Corpus Callosum (A), Hippocampus und Kleinhirn beobachtet werden. In den übrigen Hirnregionen, wie im Thalamus (B), war dies nicht der Fall. (Vergrößerung 400x)

4.3.2 Immunhistologische Untersuchung der Expression von CXCL13 im Verlauf der Scrapie-Pathogenese

Anschließend wurde die CXCL13-Expression im Verlauf der Scrapie-Pathogenese im ZNS immunhistologisch untersucht. Es wurden Gewebeproben, die zu den Zeitpunkten 75 und 125 dpi, sowie dem terminalen Krankheitszeitpunkt entnommen wurden, angefärbt. Parallel wurden auch Negativkontrollen der gleichen Zeitpunkte untersucht, die mit uninfektiösem Hirnhomogenat behandelt wurden. Es wurde eine zunehmende CXCL13-Expression im Verlauf der Erkrankung beobachtet. Zum Zeitpunkt 75 dpi konnte im Scrapie-infizierten Gehirn nur die basale Expression in Kleinhirn, Hippocampus und Corpus Callosum detektiert werden. In den übrigen Hirnregionen konnte CXCL13 nicht nachgewiesen werden (Abb. 31, B und F). Die Negativkontrolle zeigte eine entsprechende Expression (Abb. 31, A und E). Zum Zeitpunkt 125 dpi war hingegen eine Zunahme der Expression von CXCL13 im Scrapie-infizierten Gehirn zu erkennen. Das Protein konnte jetzt auch in den übrigen Hirnregionen wie Thalamus (Abb. 31, G), Cortex (Abb. 31, C), Striatum, Mittelhirn und Medulla nachgewiesen werden. Schließlich konnte zum terminalen Krankheitszeitpunkt eine extrem erhöhte CXCL13-Expression in allen Hirnregionen festgestellt werden (Abb. 31, D und H).

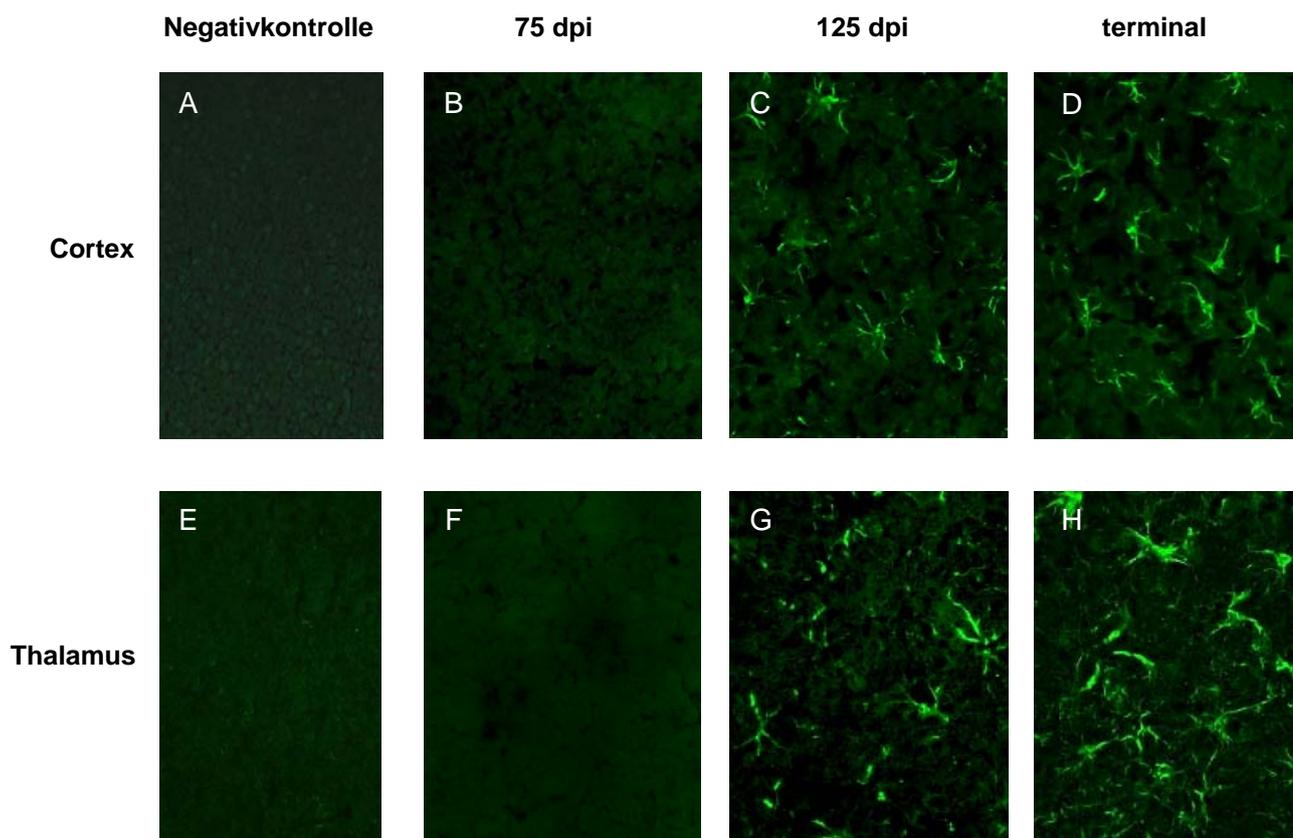


Abbildung 31: Untersuchung der CXCL13-Expression in Scrapie-infiziertem Hirngewebe anhand einer Zeitreihe. Im Verlauf der Scrapie-Pathogenese konnte eine Zunahme der CXCL13-Expression in allen Hirnregionen, hier im Thalamus (A-D) und Cortex (E-H), beobachtet werden. Zu allen untersuchten Zeitpunkten zeigten die Negativkontrollen lediglich die basale Expression von CXCL13 (A und E). (Vergrößerung 400x)

4.3.3 Immunhistologische Charakterisierung des Zelltyps

Bislang war nicht genau bekannt, welche Zellen CXCL13 im ZNS exprimieren. Um dies zu untersuchen, wurde eine Doppelfärbung mit anti-GFAP und anti-CXCL13 Antikörpern durchgeführt (3.3.8.2). Das Übereinanderlegen der beiden Färbungen ergab eine 100 %ige Übereinstimmung. CXCL13 wird im ZNS von aktivierten Astrozyten exprimiert (Abb. 32, B).



Abbildung 32: CXCL13-Expression im ZNS. Um den Zelltyp zu identifizieren, der CXCL13 im ZNS exprimiert, wurde eine Doppelfärbung mit anti-CXCL13 (A) und anti-GFAP (C) durchgeführt. Die übereinandergelegten Aufnahmen (B) zeigen eine 100 %ige Übereinstimmung. CXCL13 wird von aktivierten Astrozyten im ZNS exprimiert. (Vergrößerung 400x)

4.3.4 Immunhistologische Untersuchung der CXCL13-Expression während neurodegenerativer Erkrankungen

Zusätzlich wurde untersucht, ob CXCL13 auch im Verlauf anderer neurodegenerativer Erkrankungen eine erhöhte Expression aufweist. Hierfür wurde zum einen Hirngewebe verwendet, das von Mäusen stammte, die mit einem BSE-Erreger infiziert waren, der auf Mäuse adaptiert wurde. Die Proben stammten aus dem terminalen Krankheitsstadium. Die immunhistologische Färbung mit anti-CXCL13 konnte auch hier eine verstärkte Expression von CXCL13 in allen Hirnregionen, wie hier im Cortex dargestellt, nachweisen (Abb. 33, A). Die Negativkontrolle zeigte bis auf eine basale Expression im Corpus Callosum keinerlei CXCL13-Expression (Abb. 33, B)

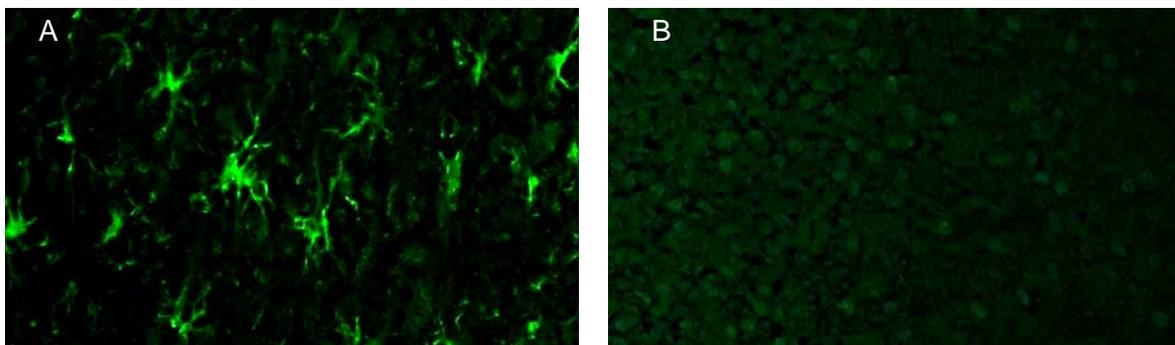


Abbildung 33: Expression von CXCL13 im murinen BSE-Modell. Auch für Hirnmaterial, das mit dem BSE-Erreger infiziert wurde, konnte eine verstärkte CXCL13-Expression in allen Hirnregionen zum terminalen Krankheitszeitpunkt festgestellt werden (A). Die Negativkontrolle zeigte nur eine leichte basale Expression im Corpus Callosum. Ansonsten konnte kein Signal detektiert werden (B). (Vergrößerung 400x)

Zum anderen wurde Hirnmaterial von APP23-Mäusen verwendet. Diese sind für das humane Amyloid-Vorläuferprotein (APP23) transgen und stellen ein murines Modell für die Alzheimer-Erkrankung dar. Die APP23-transgenen Tiere wurden im Alter von 18 Monaten untersucht. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich bereits eine Ausbildung von amyloiden Plaques (Abb. 34, A). Gleichzeitig konnte auch eine verstärkte Expression von CXCL13 im Cortex und Hippocampus beobachtet werden (Abb. 34, B). Es zeigte sich, dass die Regionen der CXCL13-Expression mit den Regionen korrelierten, in denen amyloide Plaques zu finden waren (Abb. 34, C). Dies konnte mit einer Doppelmarkierung bestätigt werden. Für diese Doppelfärbung wurde der anti-CXCL13 Antikörper sowie der fluoreszierende Farbstoff Thioflavin-S verwendet, der geeignet ist, um Amyloid-Plaques zu visualisieren (3.3.5). Es konnte mit diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass CXCL13 auch im Fall anderer neurodegenerativer Erkrankungen, wie hier im murinen BSE- und Alzheimer-Modell gezeigt, im ZNS stark überexprimiert wird.

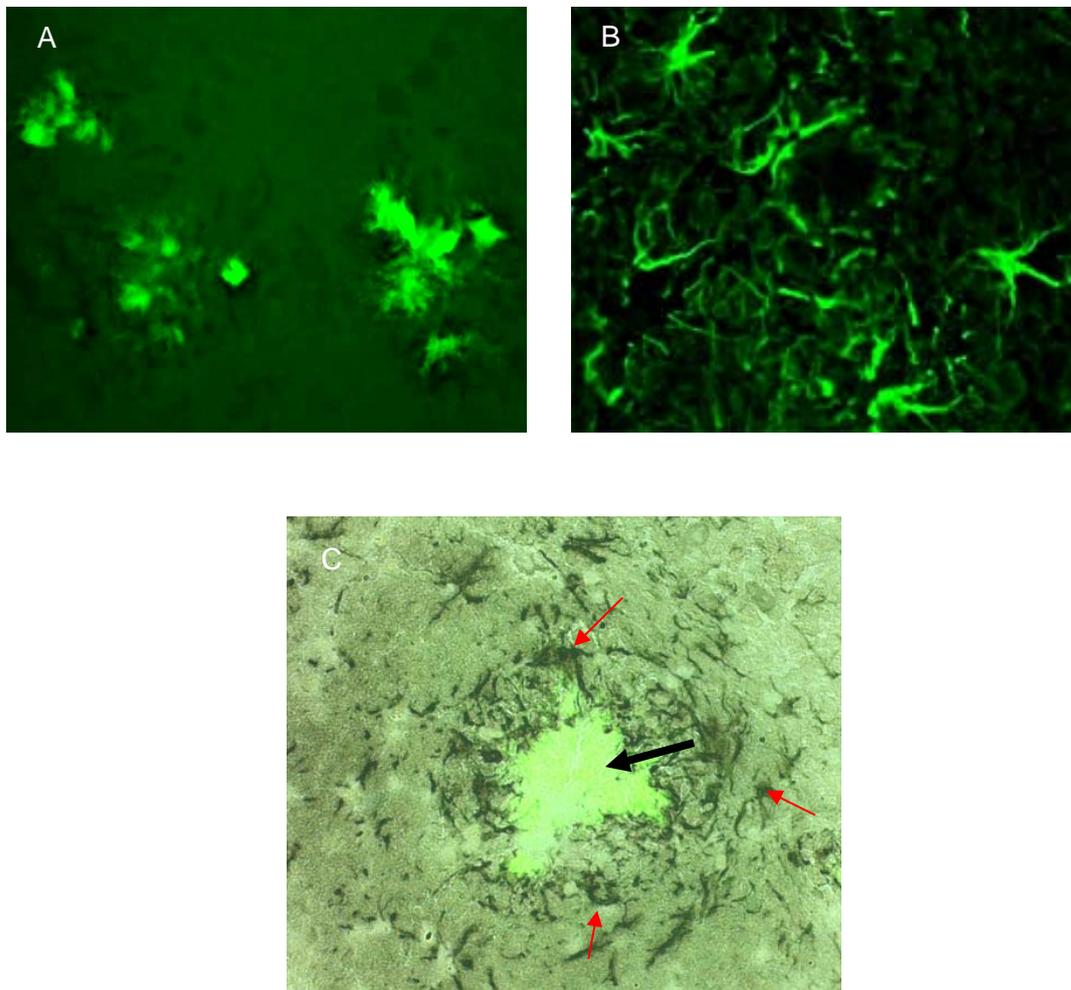


Abbildung 34: CXCL13-Expression in APP23 transgenen Mäusen. In den 18 Monate alten APP23 transgenen Mäusen konnte eine Akkumulation von amyloiden Plaques im Bereich des Cortex und Hippocampus beobachtet werden (A). In diesen Hirnregionen ist auch eine verstärkte Expression von CXCL13 zu finden (B). CXCL13-positive Astrozyten (roter Pfeil) sind vor allem in der Nähe von Amyloid-Plaques (schwarzer Pfeil) zu finden (C). (Vergrößerung 400x)

4.3.5 Expression von CXCL13 in CD36/SR-A-Knockout-Tieren

Mit Hilfe der real-time QPCR konnte bereits festgestellt werden, dass die Expression von CXCL13 zum Krankheitszeitpunkt 125 dpi in den CD36/SR-A-Knockout-Tieren im Vergleich zu den Wildtypkontrollen stark herunterreguliert ist (Diagramm 10). Auch die immunhistologische Untersuchung zeigte in allen Hirnregionen eine geringere Expression von CXCL13 in den CD36/SR-A-Knockout-Tieren zum Zeitpunkt 125 dpi (Abb. 35). Besonders ausgeprägt war die CXCL13-Expression in den Hirnregionen Cortex (Abb. 35, A und B) und Thalamus (Abb. 35, C und D).

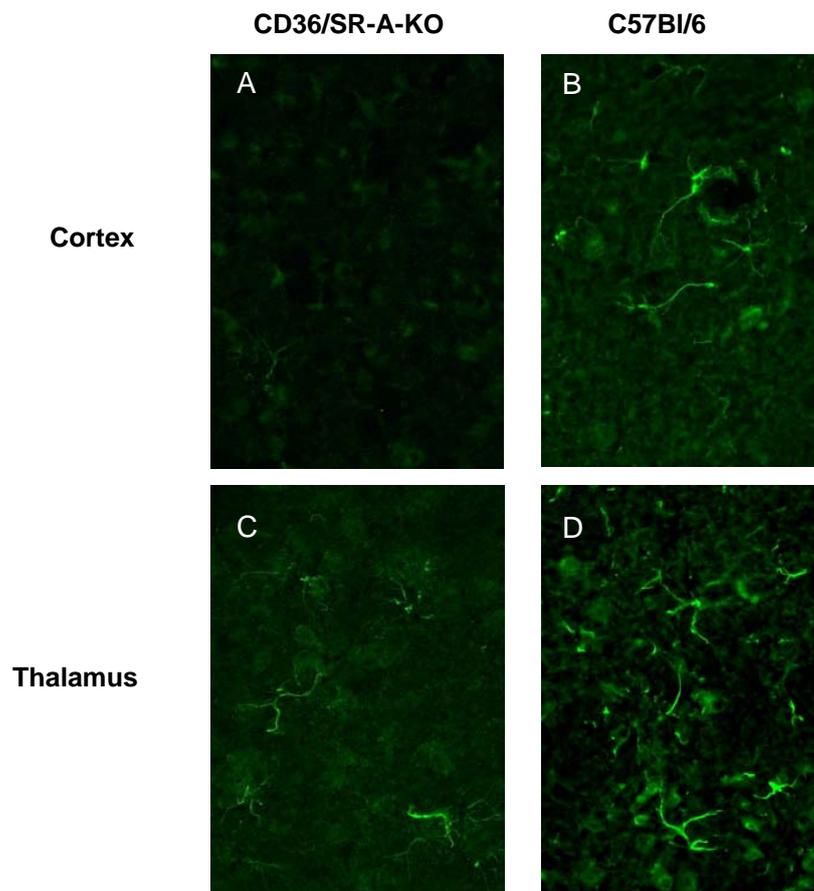


Abbildung 35: Untersuchung der CXCL13-Expression in CD36/SR-A-Knockout-Mäusen im asymptotischen Stadium der Infektion. Zum Zeitpunkt 125 dpi konnte eine geringere Expression von CXCL13 in den Knockout-Mäusen (A und C) im Vergleich zu den Wildtypmäusen (B und D) beobachtet werden. Dargestellt sind Cortex (A und B) und Thalamus (C und D). (Vergrößerung 400x)

Zum terminalen Krankheitszeitpunkt konnte hingegen in allen untersuchten Hirnregionen eine Expression von CXCL13 in den Knockout-Mäusen detektiert werden. Diese war im Vergleich zu den Wildtypkontrollen sogar leicht erhöht (Abb. 36), wie hier dargestellt im Cortex (Abb. 36, A und B) und Thalamus (Abb. 36, C und D).

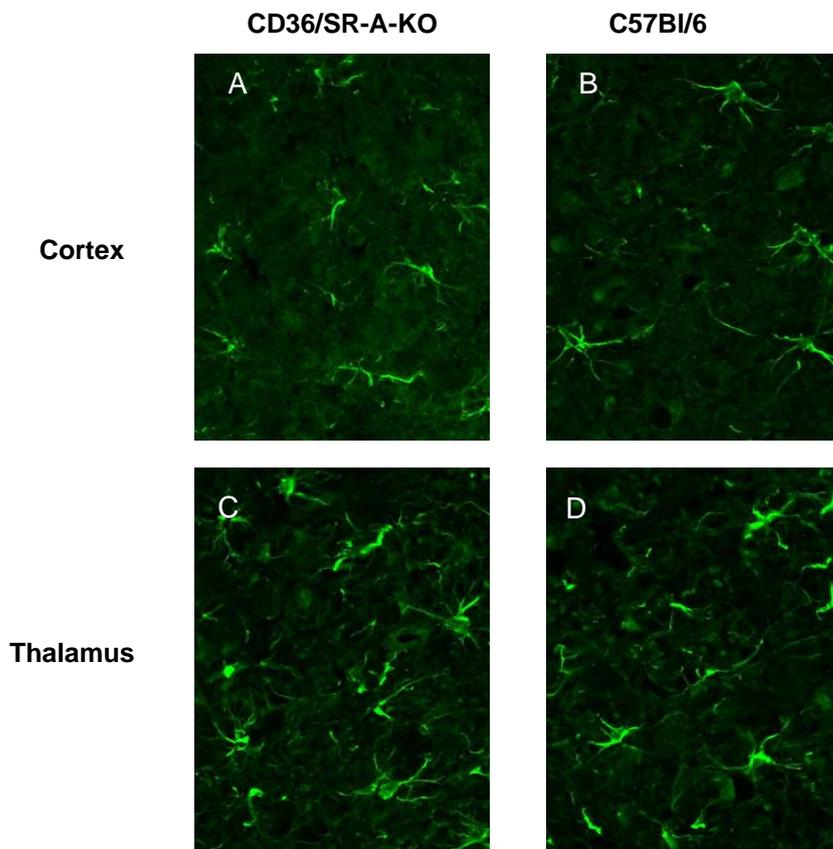


Abbildung 36: Untersuchung der CXCL13-Expression in CD36/SR-A-Knockout-Mäusen im terminalen Stadium der Infektion. Zum terminalen Krankheitszeitpunkt konnte nur ein geringerer Unterschied in der Expression von CXCL13 in den Knockout-Mäusen (A und C) im Vergleich zu den Wildtypmäusen (B und D) beobachtet werden. Die Expression scheint in den Knockout-Tieren leicht erhöht. Dargestellt sind Cortex (A und B) und Thalamus (C und D). (Vergrößerung 400x)

4.4 Generierung CXCL13-transgener Mäuse

Wie bereits erwähnt, gelangte CXCL13 durch seine starke Überexpression im ZNS während der Scrapie-Infektion in den Fokus des Interesses. Nach Expressionsanalysen und immunhistologischen Untersuchungen sollten im Rahmen dieser Arbeit CXCL13-transgenen Mäusen generiert werden, um mehr über die biologische Funktion und mögliche Rolle dieses Chemokins im ZNS in Erfahrung zu bringen.

4.4.1 Herstellung des Expressionskonstruktes mittels PCR, Ligation und Klonierung

Für die Generierung der transgenen Mäuse wurden vier verschiedene Konstrukte hergestellt, indem die Sequenz des murinen CXCL13 mithilfe der PCR amplifiziert wurde.

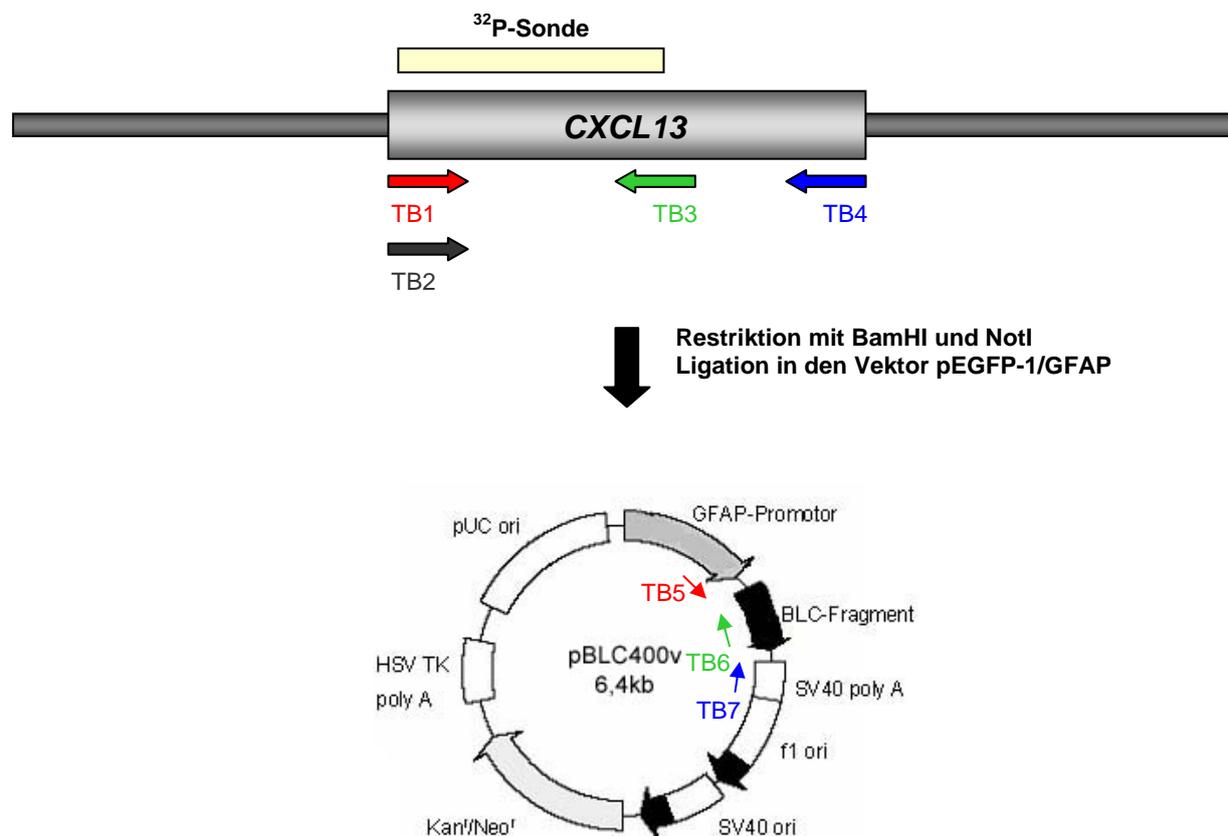


Abbildung 37: Herstellung der CXCL13-Konstrukte. Es wurden vier CXCL13-Fragmente mithilfe der Primer TB1-4 hergestellt. Mithilfe der Primer TB5 und TB6 wurde überprüft, ob die Integration des BLC-Fragmentes erfolgreich war. Die Primer TB5 und TB7 wurden zur späteren Genotypisierung der Mäuse verwendet.

Die Konstrukte unterschieden sich wie folgt: pBLC600u enthielt die unveränderte Sequenz, also den gesamten ORF. pBLC600v besaß zusätzlich eine optimierte Kozak-Sequenz. pBLC400u war in seiner

3'UTR verkürzt und pBLC400v enthielt letztendlich eine verkürzte 3'UTR und eine optimierte Kozak-Sequenz (3.7.1).

Die amplifizierten Fragmente wurden mit BamHI und NotI geschnitten und in den Vektor pEGFP-1/GFAP ligiert (7.5.2, Abb. 46). Der Expressionsvektor enthielt neben einer Kanamycinresistenzkassette einen GFAP-Promotor (Abb. 37), um eine Astrozyten-spezifische Expression im ZNS zu gewährleisten.

4.4.2 Charakterisierung der Transformanden mittels Kolonie-PCR

Die erhaltenen Transformanden wurden mithilfe einer Kolonie-PCR (3.4.3.2) getestet, ob die Integration des Fragmentes erfolgreich war und ob das Fragment die richtige Orientierung aufwies. Dazu dienten die Primer TB5 und TB6 (Abb. 37). Es konnten mehrere Klone gefunden werden, welche die erwartete Bande von ca. 400 bp aufwiesen, die charakteristisch für die korrekte Integration des Fragmentes war (Abb. 38).

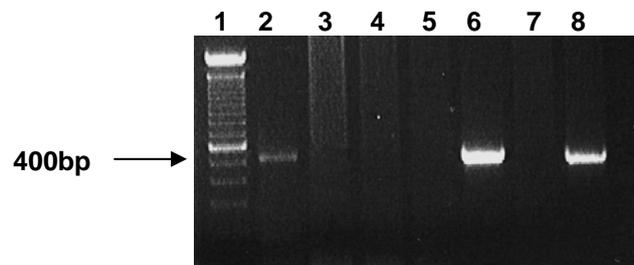


Abbildung 38: Untersuchung der Transformanden mittels Kolonie-PCR. Mithilfe einer Kolonie-PCR wurden mehrere Transformanden gefunden, die das 400 bp-große CXCL13-Fragment integriert hatten (Spur 2, 6, 8). Durch Verwendung der Primer TB5 und TB6 wurde gleichzeitig bestätigt, dass das Fragment die richtige Orientierung aufwies. In der ersten Spur wurde ein 100 bp-Marker aufgetragen.

4.4.3 Überprüfung der Konstrukte mittels Zellkultur

Die positiven Transformanden wurden nun eingesetzt, um die Konstrukte im quantitativen Maßstab zu präparieren (3.4.1.1). Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mit Ethanol gefällt und anschließend zur Transfektion von SNB19-Zellen verwendet (3.5.2). Damit sollte getestet werden, ob die Konstrukte für die Protein-Expression geeignet sind. Die Zellüberstände wurden 24 und 48 Stunden nach der Transfektion abgenommen und die CXCL13-Expression mithilfe eines CXCL13-ELISA bestimmt (3.5.1.4).

Der ELISA ergab nach 24 Stunden eine erhöhte CXCL13-Expression für das Konstrukt pBLC400v im Vergleich zu den übrigen Konstrukten und der mock-transfizierten Kontrolle. Im Überstand der mit dem Konstrukt pBLC400v transfizierten Zellen wurde nach 24 Stunden 140pg/ml und nach 48 Stunden 850 pg/ml CXCL13-Protein nachgewiesen. Für die übrigen Konstrukte konnte nur eine schwache Expression für beide Zeitpunkte festgestellt werden. In den jeweiligen Zellüberständen konnte nach 24 Stunden ca. 20 – 40 pg/ml und nach 48 Stunden durchschnittlich 100 pg/ml CXCL13-Protein detektiert werden (Diagramm 11). Somit ergab die Transfektion mit dem Konstrukt pBLC400v,

das eine veränderte Kozak-Sequenz und eine verkürzte 3'UTR enthielt, die höchste CXCL13-Expression. Dieses Konstrukt sollte weiterführend zur Generierung der transgenen Mäuse eingesetzt werden.

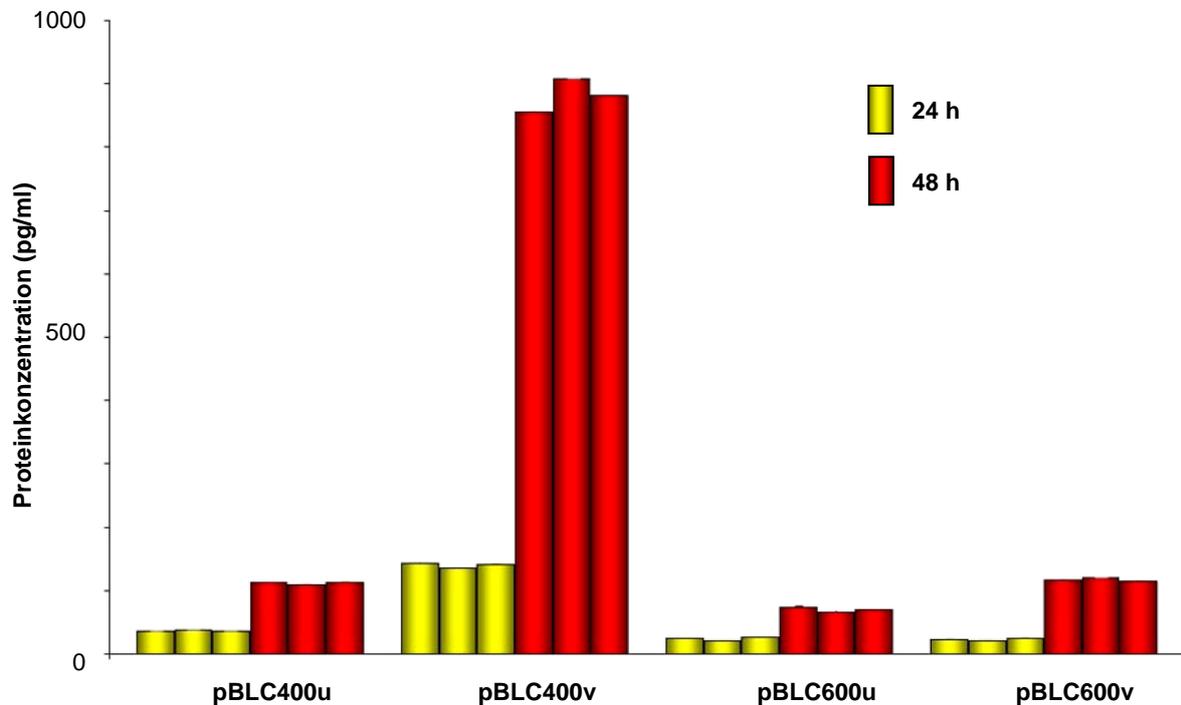


Diagramm 11: CXCL13-ELISA von Zellüberständen nach der Transfektion. Der CXCL13-ELISA, der von den Zellüberständen nach 24 und 48 Stunden nach der Transfektion durchgeführt wurde, ergab eine hohe Proteinkonzentration für das Konstrukt pBLC400v. Sie lag nach 48 Stunden bei etwas 850 pg/ml. Bei den anderen Konstrukte konnte nur eine schwache Expression nachgewiesen werden.

4.4.4 Generierung der CXCL13-transgenen Mäuse

Für die Generierung der CXCL13-transgenen Mäuse wurde zunächst das funktionelle 3kB-Fragment, das GFAP-Promotor und CXCL13-Sequenz beinhaltet, aus dem Vektor mit BglIII, DraIII und BspHI herausgeschnitten. Es wurden drei Restriktionsenzyme verwendet, um das 3kB-Fragment eindeutig identifizieren zu können. Da der Rest des Expressionsvektors ebenfalls 3kB entsprach, wäre es sonst kaum möglich gewesen, die beiden Fragmente zu unterscheiden. Mit dem dritten Restriktionsenzym wurde daher der restliche Vektor in zwei kleinere Fragmente zerlegt.

Das funktionelle 3kB-Fragment wurde dann in die Pronuclei der befruchteten Eizellen injiziert und wieder in pseudoschwangere Mäuse eingesetzt (3.6.1). Die Generierung der transgenen Mäuse wurde am MPI für Infektionsbiologie in Berlin in Zusammenarbeit mit Dr. U. Klemm durchgeführt. Die Abbildung 39 gibt einen Überblick über den Vorgang.

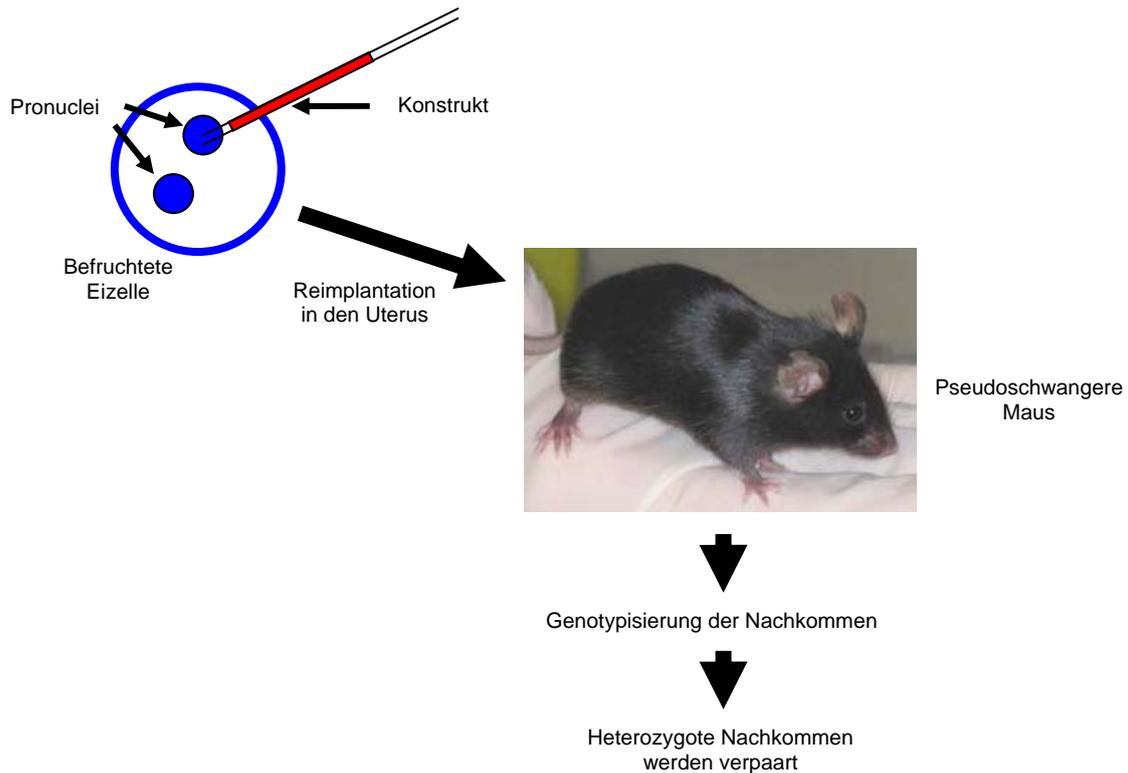


Abbildung 39: Generierung transgener Mäuse. Für die Generierung von transgenen Mäusen wurde die Pronuclei-Methode angewendet. Dabei wird das gewünschte Gen in die Pronuclei einer befruchteten Eizelle injiziert und einer pseudoschwangeren Maus reimplantiert. Der Nachwuchs wird mithilfe der PCR genotypisiert.

4.4.5 Genotypisierung der transgenen Mäuse mittels PCR

Die durch die Injektionsrunden erhaltenen Mäuse wurden mithilfe einer PCR genotypisiert. Hierbei sollte festgestellt werden, ob die Tiere das Konstrukt im Genom integriert hatten. Für die PCR wurden die Primer TB5 und TB7 verwendet (Abb. 37), die im Sequenzbereich des GFAP-Promotors bzw. ORF binden. Durch die Amplifikation wurde ein etwa 600 bp großes Fragment generiert (Abb. 40).

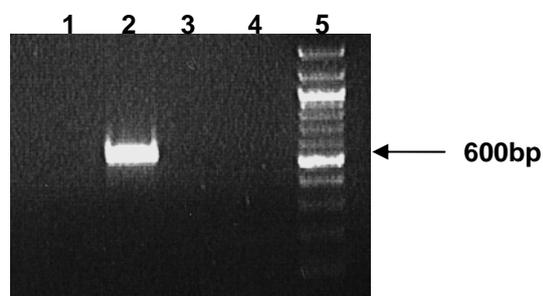


Abbildung 40: Genotypisierung der Mäuse mittels PCR. Unter den Nachkommen befand sich eine transgene Maus (Spur 2). Dieses Tier hatte das CXCL13-Konstrukt in ihrem Genom integriert. In Spur 5 ist ein 100 bp-Marker aufgetragen.

Nach mehreren erfolglosen Injektionsrunden, ergab die Genotypisierung von 53 Nachkommen schließlich ein transgenes Tier (Abb. 40, Spur 2), das die Integration des CXCL13-Konstruktes aufwies. Dieses „Founder“-Tier wurde anschließend mit C57Bl/6-Mäusen weiterverpaart. Die Nachkommen wurden erneut genotypisiert. Von den erhaltenen transgenen Mäusen wurden einige Tiere eingesetzt, um zu überprüfen, ob eine CXCL13-Expression im ZNS stattfindet. Die übrigen Mäuse wurden weiterverpaart.

4.4.6 Untersuchung der CXCL13-Expression im Gehirn transgener Mäuse mittels real-time QPCR

Um festzustellen, ob das erhaltene „Founder“-Tier tatsächlich CXCL13 im ZNS exprimiert, sollte die mRNA-Expression mithilfe einer real-time QPCR untersucht werden. Hierfür wurden mehrere CXCL13-transgene Nachkommen der F1-Generation getestet. Es wurde cDNA aus Gehirnen der transgenen Tiere und ihrer nicht-transgenen Geschwister untersucht. Die cDNA eines Scrapie-infizierten Gehirns wurde als Kontrolle ebenfalls eingesetzt. Die real-time QPCR wurde wie in 3.4.4 beschrieben durchgeführt.

Die Expressionsanalyse von CXCL13 ergab eine etwa 345-fach höhere Expression des Chemokins im transgenen Gehirn im Vergleich zum nicht-transgenen Gehirn. Zudem lag das Expressionslevel der transgenen Mäuse weit über dem der Scrapie-infizierten Gehirne. Die Werte in dem Diagramm sind logarithmisch aufgetragen. Das Expressionslevel der nicht-transgenen Gehirne wurde gleich 1 gesetzt und stellte den Vergleichswert dar (Diagramm 12).

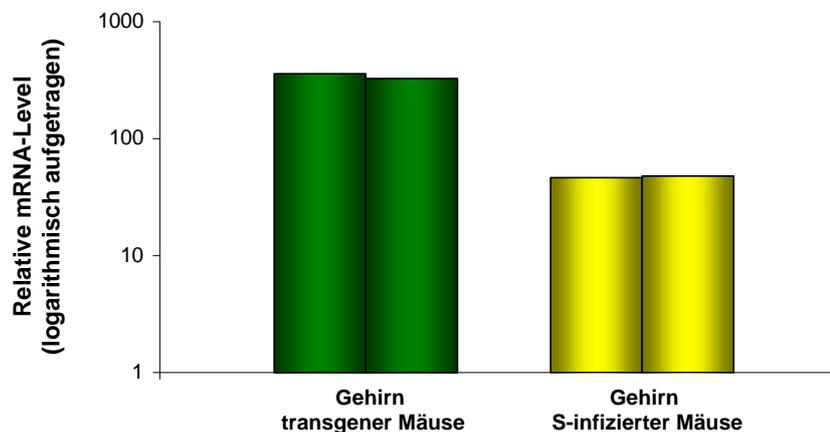


Diagramm 12: Expressionsanalyse von CXCL13 in CXCL13-transgenen Mäuse mittels real-time QPCR. Es ergab sich eine stark erhöhte Expression von CXCL13 für die transgenen Tiere. Die Expression in den nicht-transgenen Geschwistern wurde gleich 1 gesetzt und diente als Vergleichswert.

4.4.7 Untersuchung der CXCL13-Proteinexpression im Gehirn transgener Mäuse mittels ELISA

Neben der Expression auf RNA-Ebene sollte auch die Proteinexpression in den CXCL13-transgenen Mäusen untersucht werden. Hierfür wurde ein CXCL13-ELISA durchgeführt. Es wurden 10%ige Hirnhomogenate hergestellt und abzentrifugiert. Die jeweiligen Überstände wurden im ELISA unverdünnt eingesetzt. Es wurden Hirnhomogenate von 3 transgenen, 3 nicht-transgenen und 2 Scrapie-infizierten Mäusen verwendet.

Mit dem CXCL13-ELISA konnten die Ergebnisse der vorangegangenen real-time QPCR bestätigt werden. Für die CXCL13-transgenen Mäuse ergab sich eine sehr hohe Proteinkonzentration gegenüber den nicht-transgenen Geschwistern. Sie lag bei etwa 1150 pg/ml. Für die nicht-transgenen Tiere konnte lediglich eine Konzentration von 40 pg/ml detektiert werden. Die Expression im Scrapie-infizierten Gehirn lag bei etwa 260 pg/ml (Diagramm 13).

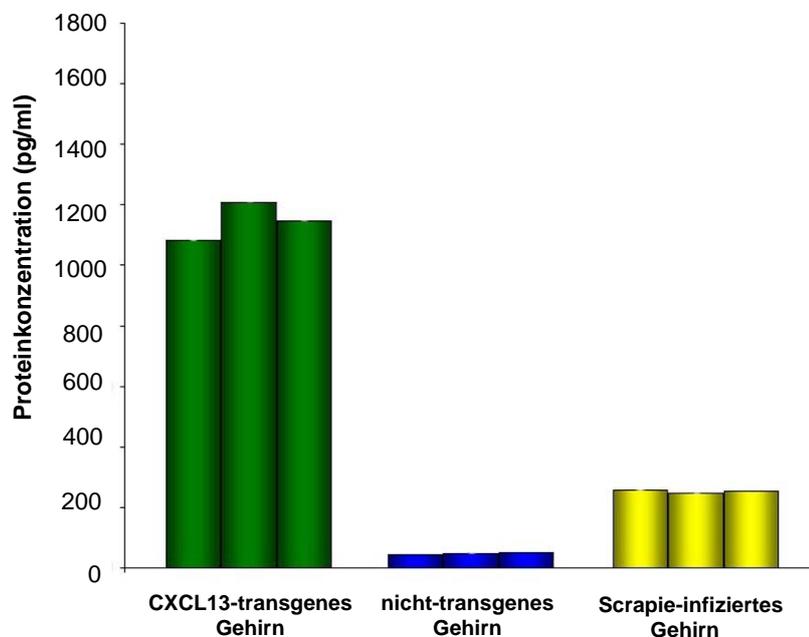


Diagramm 13: CXCL13-ELISA zur Untersuchung der Proteinexpression in CXCL13-transgenen Mäusen. Mithilfe des ELISAs konnte eine stark erhöhte CXCL13-Expression für die transgenen Tiere im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistern detektiert werden. Die Proteinkonzentration des Scrapie-infizierten Gehirns lag zwar oberhalb der Konzentration der nicht-transgenen Tiere, aber dennoch weit unterhalb der Proteinkonzentration der transgenen Tiere.

4.4.8 Bestimmung der Kopienzahl des Konstruktes

Letztendlich sollte die Anzahl der integrierten Genkopien bestimmt werden. Dies wurde mithilfe der real-time QPCR durchgeführt. Es wurde genomische DNA von je zwei Transgenen und Wildtypen eingesetzt. Von jeder Probe erfolgte auch hier eine Dreifachbestimmung und es wurde ebenfalls eine RT-Probe mitgeführt, um DNA-Kontaminationen auszuschließen. Zusätzlich wurde eine Leerwertkontrolle je Versuch angesetzt, um jegliche andere Kontaminationen ausschließen zu

können. Als externer Standard diente das „housekeeping“-Gen GAPDH. Als Primer wurden Oligonukleotide verwendet, die innerhalb eines Exons lokalisiert waren.

Für jede Tiergruppe, also Transgen und Wildtyp, wurde die durchschnittliche Zyklenzahl berechnet. Zur Berechnung der Kopienzahl wurde die Zyklusdifferenz zwischen den Tiergruppen gleich n gesetzt. Die Anzahl der Genkopien wurde nach folgender Formel bestimmt: 2^n . Der Wildtyp entsprach der Kopienzahl 2 für den diploiden Chromosomensatz. Für die CXCL13-transgenen Tiere ergab sich ein Zyklusunterschied von 4 zu den Wildtypen und somit eine Kopienzahl von 16 für den diploiden Chromosomensatz.

Das „Founder“-Tier und seine transgenen Nachkommen weisen demnach eine hohe Kopienzahl auf, die Grundlage für eine starke Expression von CXCL13 im ZNS ist. Dies konnte bereits auf RNA- und Proteinebene gezeigt werden. Daher soll die erhaltene Zuchtlinie weiter untersucht werden, um letztendlich die Funktion und mögliche Rolle von CXCL13 während der Scrapie-Pathogenese zu klären. Es sollen Langzeit- und Infektionsstudien folgen.

4.5 Infektionsstudien an CXCL13-transgenen Mäusen

Die generierten CXCL13-transgenen Mäuse wurden schließlich in Infektionsstudien eingesetzt, die allerdings erst nach Beendigung des praktischen Teils dieser Arbeit beendet wurden. Daher werden hier lediglich die Überlebenszeiten genannt, um einen Ausblick darauf geben zu können, welchen Einfluss eine CXCL13-Überexpression im ZNS haben könnte.

4.5.1 Vergleich der Überlebenszeiten

Für die Infektionsstudien wurden die CXCL13 transgene Mäuse und die Wildtyp-Kontrollmäuse mit dem gleichen genetischen Hintergrund C57Bl/6 intrazerebral mit einem 10^{-3} verdünnten 10%igen Hirnhomogenat infiziert, das aus einer Scrapie-infizierten Maus im terminalen Krankheitsstadium stammte (3.2.2). Die erste Gruppe infizierter Tiere wurde erst beim Erreichen des terminalen Krankheitsstadiums getötet, um die Überlebenszeiten zu untersuchen. Es wurden Gehirn und Milz entnommen und fixiert.

Aus Tabelle 3 ist zu entnehmen, dass die intrazerebral infizierten CXCL13 transgenen Mäuse durchschnittlich 157 ± 6 Tage nach der Infektion das terminale Krankheitsstadium erreichten. Die Wildtypkontrollen erreichten dieses Stadium erst nach durchschnittlich 175 ± 6 . Die Differenz entspricht einem Unterschied von 18 Tagen und ist statistisch signifikant ($p < 0,0042$, logrank test). Diagramm 15 gibt einen Überblick über dieses Ergebnis.

Tabelle 3: Überlebensdaten (dpi) der Scrapie-infizierten CXCL13-transgenen Tiere sowie der C57Bl/6-Kontrolltiere. Die Überlebenszeiten sind für die Infektionsdosis 10^{-3} angegeben. Die Anzahl der Versuchstiere entspricht n. Die statistischen Unterschiede bei den Überlebenszeiten wurden mithilfe des „logrank test“ ermittelt. Als statistisch signifikant wurde ein Ergebnis ab einem Wert von $p < 0,05$ bewertet: * $p < 0,0042$.

Verdünnung des 10% Hirnhomogenats	CXCL13 transgene Tiere	C57Bl/6-Kontrolltiere
10^{-3} i.c.	157 ± 6 (n=6)*	175 ± 6 (n=6)*

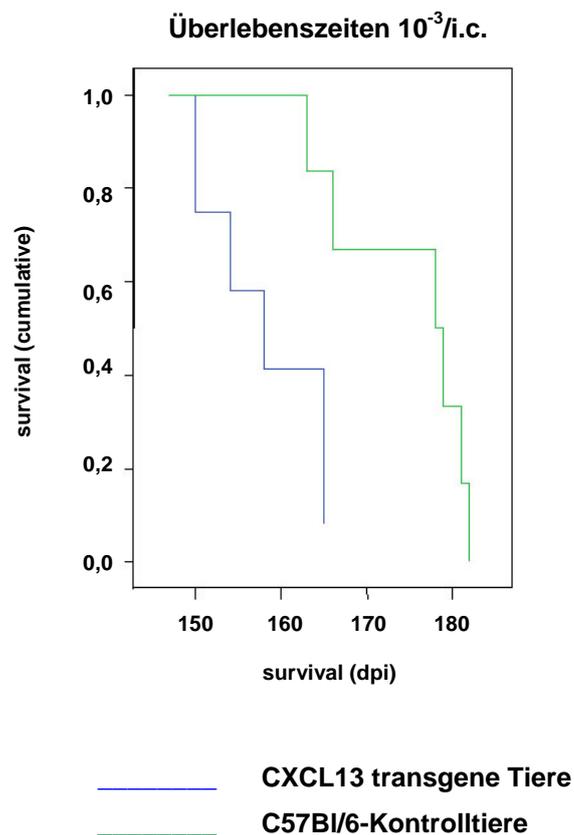


Diagramm 15: Übersicht zu den Überlebenszeiten der Scrapie-infizierten CXCL13 transgenen Mäuse und C57Bl/6-Kontrolltiere. Im Vergleich sind die Scrapie-infizierten CXCL13 transgenen Mäuse und die entsprechenden C57Bl/6-Kontrolltiere dargestellt. Sie zeigen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen eine verkürzte Überlebenszeit bei einer Infektionsdosis von 10^{-3} und einer intrazerebralen Infektion.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Scavenger Rezeptoren und Chemokinen in der Scrapie-Pathogenese zu untersuchen. Hierzu wurden Infektionsstudien durchgeführt, bei denen die Überlebenszeiten der Tiere untersucht wurden. Zudem erfolgten Untersuchungen auf immunhistologischer Ebene (Astrozytose, Mikrogliose, PrP^{Sc}-Ablagerung, spongiforme Veränderungen), die durch Expressionsanalysen (real-time QPCR) bestätigt und ergänzt wurden.

5.1 CD36/SR-A

Die Scavenger Rezeptoren CD36 und SR-A wurden bereits im Zusammenhang mit dem Morbus Alzheimer (AD) diskutiert. Sie vermitteln im Alzheimer-erkrankten Gehirn möglicherweise die Interaktion von Mikroglia und Makrophagen mit fibrillärem A β (fA β) und könnten somit in inflammatorische Reaktionen während der Alzheimer Pathogenese involviert sein (Coraci et al., 2002; El Khoury et al., 2003).

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von CD36 und SR-A im uninfizierten und Scrapie-infizierten Gehirn darzustellen, sowie ihren Einfluss auf eine Prion-Infektion des ZNS in einem murinen Scrapie-Modell zu untersuchen.

5.1.1 Verstärkte Expression von CD36 und SR-A im Scrapie-infizierten Gehirn

CD36 und SR-A werden in der Peripherie von einer Reihe unterschiedlicher Zelltypen exprimiert. Hierzu zählen Phagozyten, Makrophagen, Thrombozyten, DC's und Kupffer-Zellen (Yamada et al., 1998; Febbraio et al., 2001). Im zentralen Nervensystem ist die Expression der beiden SR's allerdings weniger gut untersucht. Im Alzheimer-Modell wurde bislang eine gesteigerte Expression von CD36 und SR-A durch Mikroglia beschrieben (Coraci et al., 2002, Husemann et al., 2001, Husemann et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von CD36 und SR-A im nicht-infizierten und Scrapie-infizierten Gehirn durch immunhistologische Untersuchungen analysiert.

Im Falle von CD36 konnte festgestellt werden, dass der Scavenger Rezeptor im gesunden Gehirn nur schwach exprimiert wird. Lediglich im Hippocampus konnten CD36-positive Zellen detektiert werden (Abb. 11, A-D). Im Scrapie-infizierten Gehirn konnte dagegen in allen Hirnregionen CD36 nachgewiesen werden (Abb. 11, E-H). SR-A wird im gesunden, nicht-infizierten Gehirn nicht exprimiert. Es waren keine SR-A-positiven Zellen nachweisbar (Abb. 13, A-D). Während der Prion-Infektion ist jedoch eine SR-A-Expression zu beobachten. Im Scrapie-infizierten Gehirn sind alle Hirnregionen SR-A-positiv (Abb. 13, E-H). Durch eine Doppelfärbung mit GFAP, einem Astrozytenmarker, konnte gezeigt werden, dass CD36 und SR-A von aktivierten Astrozyten exprimiert werden (Abb. 12 und 14).

5.1.2 Infektionsstudien an CD36/SR-A-Knockout-Mäusen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer SR-A- und CD36-Defizienz auf den zentralnervösen Verlauf der Scrapie-Infektion in Mäusen, die ein gut etabliertes TSE-Modell darstellt, zu untersuchen. Da die Pathogenese von TSE und AD eine Reihe von Parallelen aufweist und die bislang veröffentlichten Studien zu CD36 und SR-A überwiegend am AD-Modell durchgeführt wurden, wurden die Ergebnisse dieser Arbeit, wenn möglich, mit den AD-Studien in Bezug gesetzt.

5.1.2.1 Verminderte Mikrogliaaktivierung in Scrapie-infizierten CD36/SR-A-Knockout-Mäusen während der asymptomatischen Phase der Infektion

Die Aktivierung von Mikroglia ist ein frühes Ereignis in der zentralnervösen Scrapie-Pathogenese und verläuft parallel zur Ablagerung von PrP^{Sc}. Es kann bereits vor dem Auftreten neurodegenerativer Prozesse und klinischer Symptome festgestellt werden (Giese et al., 1998; Brown et al., 1996).

Für die Aktivierung von Mikroglia durch PrP^{Sc} und A β werden ähnliche Signaltransduktionswege vermutet (Combs et al., 1999). Beides sind fibrilläre amyloide Ablagerungen, die mit reaktiven Glia, vorwiegend Mikroglia, assoziiert sind. Verschiedene *in vitro*-Studien konnten bereits zeigen, dass fA β und PrP^{Sc} in der Lage sind, die Sekretion von Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies zu induzieren (Forloni et al., 1993; Brown et al., 1996; Kretzschmar et al., 1997). Als Rezeptor für die Mikroglia-Aktivierung durch PrP^{Sc} ist bislang FPRL-1 beschrieben worden (Le et al., 2001b), der zudem in der Lage ist, A β zu binden, was ebenfalls zu einer Aktivierung von Mikroglia führt (Le et al., 2001a; Lorton, 1997). Daher könnten auch weitere Rezeptoren, die durch Mikroglia exprimiert werden und für die bereits eine Interaktion mit A β beschrieben wurde, als Bindungspartner für PrP^{Sc} in Frage kommen. Zu diesen Rezeptoren zählen unter anderem SR-A (El Khoury et al., 1996; Paresce et al., 1996), SR-BI (Husemann et al., 2001), RAGE (Yan et al., 1996), $\alpha_5\beta_1$ -Integrin (Matter et al., 1998) und der Scavenger Rezeptor CD36 (Coraci et al., 2002; Moore et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mikrogliose immunhistochemisch durch den Nachweis Iba-1-positiver Mikroglia untersucht. In den Einzel-Knockouts konnte in der asymptomatischen Phase der Infektion in den untersuchten Hirnregionen keine eindeutigen Unterschiede in der Mikrogliose im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypkontrollen detektiert werden (Abb. 24, Diagramm 2). Die Defizienz nur eines Rezeptors scheint demnach keinen Einfluss auf die Aktivierung der Mikroglia zu haben.

Im Falle von SR-A entspricht das den Ergebnissen der AD-Studien. SR-A wurde hier eher eine geringe Rolle zugesprochen, da die Eliminierung einer SR-A-Expression keinerlei Effekt auf Amyloid-Ablagerung oder Neurodegeneration bewirkte (Huang et al., 1999). In anderen Versuchen stellte sich heraus, dass SR-A zwar bei der Interaktion mit fA β eine Rolle spielt, aber nicht an der Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden beteiligt ist, die zu einer proinflammatorischen Immunantwort führen (Bamberger et al., 2001).

CD36 hingegen war im Vorfeld bereits als wichtiger Akteur während der Alzheimer-Pathogenese beschrieben worden. Auch CD36 agiert als Rezeptor für fibrilläres A β (Coraci et al., 2002; Moore et al., 2002). In früheren Untersuchungen wurde anhand von *in vitro*-Modellen demonstriert, dass CD36

für die fA β -induzierten Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia notwendig ist. Eine Folge dieser Aktivierung war unter anderem die Produktion von ROS, TNF α und IL-1 β (El Khoury et al., 2003). Die Knockout-Tiere zeigten außerdem *in vivo* eine geringere Rekrutierung von Mikroglia und Makrophagen als Antwort auf die Injektion von fA β (El Khoury et al., 2003). Zudem weisen *in vitro* Studien daraufhin, dass CD36 zusammen mit $\alpha_6\beta_1$ -Intergrin sowie CD47 einen Multirezeptor-Komplex bildet, der die Aktivierung von Mikroglia und anderen myeloiden Zellen (THP-1 Monozyten) durch die Interaktion mit fibrillärem A β vermittelt und intrazelluläre Signalkaskaden induziert (Bamberger et al., 2003).

Daher stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit den beschriebenen AD-Studien nur bedingt überein. So zeigt die Defizienz für den Scavenger-Rezeptors CD36 im Scrapie-Modell an sich keine signifikante Auswirkung auf die Mikrogliaaktivierung.

Demgegenüber waren Unterschiede bzgl. der Mikrogliose in den CD36/SR-A-Knockout-Tieren in diesem Krankheitsstadium wesentlich deutlicher ausgeprägt (Abb. 24, Diagramm 2). Iba-1, ein genereller Marker für Mikroglia, sowie Lysozym M und Galektin-3, Marker die von aktivierten Mikroglia exprimiert werden, zeigten in diesen Tieren eine verminderte Expression (Diagramm 8 und 9). Dies lässt eine mögliche Rolle von CD36 und SR-A in der frühen Mikrogliose vermuten. Da für beide Rezeptoren, CD36 und SR-A, eine Expression durch Mikroglia nachgewiesen werden konnte (Coraci et al., 2002), könnten sie möglicherweise an der Aktivierung der Mikroglia beteiligt sein, in dem sie die Interaktion zwischen PrP^{Sc} und den Mikroglia vermitteln.

Zum terminalen Krankheitszeitpunkt konnten die Unterschiede zwischen den Wildtypkontrollen und den CD36/SR-A^{-/-}-Tieren bzgl. Iba-1 und Galektin-3 nicht mehr beobachtet werden (Abb. 25, Diagramm 3). Allerdings zeigte sich zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Erhöhung (6,5-fache) der Lysozym M Expression (Diagramm 9) in den CD36/SR-A^{-/-}-Tieren. D. h., dass zumindest bestimmte Aspekte der Mikroglia-Aktivierung in den Knockout-Tieren wesentlich stärker ausgeprägt waren. Lysozym M ist ein bakteriolytisches Enzym, das von aktivierten Makrophagen exprimiert wird (Venezie et al., 1996). In Gehirnen Scrapie-infizierter Mäuse konnte eine Expression von Lysozym M durch F4/80 immunreaktive Mikroglia immunhistochemisch nachgewiesen werden (Kopacek et al., 2000). Diese Sekretion von Lysozym M korrelierte zudem mit den pathologischen Veränderungen im ZNS während der Scrapie-Pathogenese und könnte hier auf verstärkte neurodegenerative Prozesse hindeuten.

Die Einzel-Knockout-Tiere zeigten auch im terminalen Krankheitsstadium keine Unterschiede zu den Wildtyptieren (Abb. 25, Diagramm 3).

Zusammengefasst lassen diese Beobachtungen darauf schließen, dass die beiden Scavenger-Rezeptoren CD36 und SRA nur in der Kombination, also in den CD36/SR-A^{-/-}-Tieren, in diesem Prionmodell einen Einfluss auf die Mikroglia-Aktivierung haben.

5.1.2.2 Verminderte Astrozytenaktivierung in Scrapie-infizierten CD36/SR-A-Knockout-Mäusen während der asymptomatischen Phase der Infektion

Die Aktivierung von Astrozyten kann durch proinflammatorische Zytokine und andere lösliche Faktoren, die von aktivierten Mikroglia sezerniert werden, erfolgen (Schultz et al., 2004; Hafiz, 2000), aber möglicherweise auch durch eine direkte Interaktion mit PrP^{Sc} über Scavenger Rezeptoren (Wyss-Coray, 2003). Dies wurde bereits im AD-Modell beobachtet, in dem Astrozyten direkt durch A β bzw. durch von Mikroglia sezernierten Proteine aktiviert werden konnten (Hu et al., 1999; Hu et al., 1998). Aktivierte Astrozyten können während einer Scrapie-Infektion bereits im frühen Krankheitsstadium noch vor dem Auftreten klinischer Symptome nachgewiesen werden (Diedrich et al., 1991). Sie tragen unter anderem zu einer Verstärkung der Neuroinflammation bei, da sie z. B. durch die Expression von Chemokinen wie MCP-1, CXCL9 und CXCL10 die Einwanderung weiterer Mikroglia in bereits geschädigte Regionen bewirken (Marella and Chabry, 2004). Pathologisch aktivierte Astrozyten sind außerdem nicht mehr in der Lage, den extrazellulären Glutamatspiegel effizient zu regulieren. Dadurch erhöht sich der Glutamatspiegel an den Synapsen, die dadurch letztlich exzitotoxisch geschädigt werden können (Brown et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit sollte ermittelt werden, welche Auswirkungen eine CD36/SR-A-Defizienz auf das Ausmaß der Astrozytenaktivierung hat. Untersucht wurde die Astrozytose über den immunhistochemischen Nachweis von GFAP sowie durch eine quantitative real-time PCR.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen zeigen, dass CD36 und SR-A in die frühe Astrozytose involviert sein könnten, da diese in einigen Hirnregionen der CD36/SR-A^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen in der asymptomatischen Phase der Infektion stark vermindert ist (Abb. 26, Diagramm 4). Diese Ergebnisse konnten durch die quantitative real-time PCR bestätigt werden (Diagramm 8) und korrelieren mit der ebenfalls verminderten Mikrogliose in den CD36/SR-A-defizienten Mäusen zu diesem Krankheitszeitpunkt. Die Einzel-Knockouts zeigten keine Unterschiede zu den Wildtyp-Kontrollen (Abb. 26, Diagramm 4).

Die verminderte Astrozytose in den CD36/SRA^{-/-}-Tieren könnte durch die ebenfalls schwächere Aktivierung von Mikroglia erklärt werden, da die Aktivierung von Astrozyten teilweise abhängig von der Gegenwart stimulierter bzw. aktivierter Mikroglia ist (Brown et al., 1996; Brown et al., 1998; Herms et al., 1997), die proinflammatorische Zytokine und andere lösliche Faktoren sezernieren (Peyrin et al., 1999). IL-1 und IL-6 zählen hierbei vermutlich zu den wichtigsten Stimulatoren für die Aktivierung und Proliferation von Astrozyten (Hafiz et al., 2000; Schultz et al., 2004).

Wie bereits erwähnt, kann auch eine direkte Interaktion von PrP^{Sc} und Astrozyten in deren Aktivierung und Proliferation resultieren (Forloni et al., 1994; Florio et al., 1996; Lasmezas et al., 1996; Fioriti et al., 2007). In dieser Arbeit konnte im Vorfeld der Infektionsversuche gezeigt werden, dass die Scavenger-Rezeptoren CD36 und SR-A auch von aktivierten Astrozyten exprimiert werden und damit auch an der direkten Interaktion von PrP^{Sc} und Astrozyten beteiligt sein könnten, wie es zuvor auch für A β schon vermutet wurde (Wyss-Coray et al., 2003). Durch die Defizienz beider Rezeptoren könnte damit die direkte Aktivierung der Astrozyten durch PrP^{Sc} gehemmt werden. Um die Ergebnisse zur Astrozytenaktivierung weiter zu untermauern, wurde die Expression der astrozytär exprimierten Chemokine CXCL10 und CXCL13 in den CD36/SR-A^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen

analysiert. Während der Scrapie-Infektion konnte in früheren Studien eine starke Überexpression dieser Chemokinen beobachtet werden (Riemer et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich hingegen eine deutlich verminderte Expression beider Chemokine in den CD36/SR-A^{-/-}-Tieren in der asymptomatischen Phase der Infektion im Vergleich zu den Kontrolltieren (Diagramm 10). Diese Ergebnisse korrelieren gut mit der anfänglich verminderten Aktivierung der Astrozyten bei den CD36/SR-A^{-/-}-Tieren.

Die Unterschiede zwischen den CD36/SR-A-Knockout-Tieren und den Wildtyp-Kontrollen konnten zum terminalen Krankheitszeitpunkt nicht mehr festgestellt werden (Abb. 27, Diagramm 5), was wiederum mit der Mikrogliaaktivierung in Einklang steht. Die Einzel-Knockout-Tiere wiesen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen ebenfalls eine gleich starke Astrozytose auf (Abb. 27, Diagramm 5).

Zusammengefasst zeigte sich sowohl bei der Mikro- als auch der Astrogliose eine deutliche Kooperativität der beiden Scavenger-Rezeptoren CD36 und SR-A, da nur in den doppelt-defizienten Tieren eine verminderte Glia-Aktivierung feststellbar war. In späten Krankheitsstadien waren diese Unterschiede nicht mehr zu sehen, d. h. offenbar wird im Verlauf der Prion-Infektion des ZNS die CD36/SR-A-Defizienz durch andere Faktoren kompensiert werden.

5.1.2.3 Der Grad der Vakuolisierung des Hirngewebes ist von CD36/SR-A unabhängig

Eines der neuropathologischen Charakteristika von TSE stellt die Vakuolisierung des Hirngewebes dar. Diese spongiformen Veränderungen des Gewebes entsprechen sowohl Vakuolen im Neuropil als auch einer intraneuronalen Vakuolenbildung in Nervenzellen (Liberski, 1992; Mallucci, 2003). Die molekularen Mechanismen, die zur Vakuolisierung führen, sind allerdings noch nicht bekannt.

Die CD36/SR-A^{-/-}-Mäuse sowie die Einzel-Knockouts zeigten im Vergleich zu den Wildtypen keine Unterschiede im Grad der Vakuolisierung zu beiden untersuchten Krankheitszeitpunkten (Abb. 28 und 29, Diagramm 6 und 7). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass der Neuronenverlust während des Krankheitsverlaufes nicht unmittelbar mit einer fortschreitenden Vakuolisierung verbunden ist (Jeffrey et al., 1995; Giese et al., 2001). Auch nicht-„pathologische“ Neuronen weisen teilweise Vakuolisierungen des Perikaryon, Axons und der Dendriten auf, was wiederum für degenerierende Neuronen nicht immer der Fall ist (Jeffrey et al., 1992; Jeffrey et al., 1995). Zudem ist es gerade im frühen Krankheitsstadium von TSE-Erkrankungen oftmals schwierig zwischen Krankheits-assoziierten Vakuolen sowie Fixierungsartefakten im nicht-infizierten Tier und durch Scrapie verursachte Vakuolen zu unterscheiden (Liberski et al., 1989).

5.1.2.4 Verminderte PrP^{Sc}-Ablagerung und gleichzeitig verkürzte Überlebenszeiten bei CD36/SR-A-Knockout-Mäusen

Die Pathogenesemechanismen bzw. die entscheidenden Parameter, die die neuronale Schädigung bei Prion-Infektionen des ZNS bedingen, sind bislang nur unzureichend aufgeklärt. In dieser Arbeit

wurde zunächst davon ausgegangen, dass die Überlebenszeiten den Einfluss der CD36/SR-A-Defizienz auf den Verlauf der Scrapie-Pathogenese widerspiegeln. Die CD36/SR-A^{-/-}-Mäuse starben aber nach der intrazerebralen Infektion im Durchschnitt 22 Tage früher als die Wildtypkontrolliere (Tabelle 1). Nach intraperitonealer Infektion starben sie ebenfalls früher. Hier lag der Unterschied im Durchschnitt je nach infektiöser Dosis bei 18 bzw. 31 Tagen (Tabelle 1). Dies ist durchaus überraschend, da alle vorangegangenen Untersuchungen, vor allem die in der asymptomatischen Phase der Infektion, eher einen verzögerten Verlauf der Erkrankung vermuten ließen.

Bezüglich der Befunde zur peripheren Infektion fällt vor allem die Diskrepanz zwischen der Ablagerung von PrP^{Sc} in der Milz und den Überlebenszeiten auf. CD36/SR-A^{-/-}-Mäuse wiesen hier in frühen Infektionsstadien wesentlich weniger PrP^{Sc} auf als die Wildtyp-Kontrollen (Abb. 19 und 21). Interessanterweise konnte durch Infektionsversuche in tga20-Mäusen gezeigt werden, dass der Prion-Titer in Milzen von CD36/SR-A^{-/-}-Mäusen bzw. den Wildtyp-Kontrollen sich jedoch allenfalls nur geringfügig unterscheidet (Tabelle 2). Dies könnte bedeuten, dass die Ablagerung von PrP^{Sc} in der Milz kein gutes Maß für die Prion-Replikation in der Milz bzw. für die Effizienz der sich daran anschließenden Neuroinvasion darstellt. Letztlich ist also aufgrund der nahezu unveränderten Prion-Titer davon auszugehen, dass der für die Überlebenszeiten wesentliche Schritt nach peripherer Infektion, die Neuroinvasion bzw. der Befall des ZNS, in Wildtyp- bzw. KO-Mäusen etwa gleich schnell abgelaufen ist. Im Prinzip ähnliche Ergebnisse sind auch nach Behandlung mit Heparan-Mimetika zur Hemmung der peripheren Prion-Replikation erhalten worden. Die Therapie reduzierte zwar die Ablagerung von PrP^{Sc} in der Milz deutlich, hatte jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Überlebenszeiten (Larramendy-Gozalet al., 2007). Über welchen Mechanismus sich die CD36/SR-A-Defizienz auf die Ablagerung von PrP^{Sc} in der Milz auswirkt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Bislang konnte gezeigt werden, dass das lymphoretikuläre System (LRS), zu dem auch die Milz gehört, eine entscheidende Rolle bei der peripheren Prion-Replikation und Akkumulation von PrP^{Sc} spielt. Die Replikation findet vor allem in den PrP^C-exprimierenden follikulären dendritischen Zellen (FDC's) der Milz statt (Kitamoto et al., 1991). Aber auch dendritische Zellen (DC's) könnten Orte der Prion-Replikation darstellen (Shlomchik et al., 2001; Prinz et al., 2002; Aucouturier et al., 2001) und als „Transporter“ für PrP^{Sc} vom LRS in das ZNS fungieren (Aucouturier et al., 2002). Möglicherweise wird das Fehlen von CD36/SR-A durch verstärkte Expression anderer Scavenger-Rezeptoren kompensiert, die sich anfänglich über eine schnellere Beseitigung und damit einhergehend mit einer verzögerten Akkumulation von PrP^{Sc} darstellt, ohne jedoch die eigentliche Neuroinvasion entscheidend zu beeinflussen.

Die verkürzten Überlebenszeiten der CD36/SRA-defizienten Mäuse nach intracerebraler Inokulation erscheinen zunächst gleichermaßen paradox, da wiederum in den KO-Tieren im asymptomatischen Stadium deutlich weniger PrP^{Sc} nachzuweisen war als in den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen (Abb. 15). Dass der Krankheitsverlauf nach einer Prion-Infektion des ZNS jedoch nicht zwingend mit der Ablagerung von PrP^{Sc} korreliert, ist bereits mehrfach beschrieben worden (Lasmézas et al., 1997; Barron et al., 2007). Zum Zusammenhang zwischen der Umfaltung von PrP^C in PrP^{Sc} und der Pathogenese von Prion-Infektionen des ZNS sind drei Möglichkeiten zur Diskussion gestellt worden: 1. (loss of function) Die andauernde Konversion in PrP^{Sc} führt zu einer Depletion von PrP^C und damit zu einem Verlust möglicherweise protektiver Funktionen dieses Proteins. 2. (direct gain of function)

PrP^{Sc} ist direkt neurotoxisch. 3. (indirect gain of function) PrP^{Sc} bewirkt eine Aktivierung von Mikro- bzw. Astroglia, die mit verstärkter Sezernierung von pro-inflammatorischen Faktoren (z. B. Zytokine, Chemokine) und neurotoxischen Faktoren einhergeht bzw. ein neurotoxisches Milieu schafft. Grundsätzlich schließen sich diese drei Möglichkeiten gegenseitig nicht aus - alle drei Prinzipien könnten also zum letztlich lethalen Krankheitsverlauf beitragen. Komplizierend kommt hinzu, dass neben dem relativ einfach detektierbaren Proteinase K-resistentem PrP^{Sc} ein Kontinuum von Faltungsintermediaten zu erwarten ist, die wiederum in unterschiedlicher Weise zum Krankheitsgeschehen beitragen könnten. Insbesondere ist nicht bekannt welche PrP^{Sc}-Faltungsintermediate eine direkt neurotoxische Aktivität aufweisen. Die geringere PrP^{Sc}-Ablagerung bei gleichzeitig verkürzten Überlebenszeiten in den CD36/SR-A^{-/-}-Mäusen scheint im vorliegenden Modell formal eher für eine indirekte denn direkte Neurotoxizität des PrP^{Sc} zu sprechen.

Die mögliche „indirekte“ Neurotoxizität ist im Zusammenhang mit der Glia-Aktivierung zu diskutieren. Anfänglich weisen die Prion-infizierten CD36/SR-A^{-/-}-Mäuse eine geringere Gliose (Abb. 24 und 26, Diagramm 2,4 und 8) und verminderte Chemokin-Expression auf (Abb. 35, Diagramm 10). Im terminalen Krankheitsstadium zeigt sich jedoch vor allem für Lysozym M und CCL3 eine deutliche erhöhte Expression im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen (Diagramm 9 und 10). Dies deutet darauf hin, dass im späten Krankheitsstadium bestimmte Aspekte der Glia-Aktivierung in den KO-Mäusen stärker de-reguliert sind. Interessanterweise ist in der Pathogenese der Sandhoff-Krankheit, für die eine zentralnervöse Neurodegeneration charakteristisch ist, dem Chemokin CCL3 bereits eine pathogene Rolle zugeschrieben worden (Wu et al., 2004). Die Überexpression des Chemokins induzierte hier die Infiltration von Monozyten in das ZNS, was letztendlich zur Apoptose von Neuronen und beschleunigten neurodegenerativen Prozessen führte. CCL3-defiziente Mäuse wiesen dementsprechend längere Überlebenszeiten auf als Wildtypiere.

Zusammengefasst wird in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Scavenger Rezeptoren CD36 und SR-A zumindest die frühe Gliose sowie die Akkumulation von PrP^{Sc} beeinflussen. Die verkürzten Überlebenszeiten der CD36/SRA-defizienten Mäuse weisen prinzipiell auf eine protektive Funktion und Kooperativität dieser Rezeptoren hin, da die entsprechenden Einzel-Defizienzen keine oder nur geringere Auswirkungen hatten.

Ausblick

An der Erkennung von fehlgefalteteten Proteinen wie z.B. A β oder PrP^{Sc} partizipieren möglicherweise eine ganze Reihe von Scavenger-Rezeptoren. D.h. es ist wahrscheinlich, dass Funktionen von CD36 bzw. SR-A von anderen Rezeptoren mit überlappenden bzw. ähnlichen Funktionen ausgeübt werden können (Redundanz). Da für einige in Frage kommende Rezeptoren ebenfalls KO-Mäuse verfügbar sind, könnten diese ebenfalls im Prion-Modell untersucht werden. Für ein besseres Verständnis der Beteiligung von Scavenger-Rezeptoren an der Bindung und Aufnahme von PrP^{Sc} wären auch gut charakterisierte *in vitro*-Modelle wünschenswert. Zelllinien, die PrP^{Sc} aufnehmen können, könnten auf Expression der verschiedenen Scavenger-Rezeptoren untersucht werden. Durch Verwendung

entsprechender siRNAs und/oder durch Einsatz blockierender Antikörper könnte anschließend der Teilbeitrag verschiedener Rezeptoren in diesem Prozeß untersucht werden. Die verkürzten Überlebenszeiten der CD36/SRA-defizienten Mäuse trotz initial geringerer Belastung mit Proteinase K-resistentem PrP^{Sc} könnte darauf hinweisen, dass in diesen Tieren vermehrt PK-sensitive PrP^{Sc}-Faltungsintermediate auftreten, die „toxischere“ Eigenschaften aufweisen. Diese Hypothese könnte durch Reinigung, Quantifizierung und Charakterisierung solcher Intermediate überprüft werden (Pastrana et al., 2006).

5.2 CXCL13

5.2.1 Expression und Funktion von CXCL13 im ZNS

CXCL13 wird in der Peripherie sehr stark von einer Reihe verschiedener dendritischer Zellen exprimiert (Gunn et al., 1998; Vissers et al., 2001). Es vermittelt die Migration von B-Lymphozyten in die Follikel der sekundären lymphatischen Organe und somit die Entwicklung von B-Zell-Follikeln (Hjelmström 2000, Legler 1998; Vissers et al., 2001). Als Rezeptoren für CXCL13 fungieren CXCR5 und CXCR3 (Jenh et al., 2001; Legler et al., 1998). Im ZNS ist CXCL13 bislang kaum untersucht worden. Eine mögliche pathogene Rolle wurde dem Chemokin allerdings in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) zugesprochen (Ludmila et. al., 2006). EAE wird als Tiermodell für Multiple Sklerosis (MS) genutzt. CXCL13 wird im ZNS EAE-erkrankter Tiere überexprimiert und seine Expression wird im Verlauf der Erkrankung weiter hochreguliert (Ludmila et al., 2006; Krumbholz et al., 2006). Die Expression korreliert mit der Anwesenheit von T- und B-Zellen, was eine Beteiligung von CXCL13 an der Rekrutierung dieser Zellen in das erkrankte ZNS vermuten lässt. Gestützt wird diese Annahme von der Tatsache, dass ein Rezeptor für CXCL13, CXCR5, auf fast allen B-Zellen sowie auf einer Subpopulation von T-Zellen in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) exprimiert wird (Kim et al., 2001).

Welche Rolle CXCL13 bei anderen inflammatorischen Erkrankungen des ZNS bzw. bei transmissiblen spongiformen Enzephalopathien spielt, ist unklar. Es konnte in vorherigen Studien bereits festgestellt werden, dass es während der Scrapie-Pathogenese im ZNS stark überexprimiert wird (Riemer et al., 2000). Durch eine quantitative real-time PCR wurde dies im Rahmen dieser Arbeit bestätigt (Diagramm 11). Eine mögliche Funktion von CXCL13 während dieser Erkrankung ist aber bislang unbekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CXCL13 im ZNS vorwiegend von Astrozyten exprimiert wird (Abb. 32). Zudem wurde im Verlauf einer Scrapie-Infektion eine deutliche Zunahme der CXCL13-Expression nachgewiesen (Abb. 31). Die immunhistologischen Untersuchungen zeigten im gesunden Gehirn eine schwache basale Expression des CXCL13-Proteins im Hippocampus, Kleinhirn und Corpus Callosum (Abb. 30). Im Scrapie-infizierten Gehirn waren hingegen alle Hirnregionen CXCL13-positiv (Abb. 31, D und H), was gut mit der ausgeprägten Astrozytose korreliert. Interessanterweise konnte im murinen Morbus Alzheimer-Modell eine Ko-Lokalisation von CXCL13-exprimierenden Astrozyten mit Amyloid-Plaques beobachtet werden (Abb. 34, C). Dies könnte darauf hinweisen, dass hier über CXCL13 weitere Zellen an den Ort einer entzündlichen Reaktion dirigiert werden. Außerdem könnte CXCL13 die Infiltration von T-Zellen in das

ZNS vermitteln, wie sie im Gehirn von Scrapie-infizierten Mäusen und im Gehirn von CJD-Patienten beobachtet wurde (Lewicki et al., 2003). Auch an der Migration von dendritischen Zellen in das ZNS könnte CXCL13 beteiligt sein (Ambrosini et al., 2005). Die Scrapie-Infektion von CXCR5-defizienten Mäusen zeigte jedoch keinen Unterschied zu entsprechenden Wildtypkontrollen, d. h. ein Krankheitsrelevanter Einfluss von CXCL13 müsste in diesem Modell über den alternativen Rezeptor CXCR3 vermittelt werden (Prinz et al., 2003), der im ZNS von Astrozyten, Mikroglia und Neuronen exprimiert wird (Flynn et al., 2003; Biber et al., 2002). Tatsächlich zeigen CXCR3-defiziente Mäuse im murinen Scrapie-Modell deutlich verlängerte Überlebenszeiten, was für eine schädliche Rolle dieses Chemokin-Rezeptors und dessen Liganden in der chronischen Neurodegeneration spricht (Dr. M. Baier, unveröffentlichte Ergebnisse).

5.2.2 Generierung und Charakterisierung von CXCL13-transgenen Mäuse

Um mehr über die biologische Funktion von CXCL13 im ZNS und seine mögliche Rolle in der Scrapie-Pathogenese herauszufinden, wurden im Rahmen dieser Arbeit CXCL13-transgene Mäuse generiert. Hierfür wurden Konstrukte hergestellt (Abb. 37), die sich beispielsweise durch ihre Kozak-Sequenz aber auch durch ihre 3'UTR (untranslated region) unterschieden. Diese Konstrukte wurden zuvor in der Zellkultur mithilfe eines ELISAs auf ihre Protein-Expression getestet. Hierbei ergab sich für das Konstrukt pBLC400v eine extrem erhöhte CXCL13-Expression nach 48 h (Diagramm 12). Dieses Konstrukt beinhaltet eine veränderte bzw. optimierte Kozak-Sequenz und eine verkürzte 3' UTR. Diese Veränderungen der Sequenz führten offensichtlich zu einer Erhöhung der Translationseffizienz. Konstrukte, die nur eine der beiden Veränderungen aufwiesen, zeigten hingegen eine geringere CXCL13-Expression und für die unveränderte CXCL13-mRNA konnte nur eine minimale Basalexpression detektiert werden (Diagramm 12).

Die Translationseffizienz kann durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst werden. Zu diesen Faktoren zählt unter anderem die Cap-Struktur (7-Methylguanosin-Kappe), die den Transport der fertigen mRNA in das Cytoplasma erleichtert und die mRNA vor dem Abbau vom 5'-Ende her schützt (Kozak, 1987). Zudem hat sie eine entscheidende Funktion bei der Initiation der Translation bei Eukaryoten, da hier die 40S-Untereinheit des Ribosoms bindet. Letzteres beginnt schließlich am AUG-Initiationscodon mit der Translation. Allerdings wird das AUG-Triplett nur effizient erkannt, wenn es sich im richtigen Kontext befindet. Für diese Sequenzumgebung scheint eine sogenannte Konsensus-Sequenz optimal zu sein, die auch als Kozak-Sequenz bezeichnet wird. Sie sieht folgende Zusammensetzung vor: CC RCC AUG G (R, Adenin- oder Guanin-Baustein) (Kozak, 1981). Die unterstrichenen Positionen sind für die Translationseffizienz besonders wichtig. Abweichungen von dieser Sequenz reduzieren hingegen die Translationshäufigkeit. In diesem Fall wurde die vorhandene Sequenz (GC AGA AUG A) wie folgt optimiert: CC ACC AUG A. Es kann also angenommen werden, dass der Basenaustausch zur Optimierung der flankierenden Regionen des AUG Initiationscodons zu einer Erhöhung der Translationseffizienz führte.

Weitere regulatorische Elemente der Translation eukaryotischer mRNA sind die relative Position des Startcodons zum 5' Ende der mRNA und mRNA-Sekundärstrukturen im 5'-Nichtkodierungsbereich (5'

UTR) (Kozak, 1987). Letztere können eine Anlagerung der 40S-Ribosomen-Untereinheit unterdrücken. Sie verzögern somit die Ausbildung eines Initiationskomplexes.

Aber nicht nur die 5' UTR beeinflusst die Effizienz der Translation. Auch in der 3' UTR befinden sich Kontrollfunktionen, die mit der mRNA-Struktur assoziiert sind. Diese Funktionen beinhalten Translationskontrolle, mRNA-Stabilität oder intrazelluläre Lokalisation und werden hauptsächlich durch die Interaktion spezifischer Sequenzen und transständigen RNA-Bindungsproteinen vermittelt. Die häufigsten Motive für RNA/Protein Wechselwirkungen sind die RGG Box (Arginin- und Glycin-reiche Region), Zinkfinger und AU-reiche Elemente (Ostarek-Lederer et al., 1994).

Das Vorkommen einer AU-reichen Sequenz ist ein Merkmal mancher instabiler mRNAs. Diese Sequenz umfasst etwa 50 Basen (genannt ARE) und seine Konsensussequenz ist das Pentanucleotid AUUUA, das in mehrfacher Wiederholung vorliegt und vermutlich eine in zwei Stufen erfolgende Destabilisierung der mRNA auslöst. Eine Entfernung der 3'UTR führt aber nicht zwangsläufig zu einer Stabilisierung der mRNA, da noch weitere Destabilisierungselemente vorhanden sein können, beispielsweise im Bereich des offenen Leserahmens. Allerdings konnte gezeigt werden, dass das Einfügen einer AU-reichen 3'UTR oft zu einer Destabilisierung von sonst langlebigen mRNAs führt.

Im Falle des hier generierten Konstruktes pBLC400v konnte anscheinend durch eine Verkürzung der 3' UTR eine höhere Stabilität vermittelt werden. Es kann angenommen werden, dass durch diese Veränderung der Sequenz Destabilisierungselemente entfernt wurden. Zusammen mit der optimierten Kozak-Sequenz konnte eine gesteigerte Translationseffizienz und somit eine erhöhte Expression von CXCL13 erreicht werden.

Mithilfe des Konstrukts pBCL400v wurden schließlich transgene Mäuse generiert. Durch die Pronuclei-Methode wurde die DNA in die Eizellen injiziert und wieder in die Tiere eingebracht (Abb. 39). Bei dieser Methode kann die injizierte DNA im gesamten Genom integrieren, auch an Orten, die nicht transkribiert bzw. translatiert werden. Außerdem besteht immer die Möglichkeit, dass die DNA überhaupt nicht integriert. Mehrere Faktoren spielen hier eine Rolle. Zum einen die Reinheit der DNA, die eingeführt wird, aber auch der Zustand der Eizellen. Um eine mögliche Integration nachzuweisen, wurden die Nachkommen mithilfe der PCR genotypisiert (Abb. 40). Nachdem die Integration der DNA nachgewiesen wurde, wurde die Expression von CXCL13 im Gehirn der transgenen Mäuse überprüft. Zum einen wurde die mRNA-Expression mithilfe einer quantitativen real-time PCR ermittelt. Und zum anderen mithilfe eines ELISAs, bei dem Hirnhomogenat verwendet wurde, um die Protein-Expression zu überprüfen. Die QPCR aber auch der ELISA ergaben eine deutlich erhöhte Expression von CXCL13 in den transgenen Tieren gegenüber Wildtyp-Kontrollen (Diagramm 13 und 14). Dies lässt sich sicherlich auf die Optimierung des Konstruktes, aber auch auf eine optimale Integration von pBLC400v in das Genom dieser Tiere zurückführen. Trotz der CXCL13-Überexpression zeigten die transgenen Tiere keinerlei phänotypische Auffälligkeiten. Gegen Ende des praktischen Teils dieser Arbeit wurden transgene Tiere in Scrapie-Infektionsexperimenten eingesetzt. Diese ersten Infektionsstudien zeigten, dass die CXCL13-transgenen Mäuse im Durchschnitt 18 Tage früher starben als die Wildtypkontrollen (Tabelle 3). Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass die Expression von CXCL13, die während der Scrapie-Infektion stark hochreguliert wird, einen Beitrag zum Krankheitsgeschehen leisten kann. Entsprechende Chemokin-Rezeptor Antagonisten könnten daher zur Verlangsamung des Krankheitsverlaufs von therapeutischem Interesse sein.

Ausblick

Die CXCL13-transgenen Mäuse stellen ein sehr gut geeignetes System für weitere Untersuchungen zur Funktion dieses Chemokins und der Konsequenzen von dessen Überexpression im ZNS dar. Neben der eingehenden Charakterisierung der Prion-Infektion dieser Tiere bieten sich nun auch andere Maus-Modelle für akute und chronische Neurodegeneration (z. B. Schlaganfall, EAE, Alzheimer) für weiterführende Untersuchungen an.

6 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Expression von CD36 und SR-A im uninfizierten und Scrapie-infizierten Gehirn und der Einfluss dieser Scavenger-Rezeptoren auf eine Prion-Infektion des ZNS in einem murinen Scrapie-Modell untersucht.

Die immunhistologischen Untersuchungen ergaben, dass die Scavenger Rezeptoren CD36 und SR-A im gesunden Gehirn nur schwach bzw. gar nicht exprimiert werden. Während der Prion-Infektion findet jedoch eine Induktion der Expression statt. Durch eine Doppelfärbung mit GFAP, einem Astrozytenmarker, konnte gezeigt werden, dass CD36 und SR-A von aktivierten Astrozyten im ZNS exprimiert werden. Anschließend wurden CD36-, SR-A, und CD36/SR-A-Knockout-Mäuse sowie entsprechende Wildtyp-Kontrollen mit Scrapie infiziert und eingehend in verschiedenen Stadien der Erkrankung charakterisiert. Untersuchte Parameter waren die Überlebenszeiten der Tiere, die Astrozyten- und Mikrogliaaktivierung, die Ablagerung von PrP^{Sc} in Gehirn und Milz sowie die spongiformen Veränderungen im infizierten Hirngewebe. Bei den Infektionsversuchen ergaben sich signifikant verkürzte Überlebenszeiten für die CD36/SR-A^{-/-}-Mäuse. Weiterhin im asymptomatischen Krankheitsstadium war bei den CD36/SR-A^{-/-}-Mäusen eine verminderte Astrozyten- und Mikrogliaaktivierung immunhistochemisch als auch in real-time QPCR-Analysen im Vergleich zu den Kontrolltieren festzustellen. Vor allem überraschte angesichts der verkürzten Überlebenszeiten der CD36/SR-A^{-/-}-Mäuse die verringerte PrP^{Sc}-Ablagerung in Gehirn und Milz der Tiere in frühen Krankheitsstadien. Zusammengefasst weisen die Befunde darauf hin, dass die Scavenger Rezeptoren CD36 und SR-A einen Einfluss auf die frühe Gliose sowie die Akkumulation von PrP^{Sc} haben. Die verkürzten Überlebenszeiten der CD36/SR-A-defizienten Mäuse weisen auf eine protektive Funktion und Kooperativität dieser Rezeptoren hin, während die entsprechenden Einzel-Defizienzen keine oder nur geringere Auswirkungen hatten.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit dem Chemokin CXCL13. Die Expressionsanalysen bzgl. CXCL13 ergaben, dass das Chemokin im ZNS vorwiegend von aktivierten Astrozyten exprimiert wird. Zudem konnte eine verstärkte Expression von CXCL13 im Verlauf einer Scrapie-Infektion im ZNS nachgewiesen werden. Um mehr über die biologische Funktion von CXCL13 im ZNS und seine mögliche Rolle in der Scrapie-Pathogenese herauszufinden, wurden CXCL13-transgene Mäuse generiert, in denen das Chemokin unter der Kontrolle des Astrozyten-spezifischen GFAP-Promotors exprimiert werden sollte. Mittels QPCR und ELISA wurde in CXCL13-transgenen Tieren gegenüber den Wildtyp-Kontrollen eine deutlich erhöhte CXCL13-Expression nachgewiesen, was jedoch nicht von phänotypischen Auffälligkeiten begleitet war. CXCL13-transgene Mäuse starben nach einer Scrapie-Infektion im Durchschnitt 18 Tage früher als die Wildtypkontrollen. Die Überexpression von CXCL13 führt also eindeutig zu einem schnelleren Verlauf der Erkrankung. Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass die Expression von CXCL13, die während der Scrapie-Infektion stark hochreguliert wird, einen Beitrag zum Krankheitsgeschehen leisten kann. Daher wäre eine Prüfung des Effekts von entsprechenden Chemokin-Rezeptor-Antagonisten im Hinblick auf die Therapie sinnvoll.

6.1 Summary

In the first part of this study the expression of CD36 and SR-A in uninfected and scrapie-infected brain tissue was analyzed. Furthermore, the influence of these scavenger receptors on a prion infection of the CNS was characterized in a murine model system.

The results obtained by immunohistochemistry showed that CD36 and SR-A are expressed only weakly, if at all, in the healthy brain. However, during the prion infection a marked induction of the expression was observed. Double-staining with GFAP, a marker for activated astrocytes, showed for both scavenger receptors an expression by activated astrocytes. The scrapie infection of CD36-, SR-A- and CD36/SR-A-deficient mice as well as appropriate wild type control mice was compared and studied in detail at various time points. Analysed parameters were the survival times of the animals, the activation of astrocytes and microglia, the degree of spongiform changes in the infected brain, and the accumulation of PrP^{Sc} in the CNS and spleen. Scrapie infections demonstrated significant shortened survival times of CD36/SR-A-deficient mice. Moreover, these knockout mice showed a reduced astrocytosis and reduced activation of microglia in comparison to wild type controls in the asymptomatic stage of the disease. These results were obtained by immunohistochemistry and real-time qPCR analysis. Surprisingly, the PrP^{Sc} deposition in brains and spleens of CD36/SR-A-deficient mice was reduced in the asymptomatic stage despite the shortened survival times. Overall, these findings indicate that the scavenger receptors CD36 and SR-A have an influence on the early gliosis as well as the accumulation of PrP^{Sc}. The shortened survival times of the double knockouts point towards a protective function and cooperativity of these receptors, whereas deficiency for just one receptor had less or no effects on the disease development.

The second part of the study concerned the chemokine CXCL13. Expression analysis indicated that this chemokine is mainly expressed by activated astrocytes in the CNS, which is strongly increased during a prion infection. To find out more about the biological function of CXCL13 in the CNS and its possible role during scrapie diseases transgenic mice were generated, which express CXCL13 under the control of the astrocyte-specific GFAP-promoter. By means of qPCR and ELISA a clearly increased CXCL13 expression could be detected in the transgenic mice compared to wild type controls. This was however not accompanied by obvious phenotypical changes. Scrapie-infected CXCL13-transgenic mice died on average 18 days earlier than wild type controls. Hence, overexpression of CXCL13 clearly accelerates disease progression. This result demonstrates that CXCL13 expression, which is upregulated during a prion infection, contributes to the scrapie pathogenesis. Consequently, analysing corresponding chemokine receptor antagonists in terms of therapeutics could be useful.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin-Complex	OAS	2'-5'-Oligo-A-Synthetase
AEC	2,3-Amino-9-Ethylcarbazol	OD	Optische Dichte
AD	Alzheimer Disease	PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
AK	Antikörper	PCR	polymerase chain reaction
AS	Aminosäure	PET	Paraffin-embedded tissue blot
bp	Basenpaar	PK	Proteinase K
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- phosphate	PrP	Prion-Protein
BSA	bovine serum albumin	PrP^C	Zelluläres Prion-Protein
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie	PrP^{Sc}	Infektiöses Prion-Protein
CJD	Creutzfeldt-Jakob Disease	RNA	Ribonukleinsäure
C-Terminus	Carboxy-Terminus	RNase	Ribonuklease
CWD	Chronic Wasting Disease	rpm	rotations per minute
DC	Dendritic Cells (Dendritische Zellen)	RT	Raumtemperatur
DEPC	Diethylpyrocarbonat	RT	Reverse Transkriptase
DMF	Dimethylformamid	SAF	Scrapie-assoziierte Fibrillen
DNA	Desoxyribonukleinsäure	sCJD	Sporadic Creutzfeld-Jakob- Disease
dpi	days post infection (Tage nach Infektion)	SDS	sodium dodecyl sulfate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	SOD	Superoxiddismutase
EEG	Elektroenzephalographie	TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
EtBr	Ethidiumbromid	TG	Transgen
FCS	fetal calf serum (Fetales Kälberserum)	T_M	Mittlere Schmelztemperatur
FDC	follicular dendritic cells (follikuläre dendritische Zellen)	TME	Transmissible Mink Enzephalopathie
FFI	Fatale Familiäre Insomnie	TNF	Tumornekrosefaktor
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
GSS	Gerstmann-Sträussler- Scheinker-Syndrom	TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
i.c.	Intracerebral	U	Unit (spezifische Enzymaktivität)

i.p.	Intraperitoneal	ÜN	über Nacht
kb	Kilobase	UV	Ultraviolettes Licht
kD	Kilodalton	Val	Valin
KO	Knockout	vCJD	neue Variante Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
Met	Methylin	WT	Wildtyp
MOPS	3-N-(Morpholino)-propansulfonsäure	X-Gal	5-bromo-4-chloro-1-indol- β -D-galactosid
N-Terminus	Amino-Terminus	ZNS	Zentrales Nervensystem

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Scrapie bei Schafen und Ziegen	1
Abbildung 2	Kuru beim Menschen	4
Abbildung 3	Schematische Darstellung der Biosynthese und posttranslationalen Modifikation des zellulären Prion-Proteins	5
Abbildung 4	Das zelluläre Prion-Protein PrP ^C und seine pathologische Isoform PrP ^{Sc}	6
Abbildung 5	Scavenger-Rezeptoren-Familien	11
Abbildung 6	Chemokin-Familien	13
Abbildung 7	Wirkungsmechanismus des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green in einer real-time QPCR-Reaktion	39
Abbildung 8	Transfektion mit Lipofectamine TM 2000	47
Abbildung 9	Transfektion mit pEGFP-N1	48
Abbildung 10	Das Plasmid pBLC400v	50
Abbildung 11	Expression von CD36 im ZNS	52
Abbildung 12	CD36-Expression im ZNS	53
Abbildung 13	Expression von SR-A im ZNS	54
Abbildung 14	SR-A-Expression im ZNS	54
Abbildung 15	PET-Blot-Analyse zur Ablagerung von PrP ^{Sc} bei den Knockout-Mäusen im Vergleich zu den C57Bl/6-Kontrolltieren zum Zeitpunkt 125 dpi	57
Abbildung 16	PET-Blot-Analyse zur Ablagerung von PrP ^{Sc} bei den Knockout-Mäusen im Vergleich zu den C57Bl/6-Kontrolltieren zum terminalen Krankheitszeitpunkt	58
Abbildung 17	PrP ^{Sc} -Ablagerung in der Milz SR-A-defizienter Tiere im Vergleich zu den Wildtypkontrollen zu den Zeitpunkten 30 und 60 dpi	59
Abbildung 18	PrP ^{Sc} -Ablagerung in der Milz CD36-defizienter Tiere im Vergleich zu den Wildtypkontrollen zu den Zeitpunkten 30 und 60 dpi	59
Abbildung 19	PrP ^{Sc} -Ablagerung in der Milz CD36/SR-A-defizienter Tiere im Vergleich zu den Wildtypkontrollen zu den Zeitpunkten 30 und 60 dpi	60
Abbildung 20	PrP ^{Sc} -Ablagerung in der Milz zum Zeitpunkt 100 dpi	60
Abbildung 21	PET-Blot-Analyse der PrP ^{Sc} -Ablagerung in Milzen zum Zeitpunkt 60 dpi	61

Abbildung 22	Immunpräzipitation von PrP ^{Sc} mit dem Antikörper 15B3	62
Abbildung 23	PrP ^{Sc} -Ablagerung in dendritischen Zellen nach PrP ^{Sc} -Infektion	64
Abbildung 24	Iba-1-Expression in den Knockout-Mäusen im Vergleich zu C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im asymptomatischen Stadium der Infektion	66
Abbildung 25	Iba-1-Expression in den Knockout-Mäusen im Vergleich zu C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im terminalen Stadium der Infektion	68
Abbildung 26	Expression von GFAP in den Knockout-Mäusen im Vergleich zu C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im asymptomatischen Stadium der Infektion	70
Abbildung 27	Expression von GFAP in den Knockout-Mäusen im Vergleich zu C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im terminalen Stadium der Infektion	72
Abbildung 28	Vakuolisierung des Gewebes der Knockout-Mäuse im Vergleich zu C57Bl/6-Kontrolltieren zum asymptomatischen Krankheitszeitpunkt 125 dpi	74
Abbildung 29	Vakuolisierung des Gewebes der Knockout-Mäuse im Vergleich zu C57Bl/6-Kontrolltieren zum terminalen Krankheitszeitpunkt	76
Abbildung 30	Expression von CXCL13 in nicht-infiziertem Hirngewebe	81
Abbildung 31	Untersuchung der CXCL13-Expression in Scrapie-infiziertem Hirngewebe anhand einer Zeitreihe	82
Abbildung 32	CXCL13-Expression im ZNS	83
Abbildung 33	Expression von CXCL13 im murinen BSE-Modell	83
Abbildung 34	Expression von CXCL13 in APP23 transgenen Mäusen	84
Abbildung 35	Untersuchung der CXCL13-Expression in CD36/SR-A-Knockout-Mäusen im asymptomatischen Stadium der Infektion	85
Abbildung 36	Untersuchung der CXCL13-Expression in CD36/SR-A-Knockout-Mäusen im terminalen Stadium der Infektion	86
Abbildung 37	Herstellung der CXCL13-Konstrukte	87
Abbildung 38	Untersuchung der Transformanden mittels PCR	88
Abbildung 39	Generierung transgener Mäuse	90
Abbildung 40	Genotypisierung der Mäuse mittels PCR	90
Abbildung 41	Sequenz der murinen CXCL13 mRNA	112
Abbildung 42	Sequenz des Expressionskonstruktes pBLC400v	113
Abbildung 43	Vektorkarte von pBLC400v	115
Abbildung 44	Sequenz des Expressionsvektors pEGFP-N1	115
Abbildung 45	Vektorkarte des Expressionsvektors pEGFP-N1	117

7.3. Diagrammverzeichnis

Diagramm 1	Übersicht zu den Überlebenszeiten der Scrapie-infizierten Knockout-Mäuse und C57Bl/6-Kontrolltiere	56
Diagramm 2	Vergleich der Aktivierung der Mikroglia zwischen SR-A-, CD36-, CD36/SR-A-Knockout-Mäusen, C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im asymptomatischen Stadium der Infektion	65
Diagramm 3	Vergleich der Aktivierung der Mikroglia zwischen SR-A-, CD36-, CD36/SR-A-Knockout-Mäusen, C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im terminalen Stadium der Infektion	67
Diagramm 4	Vergleich der Aktivierung von Astrozyten zwischen SR-A-, CD36-, CD36/SR-A-Knockout-Mäusen, C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im asymptomatischen Stadium der Infektion	71
Diagramm 5	Vergleich der Aktivierung von Astrozyten zwischen SR-A-, CD36-, CD36/SR-A-Knockout-Mäusen, C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im terminalen Stadium der Infektion	73
Diagramm 6	Vergleich der Vakuolisierung zwischen SR-A-, CD36-, CD36/SR-A-Knockout-Mäusen, C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im asymptomatischen Stadium der Infektion	75
Diagramm 7	Vergleich der Vakuolisierung zwischen SR-A-, CD36-, CD36/SR-A-Knockout-Mäusen, C57Bl/6-Kontrolltieren und Negativkontrollen im terminalen Stadium der Infektion	75
Diagramm 8	Expressionsanalyse der Gene GFAP, Iba-1 und Galektin-3 in den CD36/SR-A-Knockout-Tieren im Vergleich zum Wildtyp	78
Diagramm 9	Quantitative Analyse der OAS-, Lysozym M- und RAGE-Expression in den CD36/SR-A-Knockout-Mäusen	79
Diagramm 10	Quantitative Analyse der CXCL10-, CXCL13-, CCL5- und CCL3-Expression in den CD36/SR-A-Knockout-Tieren	80
Diagramm 11	CXCL13-ELISA von Zellüberständen nach der Transfektion	89
Diagramm 12	Expressionsanalyse von CXCL13 in CXCL13-transgenen Mäusen mittels real-time QPCR	91
Diagramm 13	CXCL13-ELISA zur Untersuchung der CXCL13-Expression in CXCL13-transgenen Mäusen	92

7.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Überlebenszeiten (dpi) der Scrapie-infizierten SR-A-, CD36- und CD36/SR-A-Knockout-Tiere sowie der C57Bl/6-Kontrolltiere	55
Tabelle 2	Überlebensdaten (dpi) von tga20-Mäusen nach Verimpfung von Milzhomogenaten zur Ermittlung der Infektiosität.	63
Tabelle 3	Überlebensdaten (dpi) der Scrapie-infizierten CXCL13-transgenen Tiere sowie der C57Bl/6-Kontrolltiere	95

7.5 Sequenzen und Vektorkarten

7.5.1 CXCL13

Für die Herstellung der CXCL13 Konstrukte wurde die Sequenz der murinen CXCL13 mRNA verwendet (blau/grün). Die Kozak-Sequenz (rot) wurde in zwei der Konstrukte modifiziert. Dabei fand folgender Basenaustausch statt: GGC AGA → GCC ACC. Zusätzlich wurde in zwei Konstrukten die 3'UTR verkürzt, wobei der grün unterlegte Sequenzabschnitt entfiel.

```

1  GAGCTAAAGG TTGAACTCCA CCTCCAGGCA GAATGAGGCT CAGCACAGCA ACGCTGCTTC
61  TCCTCCTGGC CAGCTGCCTC TCTCCAGGCC ACGGTATTCT GGAAGCCCAT TACACAAACT
121 TAAAATGTAG GTGTTCTGGA GTGATTTCAA CTGTTGTCGG TCTAAACATC ATAGATCGGA
181 TTCAAGTTAC GCCCCCTGGG AATGGCTGCC CCAAAGTGA AGTTGTGATC TGGACCAAGA
241 TGAAGAAAGT TATATGTGTG AATCCTCGTG CCAAATGGTT ACAAAGATTA TTAAGACATG
301 TCCAAAGCAA AAGTCTGTCT TCAACTCCCC AAGCTCCAGT GAGTAAGAGA AGAGCTGCCT
361 GAAGCCACTA TCATCTCAA AGACACACCT GCACCTTTTT TTTTATCCCT GCTCTGAATT
421 TTAGATATGT TCTTAGTTAA AGAATTTCCA AGAAAATAAC TCCCCTCTAC AAACAAACAT
481 GACTGTAGGT AAAACAAAGC AAAAACAAAC AAGCAAACAA ACAAACTAAA AAAAACCCAA
541 TCCTGCAGGA GCTGAGAGGG AATGCTCAAG CTCCGTTGCA TACCCAACCC ACATCCTTGT
601 TCCTTAAGAA AGGCTATTTG AGAACAGGCA TTTAGTGACA ACCCACTTCA GATGCATGTG
661 GTAATAGATC TGTTGTTTAA TGTTAAACTA TCCTAGATTG TCGAGGAATG AAAAACTAC
721 ATGTCAAATG TGAAC TTGTA GCTCGTACTA ACAAGAGGTT TGCGAGATGG ACTTCAGTTA
781 TTTTGCACCC TTGTAAAACG CAGGCTTCCA AAATAGTCTC CAGAAGGTTT CTGGGAAGCT
841 GGTGCAATGC CATCATGAGG TGGTGCAAAG CAGGTCTCCT TTAGAGAAAA GCTTCTGGG
901 GGAAACAGTC CTACTTTGAA AGGTTGCTTG TATAAGATTT ATTGTCTTGC ATTAAAACCA
961 GTAACAATTG AAAGATCCTC AGCTTAAAGG TCCAGGCTCT TCAGCAGTAT ACAAATATAT
1021 TCCTTTGCAC TGTGACCCTG ATGATCTATT TTTATTATTC ATATTTTCA CACAGACAAA
1081 ATACCAGCCT CTTGTATCAG ATTCTTTAAT GTTTCCTATT CATTTGGTGT CATCAATAA
1141 ATGTAATCAA ATGTTTTGCT TA

```

Abbildung 41: Sequenz der murinen CXCL13 mRNA. Die Sequenz wurde zur Herstellung der Expressionskonstrukte verwendet (www.ncbi.nlm.nih.gov).

7.5.2 pBLC400v

Das Expressionskonstrukt pBLC400v enthielt eine GFAP-Promotor-Expressionskassette (grün). Das klonierte CXCL13-Gen (blau) besaß eine modifizierte Kozak-Sequenz (rot) und eine verkürzte 3'UTR. Das Vektorgerüst (schwarz) bildete der Expressionsvektor pEGFP-1 (Clontech, Mountain View/USA).

1 TAGTTATTAC TAGCGCTACC GGACTCAGAT CTGAGCTCCC ACCTCCCTCT CTGTGCTGGG
 61 ACTCACAGAG GGAGACCTCA GGAGGCAGTC TGTCCATCAC ATGTCCAAAT GCAGAGCATA
 121 CCCTGGGCTG GGCGCAGTGG CGCACAACCTG TAATTCCAGC ACTTTGGGAG GCTGATGTGG
 181 AAGGATCACT TGAGCCCAGA AGTTCTAGAC CAGCCTGGGC AACATGGCAA GACCCTATCT
 241 CTACAAAAAA AGTTAAAAAA TCAGCCACGT GTGGTGACAC ACACCTGTAG TCCCAGCTAT
 301 TCAGGAGGCT GAGGTGAGGG GATCACTTAA GGCTGGGAGG TTGAGGCTGC AGTGAGTCGT
 361 GGTTGCGCCA CTGCACTCCA GCCTGGGCAA CAGTGAGACC CTGTCTCAA AGACAAAAAA
 421 AAAAAA AAAAAGAA CATATCCTGG TGTGGAGTAG GGGACGCTGC TCTGACAGAG
 481 GCTCGGGGGC CTGAGCTGGC TCTGTGAGCT GGGGAGGAG CAGACAGCCA GGCCTTGTCT
 541 GCAAGCAGAC CTGGCAGCAT TGGGCTGGCC GCCCCCAGG GCCTCCTCTT CATGCCCAGT
 601 GAATGACTCA CTTTGGCACA GACACAATGT TCGGGGTGGG CACAGTGCCT GCTTCCC GCC
 661 GCACCCAGC CCCCCTCAA TGCCCTCCGA GAAGCCCAT T GAGCAGGGGG CTTGCATTGC
 721 ACCCCAGCCT GACAGCCTGG CATCTTGGGA TAAAAGCAGC ACAGCCCCCT AGGGGCTGCC
 781 CTTGCTGTGT GGCGCCACCG GCGGTGGAGA ACAAGGCTCT ATTCAGCCTG TGCCAGGAA
 841 AGGGGATCAG GGGATGCCCA GGCATGGACA GTGGGTGGCA GGGGGGAGG GGAGGGCTGT
 901 CTGCTTCCCA GAAGTCCAAG GACACAAATG GGTGAGGGGA CTGGGCAGGG TTCTGACCCT
 961 GTGGGACCAG AGTGGAGGGC GTAGATGGAC CTGAAGTCTC CAGGGACAAC AGGGCCAGG
 1021 TCTCAGGCTC CTAGTTGGGC CCAGTGGCTC CAGCGTTTCC AAACCCATCC ATCCCAGAG
 1081 GTTCTTCCCA TCTCTCCAGG CTGATGTGTG GGAAC TCGAG GAAATAAATC TCCAGTGGGA
 1141 GACGGAGGGG TGGCCAGGGA AACGGGGCGC TGCAGGAATA AAGACGAGCC AGCACAGCCA
 1201 GCTCATGTGT AACGGCTTTG TGGAGCTGTC AAGGCCTGGT CTCTGGGAGA GAGGCACAGG
 1261 GAGGCCAGAC AAGGAAGGGG TGACCTGGAG GGACAGATCC AGGGGCTAAA GTCCTGATAA
 1321 GGCAAGAGAG TGCCGGCCCC CTCTTGCCCT ATCAGGACCT CCACTGCCAC ATAGAGGCCA
 1381 TGATTGACCC TTAGACAAAG GGCTGGTGTG CAATCCCAGC CCCAGCCCC AGAACTCCAG
 1441 GGAATGAATG GGCAGAGAGC AGGAATGTGG GACATCTGTG TTCAAGGGA GGACTCCAGG
 1501 AGTCTGCTGG GAATGAGGCC TAGTGAAGAA TGAGGTGGCC CTTGAGGGTA CAGAACCAGT
 1561 TCATTCTTCG CCAAATTCCC AGCACCTTGC AGGCACTTAC AGCTGAGTGA GATAATGCCCT
 1621 GGGTTATGAA ATCAAAAAGT TGGAAAGCAG GTCAGAGGTC ATCTGGTACA GCCCTTCCCTT
 1681 CCCTTTTTTT TTTTTTTTTT TTGTGAGACA AGGTCTCTCT CTGTTGCCCA GGCTGGAGTG
 1741 GCGCAAACAC AGCTCACTGC AGCCTCAACC TACTGGGCTC AAGCAATCCT CCAGCCTCAG
 1801 CCTCCCAAAG TGCTGGGATT ACAAGCATGA GCCACCCAC TCAGCCCTTT CCTTCTTTT
 1861 TAATTGATGC ATAATAATTG TAAGTATTCA TCATGGTCCA ACCAACCCTT TCTTGACCCA
 1921 CCTTCTAGA GAGAGGGTCC TCTTGCTTCA GCGGTGAGG CCCAGACCC ATGGTCTGGC
 1981 TCCAGGTACC ACCTGCCTCA TGCAGGAGTT GCGGTGCCCA GGAAGCTCTG CCTCTGGGCA
 2041 CAGTGACCTC AGTGGGGTGA GGGGAGCTCT CCCCATAGCT GGGCTGCGGC CCAACCCAC
 2101 CCCCTCAGGC TATGCCAGGG GGTGTTGCCA GGGGCACCCG GGCATCGCCA GTCTAGCCA
 2161 CTCCTTCATA AAGCCCTCGC ATCCCAGGAG CGAGCAGAGC CAGAGCAGGA TGGAGAGGAG
 2221 ACGCATCACC TCCGCTGCTC GCCGCTCCTA CGTCTCCTCA GGGGAGATGA TGGTGGGGGG
 2281 CCTGGCTCCT GGCCGCGCTC TGGGTCTCTG CACCCGCTC TCCCTGGCTC GAATGCCCCC
 2341 TCCACTCCCG ACCCGGGTGG ATTTCTCCCT GGCTGGGGCA CTCAATGCTG GCTTCAAGGA
 2401 GACCCGGGCT AGTGAGCGGG CAGAGATGAT GGAGCTCAAT GACCGCTTTG CCAGCTACAT
 2461 CGAGAAGGTT CGCTTCTTGG AACAGCAAAA CAAGGCGCTG GCTGCTGAGC TGAACCAGCT
 2521 GCGGGCCAA GAGCCACCA AGCTGGCAGA CGTCTACCAG GCTGAGCTGC GAGAGCTGCG
 2581 GCTGCGGCTC GATCAACTCA CCGCCAACAG CGCCCGCTG GAGGTTGAGA GGACAATCT
 2641 GGCACAGGAC CTGGCCACTG TGGTTCGACG TACCGCGGGC CCGGGATCCG AGCTAAAGGT
 2701 TGAACTCACC TCCAGGCAGA ATGAGGCTCA GCACAGCAAC GCTGCTTCTC CTCTGGCCA
 2761 GCTGCCTCTC TCCAGGCCAC GGTATTCTGG AAGCCATTA CACAAACTTA AAATGTAGGT
 2821 GTTCTGGAGT GATTTCAACT GTTGTGCGTC TAAACATCAT AGATCGGATT CAAGTTACGC
 2881 CCCCTGGGAA TGGCTGCCCC AAAACTGAAG TTGTGATCTG GACCAAGATG AAGAAAAGTTA
 2941 TATGTGTGAA TCCTCGTGCC AAATGGTTAC AAAGATTATT AAGACATGTC CAAAGCAAAA
 3001 GTCTGTCTTC AACTCCCCAA GCTCCAGTGA GTAAGAGAAG AGCTGCCTGA AGCCACTATC
 3061 ATCTCAAAAG ACACACCTGC ACCTTTTTTT TTATCCCTGC TCTGAATTTT AGATATGTTT
 3121 GCGGCCGCGC CGGACTCTA GATCATAATC AGCCATACCA CATTTGTAGA GGTTF TACTT
 3181 GCTTTAAAAA ACCTCCCACA CCTCCCCCTG AACCTGAAAC ATAAAAATGAA TGCAATTGTT
 3241 GTTGTTAACT TGTTTATTGC AGCTTATAAT GGTTACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAAT
 3301 TTCACAAATA AAGCATTTTT T TCACTGCAT TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA ACTCATCAAT
 3361 GTATCTTAAG GCGTAAATTG TAAGCGTTAA TATTTTGTTA AAATTCGCGT TAAATTTTTG
 3421 TTAATCAGC TCATTTTTTA ACCAATAGGC CGAAATCGGC AAAATCCCTT ATAAATCAAA
 3481 AGAATAGACC GAGATAGGGT TGAGTGTGT TCCAGTTTGG AACAAGAGTC CACTATTA
 3541 GAACGTGGC TCCAACGTCA AAGGGCGAAA AACCGTCTAT CAGGGCGATG GCCACTACG
 3601 TGAACCATCA CCCTAATCAA GTTTTTTGGG GTCGAGGTGC CGTAAAGCAC TAAATCGGAA
 3661 CCCTAAAGGG AGCCCCGAT TTAGAGCTTG ACGGGGAAAG CCGGCGAACG TGGCGAGAAA

```

3721 GGAAGGGAAG AAAGCGAAAG GAGCGGGCGC TAGGGCGCTG GCAAGTGTAG CGGTCACGCT
3781 GCGCGTAACC ACCACACCCG CCGCGCTTAA TGCGCCGCTA CAGGGCGCGT CAGGTGGCAC
3841 TTTTCGGGGA AATGTGCGCG GAACCCCTAT TTGTTTATTT TTCTAAATAC ATTCAAATAT
3901 GTATCCGCTC ATGAGACAAT AACCCGTGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA AAAGGAAGAG
3961 TCCTGAGGCG GAAAGAACCA GCTGTGGAAT GTGTGTCAGT TAGGGTGTGG AAAGTCCCCA
4021 GGCTCCCCAG CAGGCAGAAG TATGCAAAGC ATGCATCTCA ATTAGTCAGC AACCAGGTGT
4081 GGAAAGTCCC CAGGCTCCCC AGCAGGCAGA AGTATGCAA GCATGCATCT CAATTAGTCA
4141 GCAACCATAG TCCCCGCCCT AACTCCGCC ATCCCCCCCC TAACTCCGCC CAGTTCCGCC
4201 CATTCTCCGC CCCATGGCTG ACTAATTTTT TTTATTTATG CAGAGGCCGA GGCCGCTCG
4261 GCCTCTGAGC TATTCAGAA GTAGTGAGGA GGCTTTTTTG GAGGCCTAGG CTTTTGCAAA
4321 GATCGATCAA GAGACAGGAT GAGGATCGTT TCGCATGATT GAACAAGATG GATTGCACGC
4381 AGGTTCTCCG GCCGCTTGGG TGGAGAGGCT ATTCGGCTAT GACTGGGCAC AACAGACAAT
4441 CGGCTGCTCT GATGCCGCCG TGTTCCGGCT GTCAGCGCAG GGGCGCCCCG TTTCTTTTGT
4501 CAAGACCGAC CTGTCCGGTG CCCTGAATGA ACTGCAAGAC GAGGCAGCGC GGCTATCGTG
4561 GCTGGCCACG ACGGGCGTTC CTTGCGCAGC TGTGCTCGAC GTTGTCACTG AAGCGGGAAG
4621 GGACTGGCTG CTATTGGGCG AAGTGCCGGG GCAGGATCTC CTGTCACTC ACCTTGCTCC
4681 TGCCGAGAAA GTATCCATCA TGGCTGATGC AATGCGGCGG CTGCATACGC TTGATCCGGC
4741 TACCTGCCCA TTCGACCACC AAGCGAAACA TCGCATCGAG CGAGCACGTA CTCGGATGGA
4801 AGCCGGTCTT GTCGATCAGG ATGATCTGGA CGAAGAGCAT CAGGGGCTCG CGCCAGCCGA
4861 ACTGTTCCGC AGGCTCAAGG CGAGCATGCC CGACGGCGAG GATCTCGTCG TGACCCATGG
4921 CGATGCCTGC TTGCCGAATA TCATGGTGGA AAATGGCCGC TTTTCTGGAT TCATCGACTG
4981 TGGCCGGCTG GGTGTGGCGG ACCGCTATCA GGACATAGCG TTGGCTACCC GTGATATTGC
5041 TGAAGAGCTT GGCGGCGAAT GGGCTGACCG CTTCTCGTG CTTTACGGTA TCGCCGCTCC
5101 CGATTGCGAG CGCATCGCCT TCTATCGCCT TCTTGACGAG TTCTTCTGAG CGGGACTCTG
5161 GGGTTCGAAA TGACCGACCA AGCGACGCC AACCTGCCAT CACGAGATTT CGATTCCACC
5221 CCGCCTTCT ATGAAAGGTT GGGCTTCGGA ATCGTTTTCC GGGACGCCG CTGGATGATC
5281 CTCCAGCCG GGGATCTCAT GCTGGAGTTC TTCGCCCACC CTAGGGGGAG CTAAGTAAAG
5341 ACACGGAAGG AGACAATACC GGAAGGAACC CGCGCTATGA CGGCAATAAA AAGACAGAAT
5401 AAAACGCACG GTGTTGGGTC GTTTGTTCAT AAACGCGGGG TTCGGTCCCA GGGCTGGCAC
5461 TCTGTGATA CCCCACCGAG ACCCCATTGG GGCCAATACG CCCGCGTTTC TTCTTTTCC
5521 CCACCCACC CCCCAGTTC GGGTGAAGGC CCAGGGCTCG CAGCCAACGT CGGGGCGGCA
5581 GGCCCTGCCA TAGCCTCAGG TTAATCATAT ATACTTTAGA TTGATTTAAA ACTTCATTTT
5641 TAATTTAAAA GGATCTAGGT GAAGATCCTT TTTGATAATC TCATGACCAA AATCCCTTAA
5701 CGTGAGTTTT CGTTCCACTG AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTGA
5761 GATCCTTTTT TTCTGCGCGT AATCTGCTGC TTGCAAACAA AAAAAACCACC GCTACCAGCG
5821 GTGGTTTGTT TGCCGGATCA AGAGCTACCA ACTCTTTTTT CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC
5881 AGAGCGCATG AACCAAATAC TGTCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG
5941 AACTCTGTAG CACCGCCTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTTACCAGT GGCTGCTGCC
6001 AGTGGCGATA AGTCGTGTCT TACCGGGTTG GACTCAAGAC GATAGTTACC GGATAAGGCG
6061 CAGCGGTCCG GCTGAACGGG GGGTTGCTGC ACACAGCCCA GCTTGGAGCG AACGACCTAC
6121 ACCGAACTGA GATACCTACA GCGTGAGCTA TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA
6181 AAGGCGGACA GGTATCCGGT AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT
6241 CCAGGGGGA ACGCCTGGTA TCTTTATAGT CCTGTCCGGT TTCGCCACCT CTGACTTGAG
6301 CGTCGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT GGAAAAACGC CAGCAACGCG
6361 GCCTTTTTTAC GGTTCCCTGGC CTTTTGCTGG CTTTTGCTC ACATGTTCTT TCCTGCGTTA
6421 TCCCCTGATT CTGTGGATAA CCGTATTACC GCCATGCAT

```

Abbildung 42: Sequenz des Expressionskonstruktes pBLC400v.

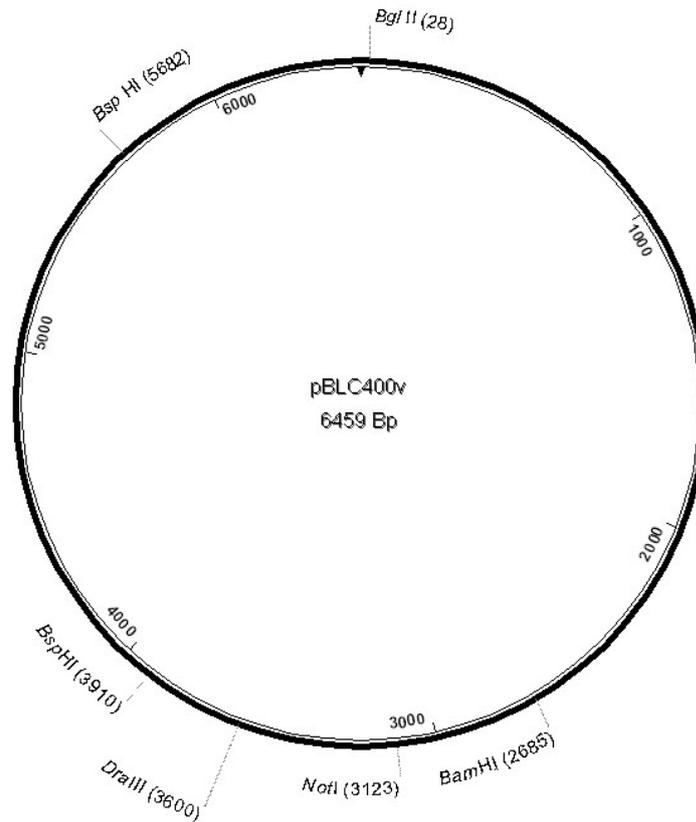


Abbildung 43: Vektorkarte von pBLC400v. Eingezeichnet sind die Schnittstellen der zur Klonierung, Verifizierung und Linearisierung verwendeten Restriktionsendonukleasen.

7.5.3 pEGFP-N1

Der Expressionsvektor pEGFP-N1 wurde als Kontrollvektor bei der Transfektion der humanen Gliomazelllinie SNB19 verwendet.

```

1 TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA TGGAGTTCCG
61 CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCCAACGACC CCCGCCCATF
121 GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA
181 ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAAC TGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC
241 AAGTACGCCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT ATGCCAGTA
301 CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGCCA GTACATCTAC GTATTAGTCA TCGCTATTAC
361 CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA TAGCGGTTTG ACTCACGGGG
421 ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG
481 GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT
541 ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTGG TTTAGTGAAC CGTCAGATCC GCTAGCGCTA
601 CCGGACTCAG ATCTCGAGCT CAAGCTTCGA ATTCTGCAGT CGACGGTACC GCGGGCCCGG
661 GATCCACCGG TCGCCACCAT GGTGAGCAAG GGCGAGGAGC TGTTACCCGG GGTGGTGCCC
721 ATCCTGGTCG AGCTGGACGG CGACGTAAAC GGCCACAAGT TCAGCGTGTC CGGCGAGGGC
781 GAGGGCGATG CCACCTACGG CAAGCTGACC CTGAAGTTCA TCTGCACCAC CGGCAAGCTG
841 CCCGTGCCCT GGCCCACCCT CGTGACCACC CTGACCTACG GCGTGCAAGT CTTAGCCCG
901 TACCCCGACC ACATGAAGCA GCACGACTTC TTCAAGTCCG CCATGCCCGA AGGCTACGTC
961 CAGGAGCGCA CCATCTTCTT CAAGGACGAC GGCAACTACA AGACCCGCGC CGAGGTGAAG
1021 TTCGAGGGCG ACACCCTGGT GAACCGCATC GAGCTGAAGG GCATCGACTT CAAGGAGGAC
1081 GGCAACATCC TGGGGCACAA GCTGGAGTAC AACTACAACA GCCACAACGT CTATATCATG
1141 GCCGACAAGC AGAAGAACGG CATCAAGGTG AACTTCAAGA TCCGCCACAA CATCGAGGAC
1201 GGCAGCGTGC AGCTCGCCGA CCACTACCAG CAGAACACCC CCATCGGCGA CCGCCCCGTG
1261 CTGCTGCCCC ACAACCACTA CCTGAGCACC CAGTCCGCCC TGAGCAAAGA CCCCAACGAG

```

```

1321 AAGCGCGATC ACATGGTCCT GCTGGAGTTC GTGACCGCCG CCGGGATCAC TCTCGGCATG
1381 GACGAGCTGT ACAAGTAAAG CGGCCGCGAC TCTAGATCAT AATCAGCCAT ACCACATTTG
1441 TAGAGGTTTT ACTTGCTTTA AAAAACTCC CACACCTCCC CCTGAACCTG AAACATAAAA
1501 TGAATGCAAT TGTTGTTGTT AACTTGTTTA TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA
1561 ATAGCATCAC AAATTTTACA AATAAAGCAT TTTTTTCACT GCATTCTAGT TGTGGTTTGT
1621 CCAAACATCAT CAATGTATCT TAAGGCGTAA ATTGTAAGCG TTAATATTTT GTTAAAAATC
1681 GCGTTAAATT TTTGTTAAAT CAGCTCATTT TTTAACCAAT AGGCCGAAAT CGGCAAAATC
1741 CCTTATAAAT CAAAAGAATA GACCGAGATA GGGTTGAGTG TTGTTCCAGT TTGGAACAAG
1801 AGTCCACTAT TAAAGAACGT GGACTCCAAC GTCAAAAGGC GAAAAACCGT CTATCAGGGC
1861 GATGGCCAC TACGTGAACC ATCACCTAA TCAAGTTTTT TGGGGTCGAG GTGCCGTAAA
1921 GCACTAAATC GGAACCCTAA AGGGAGCCCC CGATTTAGAG CTTGACGGGG AAAGCCGGCG
1981 AACGTGGCGA GAAAGGAAGG GAAGAAAGCG AAAGGAGCGG GCGCTAGGGC GCTGGCAAGT
2041 GTAGCGGTCA CGCTGCGCGT AACCACCACA CCCGCCGCGC TTAATGCGCC GCTACAGGGC
2101 GCGTCAGGTG GCACTTTTCG GGGAAATGTG CGCGGAACCC CTATTTGTTT ATTTTTCTAA
2161 ATACATTCAA ATATGTATCC GCTCATGAGA CAATAACCTT GATAAATGCT TCAATAATAT
2221 TGAAAAGGA AGAGTCTGA GCGGAAAGA ACCAGCTGTG GAATGTGTGT CAGTTAGGGT
2281 GTGGAAAGTC CCCAGGCTCC CCAGCAGGCA GAAGTATGCA AAGCATGCAT CTCAATTAGT
2341 CAGCAACCAG GTGTGGAAAG TCCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC
2401 ATCTCAATTA GTCAGCAACC ATAGTCCCGC CCCTAACTCC GCCCATCCCG CCCCTAACTC
2461 CGCCAGTTC CGCCATTCT CCGCCCCATG GCTGACTAAT TTTTTTTTATT TATGCAGAGG
2521 CCGAGGCCGC CTCGGCCTCT GAGCTATTCC AGAAGTAGTG AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC
2581 TAGGCTTTTG CAAAGATCGA TCAAGAGACA GGATGAGGAT CGTTTCGCAT GATTGAACAA
2641 GATGGATTGC ACGCAGGTTT TCCGGCCGCT TGGGTGGAGA GGCTATTCGG CTATGACTGG
2701 GCACAACAGA CAATCGGCTG CTCTGATGCC GCCGTGTTCC GGCTGTCAGC GCAGGGGCGC
2761 CCGGTTCTTT TTGTCAAGAC CGACCTGTCC GGTGCCCTGA ATGAACTGCA AGACGAGGCA
2821 GCGCGCTAT CGTGGCTGGC CACGACGGCC GTTCCTTGCG CAGCTGTGCT CGACGTTGTC
2881 ACTGAAGCGG GAAGGGACTG GCTGCTATTG GGCGAAGTGC CGGGGCAGGA TCTCTGTCA
2941 TCTCACCTTG CTCCTGCCGA GAAAGTATCC ATCATGGCTG ATGCAATGCG GCGGCTGCAT
3001 ACGCTTGATC CGGCTACCTG CCCATTTCGAC CACCAAGCGA AACATCGCAT CGAGCGAGCA
3061 CGTACTCGGA TGGAAGCCGG TCTTGTGCGAT CAGGATGATC TGGACGAAGA GCATCAGGGG
3121 CTCGCGCCAG CCGAACTGTT CGCCAGGCTC AAGGCGAGCA TGCCCGACGG CGAGGATCTC
3181 GTCGTGACCC ATGGCGATGC CTGCTTGCCG AATATCATGG TGGAAAATGG CCGCTTTTCT
3241 GGATTCATCG ACTGTGGCCG GCTGGGTGTG GCGGACCGCT ATCAGGACAT AGCGTTGGCT
3301 ACCCGTGATA TTGCTGAAGA GCTTGGCGGC GAATGGGCTG ACCGCTTCCT CGTGCTTTAC
3361 GGTATCGCCG CTCCCATTTC GCAGCGCATC GCCTTCTATC GCCTTCTTGA CGAGTTCTTC
3421 TGAGCGGGAC TCTGGGGTTC GAAATGACCG ACCAAGCGAC GCCCAACCTG CCATCACGAG
3481 ATTTGATTC CACCGCCGCC TTCTATGAAA GGTTGGGCTT CGGAATCGTT TTCCGGGACG
3541 CCGGCTGGAT GATCCTCCAG CGCGGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTCGCC CACCCTAGGG
3601 GGAGGCTAAC TGAAACACGG AAGGAGACAA TACCGGAAGG AACCCGCGCT ATGACGGCAA
3661 TAAAAGACA GAATAAAACG CACGGTGTG GGTCGTTTGT TCATAAACGC GGGGTTCCGGT
3721 CCCAGGGCTG GCACTCTGTC GATACCCAC CGAGACCCCA TTGGGGCAA TACGCCCGCG
3781 TTTCTTCCTT TTCCCCACCC CACCCCCCAA GTTCGGGTGA AGGCCAGGG CTCGCAGCCA
3841 ACGTCGGGGC GGCAGGCCCT GCCATAGCCT CAGGTTACTC ATATATACTT TAGATTGATT
3901 TAAAACCTCA TTTTAAATTT AAAAGGATCT AGGTGAAGAT CCTTTTGTAT AATCTCATGA
3961 CAAAATCCC TTAACGTGAG TTTTCGTTCC ACTGAGCGTC AGACCCCGTA GAAAAGATCA
4021 AAGGATCTTC TTGAGATCCT TTTTTTCTGC GCGTAATCTG CTGCTTGCAA ACAAAAAAAC
4081 CACCGCTACC AGCGGTGGTT TGTTTGCCGG ATCAAGAGCT ACCAACTCTT TTTCCGAAGG
4141 TAACTGGCTT CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTCTT TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG
4201 GCCACCACTT CAAGAACTCT GTAGCACCGC CTACATACTT CGCTCTGCTA ATCCTGTTAC
4261 CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC GATAAGTCGT GTCTTACCGG GTTGGACTCA AGACGATAGT
4321 TACCGGATAA GGCGCAGCGG TCGGGCTGAA CGGGGGGTTT GTGCACACAG CCCAGCTTGG
4381 AGCGAACGAC CTACACCGAA CTGAGATACC TACAGCGTGA GCTATGAGAA AGCGCCACGC
4441 TTCCCGAAGG GAGAAAGGCG GACAGGTATC CGGTAAGCGG CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC
4501 GCACGAGGGA GCTTCCAGGG GGAAACGCCT GGTATCTTTA TAGTCTGTC GGGTTTCGCC
4561 ACCTCTGACT TGAGCGTCGA TTTTTGTGAT GCTCGTCAGG GGGGCGGAGC CTATGGAAAA
4621 ACGCCAGCAA CGCGGCCTTT TTACGGTTCC TGGCCTTTTG CTGGCCTTTT GCTCACATGT
4681 TCTTTCCTGC GTTATCCCCT GATTCTGTGG ATAACCGTAT TACCGCCATG CAT

```

Abbildung 44: Sequenz des Expressionsvektors pEGFP-N1(www.clontech.com).

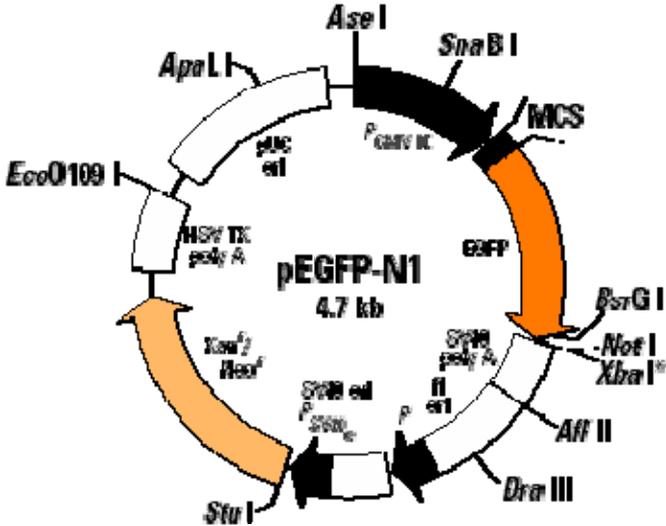


Abbildung 45: Vektorkarte des Expressionsvektors pEGFP-N1 (www.clontech.com).

8 Literaturverzeichnis

- Abbott, N.J., Ronnback, L. and Hansson, E.** (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 41-53.
- Acton, S.L., Scherer, P.E., Lodish, H.F. and Krieger, M.** (1994) Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem*, **269**, 21003-21009.
- Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H. and Inoue, K.** (1997) Expression cloning of a novel scavenger receptor from human endothelial cells. *J Biol Chem*, **272**, 31217-31220.
- Alarcon, R., Fuenzalida, C., Santibanez, M. and von Bernhardi, R.** (2005) Expression of scavenger receptors in glial cells. Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound beta-amyloid. *J Biol Chem*, **280**, 30406-30415.
- Ambrosini, E., Remoli, M.E., Giacomini, E., Rosicarelli, B., Serafini, B., Lande, R., Aloisi, F. and Coccia, E.M.** (2005) Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines in vitro and in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*, **64**, 706-715.
- Andersson, L. and Freeman, M.W.** (1998) Functional changes in scavenger receptor binding conformation are induced by charge mutants spanning the entire collagen domain. *J Biol Chem*, **273**, 19592-19601.
- Aucouturier, P. and Carnaud, C.** (2002) The immune system and prion diseases: a relationship of complicity and blindness. *J Leukoc Biol*, **72**, 1075-1083.
- Aucouturier, P., Geissmann, F., Damotte, D., Saborio, G.P., Meeker, H.C., Kascsak, R., Kascsak, R., Carp, R.I. and Wisniewski, T.** (2001) Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J Clin Invest*, **108**, 703-708.
- Baggiolini, M., Dewald, B. and Moser, B.** (1997) Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol*, **15**, 675-705.
- Baggiolini, M. and Moser, B.** (1997) Blocking chemokine receptors. *J Exp Med*, **186**, 1189-1191.
- Baggiolini, M., Moser, B. and Clark-Lewis, I.** (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. The Giles Filley Lecture. *Chest*, **105**, 95S-98S.
- Baker, C.A., Martin, D. and Manuelidis, L.** (2002) Microglia from Creutzfeldt-Jakob disease-infected brains are infectious and show specific mRNA activation profiles. *J Virol*, **76**, 10905-10913.

- Balkwill, F.** (1998) The molecular and cellular biology of the chemokines. *J Viral Hepat*, **5**, 1-14.
- Bamberger, M.E., Harris, M.E., McDonald, D.R., Husemann, J. and Landreth, G.E.** (2003) A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J Neurosci*, **23**, 2665-2674.
- Barron, R.M., Campbell, S.L., King, D., Bellon, A., Chapman, K.E., Williamson, R.A. and Manson, J.C.** (2007) High titers of transmissible spongiform encephalopathy infectivity associated with extremely low levels of PrP^{Sc} in vivo. *J Biol Chem*, **15**, 113-121
- Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A. and Schall, T.J.** (1997) A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, **385**, 640-644.
- Bell, M.D., Lopez-Gonzalez, R., Lawson, L., Hughes, D., Fraser, I., Gordon, S. and Perry, V.H.** (1994) Upregulation of the macrophage scavenger receptor in response to different forms of injury in the CNS. *J Neurocytol*, **23**, 605-613.
- Beringue, V., Demoy, M., Lasmezas, C.I., Gouritin, B., Weingarten, C., Deslys, J.P., Andreux, J.P., Couvreur, P. and Dormont, D.** (2000) Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *J Pathol*, **190**, 495-502.
- Biber, K., Dijkstra, I., Trebst, C., De Groot, C.J., Ransohoff, R.M. and Boddeke, H.W.** (2002) Functional expression of CXCR3 in cultured mouse and human astrocytes and microglia. *Neuroscience*, **112**, 487-497.
- Bird, D.A., Gillotte, K.L., Horkko, S., Friedman, P., Dennis, E.A., Witztum, J.L. and Steinberg, D.** (1999) Receptors for oxidized low-density lipoprotein on elicited mouse peritoneal macrophages can recognize both the modified lipid moieties and the modified protein moieties: implications with respect to macrophage recognition of apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6347-6352.
- Bons, N., Mestre-Frances, N., Belli, P., Cathala, F., Gajdusek, D.C. and Brown, P.** (1999) Natural and experimental oral infection of nonhuman primates by bovine spongiform encephalopathy agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4046-4051.
- Bornemann, K.D., Wiederhold, K.H., Pauli, C., Ermini, F., Stalder, M., Schnell, L., Sommer, B., Jucker, M. and Staufenbiel, M.** (2001) Abeta-induced inflammatory processes in microglia cells of APP23 transgenic mice. *Am J Pathol*, **158**, 63-73.

- Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C. and Aguzzi, A.** (1996a) Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature*, **379**, 339-343.
- Brandner, S., Raeber, A., Sailer, A., Blattler, T., Fischer, M., Weissmann, C. and Aguzzi, A.** (1996b) Normal host prion protein (PrPC) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13148-13151.
- Brown, D.R. and Mohn, C.M.** (1999) Astrocytic glutamate uptake and prion protein expression. *Glia*, **25**, 282-292.
- Brown, D.R., Nicholas, R.S. and Canevari, L.** (2002) Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J Neurosci Res*, **67**, 211-224.
- Brown, D.R., Schmidt, B. and Kretzschmar, H.A.** (1996a) A neurotoxic prion protein fragment enhances proliferation of microglia but not astrocytes in culture. *Glia*, **18**, 59-67.
- Brown, D.R., Schmidt, B. and Kretzschmar, H.A.** (1996b) Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*, **380**, 345-347.
- Brown, D.R., Wong, B.S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S.J. and Jones, I.M.** (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J*, **344 Pt 1**, 1-5.
- Brown, P.** (1988) The clinical neurology and epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease, with special reference to iatrogenic cases. *Ciba Found Symp*, **135**, 3-23.
- Brown, P. and Bradley, R.** (1998) 1755 and all that: a historical primer of transmissible spongiform encephalopathy. *Bmj*, **317**, 1688-1692.
- Brown, P., Wolff, A. and Gajdusek, D.C.** (1990) A simple and effective method for inactivating virus infectivity in formalin-fixed tissue samples from patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*, **40**, 887-890.
- Bruce, M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. and Bostock, C.J.** (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, **389**, 498-501.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M. and 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., Aguet, M. and Weissmann, C.** (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, **356**, 577-582.
- Bueler, H., Raeber, A., Sailer, A., Fischer, M., Aguzzi, A. and Weissmann, C.** (1994) High prion and PrPSc levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med*, **1**, 19-30.
- Campbell, I.L., Eddleston, M., Kemper, P., Oldstone, M.B. and Hobbs, M.V.** (1994) Activation of cerebral cytokine gene expression and its correlation with onset of reactive astrocyte and acute-phase response gene expression in scrapie. *J Virol*, **68**, 2383-2387.
- Carp, R.I. and Callahan, S.M.** (1982) Effect of mouse peritoneal macrophages on scrapie infectivity during extended in vitro incubation. *Intervirology*, **17**, 201-207.
- Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S. and Caramelli, M.** (2004) Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3065-3070.
- Caughey, B., Kocisko, D.A., Raymond, G.J. and Lansbury, P.T., Jr.** (1995) Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem Biol*, **2**, 807-817.
- Chastel, C.E.** (1996) BSE a specific bovine disease? *Nature*, **381**, 360.
- Chenevard, R., Hurlimann, D., Bechir, M., Enseleit, F., Spieker, L., Hermann, M., Riesen, W., Gay, S., Gay, R.E., Neidhart, M., Michel, B., Luscher, T.F., Noll, G. and Ruschitzka, F.** (2003) Selective COX-2 inhibition improves endothelial function in coronary artery disease. *Circulation*, **107**, 405-409.
- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J.M. and et al.** (1985) Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*, **315**, 331-333.
- Chiesa, R. and Harris, D.A.** (2001) Prion diseases: what is the neurotoxic molecule? *Neurobiol Dis*, **8**, 743-763.
- Christie, R.H., Freeman, M. and Hyman, B.T.** (1996) Expression of the macrophage scavenger receptor, a multifunctional lipoprotein receptor, in microglia associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, **148**, 399-403.

- Chung, H., Brazil, M.I., Irizarry, M.C., Hyman, B.T. and Maxfield, F.R.** (2001) Uptake of fibrillar beta-amyloid by microglia isolated from MSR-A (type I and type II) knockout mice. *Neuroreport*, **12**, 1151-1154.
- Collinge, J., Sidele, K.C., Meads, J., Ironside, J. and Hill, A.F.** (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, **383**, 685-690.
- Collins, P.D., Marleau, S., Griffiths-Johnson, D.A., Jose, P.J. and Williams, T.J.** (1995) Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med*, **182**, 1169-1174.
- Collis, S.C. and Kimberlin, R.H.** (1983) Further studies on changes in immunoglobulin G in the sera and CSF of Herdwick sheep with natural and experimental scrapie. *J Comp Pathol*, **93**, 331-338.
- Combs, C.K., Johnson, D.E., Cannady, S.B., Lehman, T.M. and Landreth, G.E.** (1999) Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of beta-amyloid and prion proteins. *J Neurosci*, **19**, 928-939.
- Come, J.H., Fraser, P.E. and 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.
- Coraci, I.S., Husemann, J., Berman, J.W., Hulette, C., Dufour, J.H., Campanella, G.K., Luster, A.D., Silverstein, S.C. and El-Khoury, J.B.** (2002) CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am J Pathol*, **160**, 101-112.
- Cotena, A., Gordon, S. and Platt, N.** (2004) The class A macrophage scavenger receptor attenuates CXC chemokine production and the early infiltration of neutrophils in sterile peritonitis. *J Immunol*, **173**, 6427-6432.
- Diedrich, J.F., Bendheim, P.E., Kim, Y.S., Carp, R.I. and Haase, A.T.** (1991) Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 375-379.
- Diringer, H., Beekes, M., Ozel, M., Simon, D., Queck, I., Cardone, F., Pocchiari, M. and Ironside, J.W.** (1997) Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size. *Intervirology*, **40**, 238-246.

- Djeu, J.Y., Matsushima, K., Oppenheim, J.J., Shiotsuki, K. and Blanchard, D.K.** (1990) Functional activation of human neutrophils by recombinant monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/IL-8. *J Immunol*, **144**, 2205-2210.
- Doi, T., Higashino, K., Kurihara, Y., Wada, Y., Miyazaki, T., Nakamura, H., Uesugi, S., Imanishi, T., Kawabe, Y., Itakura, H. and et al.** (1993) Charged collagen structure mediates the recognition of negatively charged macromolecules by macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem*, **268**, 2126-2133.
- Eddy, R.G.** (1995) Origin of BSE. *Vet Rec*, **137**, 648.
- El Khoury, J., Hickman, S.E., Thomas, C.A., Cao, L., Silverstein, S.C. and Loike, J.D.** (1996) Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature*, **382**, 716-719.
- El Khoury, J., Thomas, C.A., Loike, J.D., Hickman, S.E., Cao, L. and Silverstein, S.C.** (1994) Macrophages adhere to glucose-modified basement membrane collagen IV via their scavenger receptors. *J Biol Chem*, **269**, 10197-10200.
- El Khoury, J.B., Moore, K.J., Means, T.K., Leung, J., Terada, K., Toft, M., Freeman, M.W. and Luster, A.D.** (2003) CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J Exp Med*, **197**, 1657-1666.
- Eloit, M., Adjou, K., Couplier, M., Fontaine, J.J., Hamel, R., Lilin, T., Messiaen, S., Andreoletti, O., Baron, T., Bencsik, A., Biacabe, A.G., Beringue, V., Laude, H., Le Dur, A., Vilotte, J.L., Comoy, E., Deslys, J.P., Grassi, J., Simon, S., Lantier, F. and Sarradin, P.** (2005) BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec*, **156**, 523-524.
- Endemann, G., Stanton, L.W., Madden, K.S., Bryant, C.M., White, R.T. and Protter, A.A.** (1993) CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, **268**, 11811-11816.
- Endo, T., Groth, D., Prusiner, S.B. and Kobata, A.** (1989) Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry*, **28**, 8380-8388.
- Fairbairn, D.W., Carnahan, K.G., Thwaites, R.N., Grigsby, R.V., Holyoak, G.R. and O'Neill, K.L.** (1994) Detection of apoptosis induced DNA cleavage in scrapie-infected sheep brain. *FEMS Microbiol Lett*, **115**, 341-346.
- Fassbender, K., Walter, S., Kuhl, S., Landmann, R., Ishii, K., Bertsch, T., Stalder, A.K., Muehlhauser, F., Liu, Y., Ulmer, A.J., Rivest, S., Lentschat, A., Gulbins, E., Jucker, M., Staufenbiel, M., Brechtel, K., Walter, J., Multhaup, G., Penke, B., Adachi, Y., Hartmann,**

- T. and Beyreuther, K.** (2004) The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *Faseb J*, **18**, 203-205.
- Febbraio, M., Hajjar, D.P. and Silverstein, R.L.** (2001) CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*, **108**, 785-791.
- Febbraio, M., Podrez, E.A., Smith, J.D., Hajjar, D.P., Hazen, S.L., Hoff, H.F., Sharma, K. and Silverstein, R.L.** (2000) Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest*, **105**, 1049-1056.
- Fioriti, L., Angeretti, N., Colombo, L., De Luigi, A., Colombo, A., Manzoni, C., Morbin, M., Tagliavini, F., Salmona, M., Chiesa, R. and Forloni, G.** (2007) Neurotoxic and gliotrophic activity of a synthetic peptide homologous to Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease amyloid protein. *J Neurosci*. **27**, 1576-1583.
- Florio, T., Grimaldi, M., Scorziello, A., Salmona, M., Bugiani, O., Tagliavini, F., Forloni, G. and Schettini, G.** (1996) Intracellular calcium rise through L-type calcium channels, as molecular mechanism for prion protein fragment 106-126-induced astroglial proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, **228**, 397-405.
- Flynn, G., Maru, S., Loughlin, J., Romero, I.A. and Male, D.** (2003) Regulation of chemokine receptor expression in human microglia and astrocytes. *J Neuroimmunol*, **136**, 84-93.
- Folkman, J. and D'Amore, P.A.** (1996) Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*, **87**, 1153-1155.
- Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O. and Tagliavini, F.** (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*, **362**, 543-546.
- Foster, J.D., Hope, J. and Fraser, H.** (1993) Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet Rec*, **133**, 339-341.
- Fradkin, J.E., Schonberger, L.B., Mills, J.L., Gunn, W.J., Piper, J.M., Wysowski, D.K., Thomson, R., Durako, S. and Brown, P.** (1991) Creutzfeldt-Jakob disease in pituitary growth hormone recipients in the United States. *Jama*, **265**, 880-884.
- Franc, N.C., Dimarcq, J.L., Lagueux, M., Hoffmann, J. and Ezekowitz, R.A.** (1996) Croquemort, a novel Drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity*, **4**, 431-443.

- Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J. and Alpers, M.** (1966) Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*, **209**, 794-796.
- Giancarlo, B., Silvano, S., Albert, Z., Mantovani, A. and Allavena, P.** (1996) Migratory response of human natural killer cells to lymphotactin. *Eur J Immunol*, **26**, 3238-3241.
- Gibbs, C.J., Jr., Joy, A., Heffner, R., Franko, M., Miyazaki, M., Asher, D.M., Parisi, J.E., Brown, P.W. and Gajdusek, D.C.** (1985) Clinical and pathological features and laboratory confirmation of Creutzfeldt-Jakob disease in a recipient of pituitary-derived human growth hormone. *N Engl J Med*, **313**, 734-738.
- Giese, A., Brown, D.R., Groschup, M.H., Feldmann, C., Haist, I. and Kretzschmar, H.A.** (1998) Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol*, **8**, 449-457.
- Giese, A., Groschup, M.H., Hess, B. and Kretzschmar, H.A.** (1995) Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol*, **5**, 213-221.
- Giese, A. and Kretzschmar, H.A.** (2001) Prion-induced neuronal damage--the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies. *Curr Top Microbiol Immunol*, **253**, 203-217.
- Goldstein, I.M., Kaplan, H.B., Edelson, H.S. and Weissmann, G.** (1979) Ceruloplasmin. A scavenger of superoxide anion radicals. *J Biol Chem*, **254**, 4040-4045.
- Graeber, M.B., Streit, W.J. and Kreutzberg, G.W.** (1988) Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J Neurosci Res*, **21**, 18-24.
- Grewal, R.P., Yoshida, T., Finch, C.E. and Morgan, T.E.** (1997) Scavenger receptor mRNAs in rat brain microglia are induced by kainic acid lesioning and by cytokines. *Neuroreport*, **8**, 1077-1081.
- Guarin, P., De Monte, L. and Alessio, M.** (2000) CD36 folding revealed by conformational epitope expression is essential for cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *Parasite Immunol*, **22**, 349-360.
- Gunn, M.D., Ngo, V.N., Ansel, K.M., Eklund, E.H., Cyster, J.G. and Williams, L.T.** (1998) A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature*, **391**, 799-803.

- Hafiz, F.B. and Brown, D.R.** (2000) A model for the mechanism of astrogliosis in prion disease. *Mol Cell Neurosci*, **16**, 221-232.
- Harris, D.A., Huber, M.T., van Dijken, P., Shyng, S.L., Chait, B.T. and Wang, R.** (1993) Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry*, **32**, 1009-1016.
- Hart, S.P., Haslett, C. and Dransfield, I.** (1996) Recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Experientia*, **52**, 950-956.
- Harvey, I. and Coyle, E.** (1992) Creutzfeldt-Jakob disease after non-commercial dura mater graft. *Lancet*, **340**, 615.
- Hill, A.F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K.C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L.J. and Lantos, P.** (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, **389**, 448-450, 526.
- Hoinville, L.J.** (1996) A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev Sci Tech*, **15**, 827-852.
- Honda, M., Akiyama, H., Yamada, Y., Kondo, H., Kawabe, Y., Takeya, M., Takahashi, K., Suzuki, H., Doi, T., Sakamoto, A., Ookawara, S., Mato, M., Gough, P.J., Greaves, D.R., Gordon, S., Kodama, T. and Matsushita, M.** (1998) Immunohistochemical evidence for a macrophage scavenger receptor in Mato cells and reactive microglia of ischemia and Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, **245**, 734-740.
- Hope, J., Morton, L.J., Farquhar, C.F., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Kimberlin, R.H.** (1986) The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). *Embo J*, **5**, 2591-2597.
- Hu, J., Akama, K.T., Krafft, G.A., Chromy, B.A. and Van Eldik, L.J.** (1998) Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res*, **785**, 195-206.
- Hu, J. and Van Eldik, L.J.** (1999) Glial-derived proteins activate cultured astrocytes and enhance beta amyloid-induced glial activation. *Brain Res*, **842**, 46-54.
- Huang, F., Buttini, M., Wyss-Coray, T., McConlogue, L., Kodama, T., Pitas, R.E. and Mucke, L.** (1999) Elimination of the class A scavenger receptor does not affect amyloid plaque formation or neurodegeneration in transgenic mice expressing human amyloid protein precursors. *Am J Pathol*, **155**, 1741-1747.

- Hughes, D.A., Fraser, I.P. and Gordon, S.** (1995) Murine macrophage scavenger receptor: in vivo expression and function as receptor for macrophage adhesion in lymphoid and non-lymphoid organs. *Eur J Immunol*, **25**, 466-473.
- Huh, H.Y., Lo, S.K., Yesner, L.M. and Silverstein, R.L.** (1995) CD36 induction on human monocytes upon adhesion to tumor necrosis factor-activated endothelial cells. *J Biol Chem*, **270**, 6267-6271.
- Huh, H.Y., Pearce, S.F., Yesner, L.M., Schindler, J.L. and Silverstein, R.L.** (1996) Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood*, **87**, 2020-2028.
- Husemann, J., Loike, J.D., Anankov, R., Febbraio, M. and Silverstein, S.C.** (2002) Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia*, **40**, 195-205.
- Husemann, J., Loike, J.D., Kodama, T. and Silverstein, S.C.** (2001) Scavenger receptor class B type I (SR-BI) mediates adhesion of neonatal murine microglia to fibrillar beta-amyloid. *J Neuroimmunol*, **114**, 142-150.
- Ironside, J.W.** (2002) Neuropathology of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *C R Biol*, **325**, 27-31.
- Ironside, J.W., McCardle, L., Horsburgh, A., Lim, Z. and Head, M.W.** (2002) Pathological diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Apmis*, **110**, 79-87.
- Jeffrey, M., Goodbrand, I.A. and Goodsir, C.M.** (1995) Pathology of the transmissible spongiform encephalopathies with special emphasis on ultrastructure. *Micron*, **26**, 277-298.
- Jeffrey, M., Goodsir, C.M., Race, R.E. and Chesebro, B.** (2004) Scrapie-specific neuronal lesions are independent of neuronal PrP expression. *Ann Neurol*, **55**, 781-792.
- Jeffrey, M. and Wilesmith, J.W.** (1992) Idiopathic brainstem neuronal chromatolysis and hippocampal sclerosis: a novel encephalopathy in clinically suspect cases of bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec*, **131**, 359-362.
- Jenh, C.H., Cox, M.A., Hipkin, W., Lu, T., Pugliese-Sivo, C., Gonsiorek, W., Chou, C.C., Narula, S.K. and Zavodny, P.J.** (2001) Human B cell-attracting chemokine 1 (BCA-1; CXCL13) is an agonist for the human CXCR3 receptor. *Cytokine*, **15**, 113-121.
- Jinquan, T., Frydenberg, J., Mukaida, N., Bonde, J., Larsen, C.G., Matsushima, K. and Thestrup-Pedersen, K.** (1995) Recombinant human growth-regulated oncogene-alpha induces T

- lymphocyte chemotaxis. A process regulated via IL-8 receptors by IFN-gamma, TNF-alpha, IL-4, IL-10, and IL-13. *J Immunol*, **155**, 5359-5368.
- Ju, W.K., Park, K.J., Choi, E.K., Kim, J., Carp, R.I., Wisniewski, H.M. and Kim, Y.S.** (1998) Expression of inducible nitric oxide synthase in the brains of scrapie-infected mice. *J Neurovirol*, **4**, 445-450.
- Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C.M., Wallace, A.C., James, T.L., Cohen, F.E. and 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.
- Kelner, G.S., Kennedy, J., Bacon, K.B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bazan, J.F., Moore, K.W., Schall, T.J. and et al.** (1994) Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science*, **266**, 1395-1399.
- Kim, S., Jao, S., Laurence, J.S. and LiWang, P.J.** (2001) Structural comparison of monomeric variants of the chemokine MIP-1beta having differing ability to bind the receptor CCR5. *Biochemistry*, **40**, 10782-10791.
- King, C.Y. and Diaz-Avalos, R.** (2004) Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature*, **428**, 319-323.
- Kirkwood, J.K. and Cunningham, A.A.** (1994) Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. *Vet Rec*, **135**, 296-303.
- Kitamoto, T., Muramoto, T., Mohri, S., Doh-Ura, K. and Tateishi, J.** (1991) Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol*, **65**, 6292-6295.
- Kopacek, J., Sakaguchi, S., Shigematsu, K., Nishida, N., Atarashi, R., Nakaoke, R., Moriuchi, R., Niwa, M. and Katamine, S.** (2000) Upregulation of the genes encoding lysosomal hydrolases, a perforin-like protein, and peroxidase in the brains of mice affected with an experimental prion disease. *J Virol*, **74**, 411-417.
- Kozak, M.** (1981a) Mechanism of mRNA recognition by eukaryotic ribosomes during initiation of protein synthesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, **93**, 81-123.
- Kozak, M.** (1981b) Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res*, **9**, 5233-5252.

- Kozak, M.** (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol*, **196**, 947-950.
- Kretzschmar, H.A., Prusiner, S.B., Stowring, L.E. and DeArmond, S.J.** (1986a) Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol*, **122**, 1-5.
- Kretzschmar, H.A., Stowring, L.E., Westaway, D., Stubblebine, W.H., Prusiner, S.B. and Dearmond, S.J.** (1986b) Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *Dna*, **5**, 315-324.
- Kretzschmar, H.A., Tings, T., Madlung, A., Giese, A. and Herms, J.** (2000) Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse. *Arch Virol Suppl*, 239-249.
- Kreutzberg, G.W.** (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, **19**, 312-318.
- Krieger, M.** (1997) The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol*, **8**, 275-280.
- Krieger, M. and Herz, J.** (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem*, **63**, 601-637.
- Krumbholz, M., Theil, D., Cepok, S., Hemmer, B., Kivisakk, P., Ransohoff, R.M., Hofbauer, M., Farina, C., Derfuss, T., Hartle, C., Newcombe, J., Hohlfeld, R. and Meinl, E.** (2006) Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain*, **129**, 200-211.
- Lasmezas, C.I., Deslys, J.P., Robain, O., Jaegly, A., Beringue, V., Peyrin, J.M., Fournier, J.G., Hauw, J.J., Rossier, J. and Dormont, D.** (1997) Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*, **275**, 402-405.
- Le, Y., Gong, W., Tiffany, H.L., Tumanov, A., Nedospasov, S., Shen, W., Dunlop, N.M., Gao, J.L., Murphy, P.M., Oppenheim, J.J. and Wang, J.M.** (2001) Amyloid (beta)42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. *J Neurosci*, **21**, RC123.
- Legler, D.F., Loetscher, M., Roos, R.S., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. and Moser, B.** (1998) B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J Exp Med*, **187**, 655-660.
- Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.O., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B.** (2004) Synthetic mammalian prions. *Science*, **305**, 673-676.

- Levy, S.R., Chiappa, K.H., Burke, C.J. and Young, R.R.** (1986) Early evolution and incidence of electroencephalographic abnormalities in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Clin Neurophysiol*, **3**, 1-21.
- Lewicki, H., Tishon, A., Homann, D., Mazarguil, H., Laval, F., Asensio, V.C., Campbell, I.L., DeArmond, S., Coon, B., Teng, C., Gairin, J.E. and Oldstone, M.B.** (2003) T cells infiltrate the brain in murine and human transmissible spongiform encephalopathies. *J Virol*, **77**, 3799-3808.
- Liberski, P.P. and Gajdusek, D.C.** (1997) Kuru: forty years later, a historical note. *Brain Pathol*, **7**, 555-560.
- Liberski, P.P., Plucienniczak, A., Hrabec, E. and Bogucki, A.** (1989) Ultrastructural studies of scrapie-associated fibrils and prion protein from hamster brains infected with scrapie. *Folia Histochem Cytobiol*, **27**, 3-9.
- Liberski, P.P., Yanagihara, R., Gibbs, C.J., Jr. and Gajdusek, D.C.** (1992) Neuronal autophagic vacuoles in experimental scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol (Berl)*, **83**, 134-139.
- Lorton, D.** (1997) beta-Amyloid-induced IL-1 beta release from an activated human monocyte cell line is calcium- and G-protein-dependent. *Mech Ageing Dev*, **94**, 199-211.
- Lucarelli, M., Gennarelli, M., Cardelli, P., Novelli, G., Scarpa, S., Dallapiccola, B. and Strom, R.** (1997) Expression of receptors for native and chemically modified low-density lipoproteins in brain microvessels. *FEBS Lett*, **401**, 53-58.
- Ludmila, A., Nekrasov, A., Marchenko, A., Shevchenko, M., Benevolenskii, S., Sapozhnikov, A., Kurup, V.P. and Svirshchevskaya, E.** (2006) Cryptic B-cell epitope identification through informational analysis of protein sequences. *Vaccine*.
- Mabbott, N.A., Mackay, F., Minns, F. and Bruce, M.E.** (2000) Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat Med*, **6**, 719-720.
- Maignien, T., Shakweh, M., Calvo, P., Marce, D., Sales, N., Fattal, E., Deslys, J.P., Couvreur, P. and Lasmezas, C.I.** (2005) Role of gut macrophages in mice orally contaminated with scrapie or BSE. *Int J Pharm*, **298**, 293-304.

- Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klohn, P.C., Brandner, S. and Collinge, J.** (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science*, **302**, 871-874.
- Manetto, V., Medori, R., Cortelli, P., Montagna, P., Tinuper, P., Baruzzi, A., Rancurel, G., Hauw, J.J., Vanderhaeghen, J.J., Mailloux, P. and et al.** (1992) Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of five new cases. *Neurology*, **42**, 312-319.
- Manson, J.C., Clarke, A.R., Hooper, M.L., Aitchison, L., McConnell, I. and Hope, J.** (1994a) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol*, **8**, 121-127.
- Manson, J.C., Clarke, A.R., McBride, P.A., McConnell, I. and Hope, J.** (1994b) PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology. *Neurodegeneration*, **3**, 331-340.
- Marella, M. and Chabry, J.** (2004) Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. *J Neurosci*, **24**, 620-627.
- Marsh, R.F. and Hadlow, W.J.** (1992) Transmissible mink encephalopathy. *Rev Sci Tech*, **11**, 539-550.
- Matter, M.L., Zhang, Z., Nordstedt, C. and Ruoslahti, E.** (1998) The alpha5beta1 integrin mediates elimination of amyloid-beta peptide and protects against apoptosis. *J Cell Biol*, **141**, 1019-1030.
- McBride, P.A., Schulz-Schaeffer, W.J., Donaldson, M., Bruce, M., Diring, H., Kretzschmar, H.A. and Beekes, M.** (2001) Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol*, **75**, 9320-9327.
- McKinley, M.P., Meyer, R.K., Kenaga, L., Rahbar, F., Cotter, R., Serban, A. and Prusiner, S.B.** (1991) Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J Virol*, **65**, 1340-1351.
- McKinley, M.P. and Prusiner, S.B.** (1991) Ultrastructural studies of prions. *Curr Top Microbiol Immunol*, **172**, 75-91.
- Milhavet, O. and Lehmann, S.** (2002) Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev*, **38**, 328-339.

- Minami, M. and Satoh, M.** (2005) Role of chemokines in ischemic neuronal stress. *Neuromolecular Med*, **7**, 149-155.
- Mohan, J., Hopkins, J. and Mabbott, N.A.** (2005) Skin-derived dendritic cells acquire and degrade the scrapie agent following in vitro exposure. *Immunology*, **116**, 122-133.
- Moore, K.J., El Khoury, J., Medeiros, L.A., Terada, K., Geula, C., Luster, A.D. and Freeman, M.W.** (2002) A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *J Biol Chem*, **277**, 47373-47379.
- Nakajima, K. and Kohsaka, S.** (2004) Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, **4**, 65-84.
- Nakata, A., Nakagawa, Y., Nishida, M., Nozaki, S., Miyagawa, J., Nakagawa, T., Tamura, R., Matsumoto, K., Kameda-Takemura, K., Yamashita, S. and Matsuzawa, Y.** (1999) CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **19**, 1333-1339.
- Narang, H.** (2002) A critical review of the nature of the spongiform encephalopathy agent: protein theory versus virus theory. *Exp Biol Med (Maywood)*, **227**, 4-19.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Standart, N. and Thiele, B.J.** (1994) Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region. *J. EMBO*, **13**, 1476-1481.
- Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E. and 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.
- Paresce, D.M., Ghosh, R.N. and Maxfield, F.R.** (1996) Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron*, **17**, 553-565.
- Park, S.K., Choi, S.I., Jin, J.K., Choi, E.K., Kim, J.I., Carp, R.I. and Kim, Y.S.** (2000) Differential expression of Bax and Bcl-2 in the brains of hamsters infected with 263K scrapie agent. *Neuroreport*, **11**, 1677-1682.
- Pattison, I.H., Jones, K.M.** (1968) Modification of a strain of mouse-adapted scrapie by passage through rats. *Res Vet Sci*, **9**, 408-10
- Pearson, A.M.** (1996) Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol*, **8**, 20-28.

- Peyrin, J.M., Lasmezas, C.I., Haik, S., Tagliavini, F., Salmona, M., Williams, A., Richie, D., Deslys, J.P. and Dormont, D.** (1999) Microglial cells respond to amyloidogenic PrP peptide by the production of inflammatory cytokines. *Neuroreport*, **10**, 723-729.
- Platt, N., da Silva, R.P. and Gordon, S.** (1998) Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol*, **8**, 365-372.
- Platt, N. and Gordon, S.** (1998) Scavenger receptors: diverse activities and promiscuous binding of polyanionic ligands. *Chem Biol*, **5**, R193-203.
- Platt, N. and Gordon, S.** (2001) Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? - The mouse's tale. *J Clin Invest*, **108**, 649-654.
- Podrez, E.A., Schmitt, D., Hoff, H.F. and Hazen, S.L.** (1999) Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J Clin Invest*, **103**, 1547-1560.
- Premack, B.A. and Schall, T.J.** (1996) Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat Med*, **2**, 1174-1178.
- Prinz, M., Heikenwalder, M., Junt, T., Schwarz, P., Glatzel, M., Heppner, F.L., Fu, Y.X., Lipp, M. and Aguzzi, A.** (2003) Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature*, **425**, 957-962.
- Prinz, M., Montrasio, F., Klein, M.A., Schwarz, P., Priller, J., Odermatt, B., Pfeffer, K. and Aguzzi, A.** (2002) Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 919-924.
- Prusiner, S.B.** (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, **216**, 136-144.
- Raeber, A.J., Borchelt, D.R., Scott, M. and Prusiner, S.B.** (1992) Attempts to convert the cellular prion protein into the scrapie isoform in cell-free systems. *J Virol*, **66**, 6155-6163.
- Raeber, A.J., Race, R.E., Brandner, S., Priola, S.A., Sailer, A., Bessen, R.A., Mucke, L., Manson, J., Aguzzi, A., Oldstone, M.B., Weissmann, C. and Chesebro, B.** (1997) Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie. *Embo J*, **16**, 6057-6065.
- Rappert, A., Biber, K., Nolte, C., Lipp, M., Schubel, A., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Boddeke, H.W. and Kettenmann, H.** (2002) Secondary lymphoid tissue chemokine (CCL21) activates

- CXCR3 to trigger a Cl⁻ current and chemotaxis in murine microglia. *J Immunol*, **168**, 3221-3226.
- Resnick, D., Chatterton, J.E., Schwartz, K., Slayter, H. and Krieger, M.** (1996) Structures of class A macrophage scavenger receptors. Electron microscopic study of flexible, multidomain, fibrous proteins and determination of the disulfide bond pattern of the scavenger receptor cysteine-rich domain. *J Biol Chem*, **271**, 26924-26930.
- Rezaie, P. and Lantos, P.L.** (2001) Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev*, **35**, 55-72.
- Riemer, C., Queck, I., Simon, D., Kurth, R. and Baier, M.** (2000) Identification of upregulated genes in scrapie-infected brain tissue. *J Virol*, **74**, 10245-10248.
- Rigotti, A., Acton, S.L. and Krieger, M.** (1995) The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem*, **270**, 16221-16224.
- Rogers, C.A., Gasque, P., Piddlesden, S.J., Okada, N., Holers, V.M. and Morgan, B.P.** (1996) Expression and function of membrane regulators of complement on rat astrocytes in culture. *Immunology*, **88**, 153-161.
- Rubenstein, R., Merz, P.A., Kascsak, R.J., Scalici, C.L., Papini, M.C., Carp, R.I. and Kimberlin, R.H.** (1991) Scrapie-infected spleens: analysis of infectivity, scrapie-associated fibrils, and protease-resistant proteins. *J Infect Dis*, **164**, 29-35.
- Ryder, S.J., Wells, G.A., Bradshaw, J.M. and Pearson, G.R.** (2001) Inconsistent detection of PrP in extraneural tissues of cats with feline spongiform encephalopathy. *Vet Rec*, **148**, 437-441.
- Ryeom, S.W., Sparrow, J.R. and Silverstein, R.L.** (1996) CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *J Cell Sci*, **109 (Pt 2)**, 387-395.
- Sakaguchi, S., Katamine, S., Shigematsu, K., Nakatani, A., Moriuchi, R., Nishida, N., Kurokawa, K., Nakaoka, R., Sato, H., Jishage, K. and et al.** (1995) Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *J Virol*, **69**, 7586-7592.
- Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Aiba, Y., Tanaka, T., Miwa, S., Katsura, Y., Kita, T. and Masaki, T.** (1997) An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*, **386**, 73-77.

- Schreuder, B.E., van Keulen, L.J., Vromans, M.E., Langeveld, J.P. and Smits, M.A.** (1998) Tonsillar biopsy and PrPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie. *Vet Rec*, **142**, 564-568.
- Schultz, J., Schwarz, A., Neidhold, S., Burwinkel, M., Riemer, C., Simon, D., Kopf, M., Otto, M. and Baier, M.** (2004) Role of interleukin-1 in prion disease-associated astrocyte activation. *Am J Pathol*, **165**, 671-678.
- Scott, M.R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H.O., Tremblay, P., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B.** (1999) Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 15137-15142.
- Shlomchik, M.J., Radebold, K., Duclos, N. and Manuelidis, L.** (2001) Neuroinvasion by a Creutzfeldt-Jakob disease agent in the absence of B cells and follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9289-9294.
- Soto, C., Anderes, L., Suardi, S., Cardone, F., Castilla, J., Frossard, M.J., Peano, S., Saa, P., Limido, L., Carbonatto, M., Ironside, J., Torres, J.M., Pocchiari, M. and Tagliavini, F.** (2005) Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding. *FEBS Lett*, **579**, 638-642.
- Sparrer, H.E., Santoso, A., Szoka, F.C., Jr. and Weissman, J.S.** (2000) Evidence for the prion hypothesis: induction of the yeast [PSI⁺] factor by in vitro- converted Sup35 protein. *Science*, **289**, 595-599.
- Spraker, T.R., Miller, M.W., Williams, E.S., Getzy, D.M., Adrian, W.J., Schoonveld, G.G., Spowart, R.A., O'Rourke, K.I., Miller, J.M. and Merz, P.A.** (1997) Spongiform encephalopathy in free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) and Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) in northcentral Colorado. *J Wildl Dis*, **33**, 1-6.
- Stahl, N., Baldwin, M.A., Teplow, D.B., Hood, L., Gibson, B.W., Burlingame, A.L. and Prusiner, S.B.** (1993) Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry*, **32**, 1991-2002.
- Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K. and Prusiner, S.B.** (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*, **51**, 229-240.
- Stahl, N. and Prusiner, S.B.** (1991) Prions and prion proteins. *Faseb J*, **5**, 2799-2807.
- Streit, W.J., Graeber, M.B. and Kreutzberg, G.W.** (1988) Functional plasticity of microglia: a review. *Glia*, **1**, 301-307.

- Strieter, R.M., Polverini, P.J., Arenberg, D.A. and Kunkel, S.L.** (1995a) The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis. *Shock*, **4**, 155-160.
- Strieter, R.M., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Kasper, J., Dzuiba, J., Van Damme, J., Walz, A., Marriott, D. and et al.** (1995b) The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*, **270**, 27348-27357.
- Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A. and Manson, J.C.** (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*, **380**, 639-642.
- Uguccioni, M., D'Apuzzo, M., Loetscher, M., Dewald, B. and Baggiolini, M.** (1995) Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *Eur J Immunol*, **25**, 64-68.
- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S.J., Smart, E.J., Anderson, R.G., Taraboulos, A. and 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.
- Vissers, J.L., Hartgers, F.C., Lindhout, E., Figdor, C.G. and Adema, G.J.** (2001) BLC (CXCL13) is expressed by different dendritic cell subsets in vitro and in vivo. *Eur J Immunol*, **31**, 1544-1549.
- Wadsworth, J.D., Asante, E.A., Desbruslais, M., Linehan, J.M., Joiner, S., Gowland, I., Welch, J., Stone, L., Lloyd, S.E., Hill, A.F., Brandner, S. and Collinge, J.** (2004) Human prion protein with valine 129 prevents expression of variant CJD phenotype. *Science*, **306**, 1793-1796.
- Wells, G.A., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Jeffrey, M., Dawson, M. and Bradley, R.** (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*, **121**, 419-420.
- Will, R.G.** (1993) Epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease. *Br Med Bull*, **49**, 960-970.
- Will, R.G., Ironside, J.W., Zeidler, M., Cousens, S.N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A. and Smith, P.G.** (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, **347**, 921-925.
- Williams, A., Lucassen, P.J., Ritchie, D. and Bruce, M.** (1997) PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Exp Neurol*, **144**, 433-438.

Williams, E.S. and Miller, M.W. (2002) Chronic wasting disease in deer and elk in North America. *Rev Sci Tech*, **21**, 305-316.

Williams, E.S. and Young, S. (1982) Spongiform encephalopathy of Rocky Mountain elk. *J Wildl Dis*, **18**, 465-471.

Williams, K., Ulvestad, E. and Antel, J.P. (1994) B7/BB-1 antigen expression on adult human microglia studied in vitro and in situ. *Eur J Immunol*, **24**, 3031-3037.

Windl, O., Dempster, M., Estibeiro, J.P., Lathe, R., de Silva, R., Esmonde, T., Will, R., Springbett, A., Campbell, T.A., Sidle, K.C., Palmer, M.S. and Collinge, J. (1996) Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the PRNP gene. *Hum Genet*, **98**, 259-264.

Wyss-Coray, T., Loike, J.D., Brionne, T.C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S.C. and Husemann, J. (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med*, **9**, 453-457.

www.biomicro.sdstate.edu

www.cjd.ed.ac.uk

www.clontech.com

www.defra.gov.uk

www.invitrogen.com

www.jenagen.de

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.pathology.mc.duke.edu

www.pharmaceutical-technology.com

www.rbej.com

www.takaramirusbio.com

www.Verbraucherministerium.de

- Xia, M.Q., Bacskai, B.J., Knowles, R.B., Qin, S.X. and Hyman, B.T.** (2000) Expression of the chemokine receptor CXCR3 on neurons and the elevated expression of its ligand IP-10 in reactive astrocytes: in vitro ERK1/2 activation and role in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*, **108**, 227-235.
- Yamada, Y., Doi, T., Hamakubo, T. and Kodama, T.** (1998) Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*, **54**, 628-640.
- Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D. and Schmidt, A.M.** (1996) RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*, **382**, 685-691.
- Ye, X., Scallet, A.C., Kascsak, R.J. and Carp, R.I.** (1998) Astrocytosis and amyloid deposition in scrapie-infected hamsters. *Brain Res*, **809**, 277-287.
- Yoshimura, T., Matsushima, K., Oppenheim, J.J. and Leonard, E.J.** (1987) Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). *J Immunol*, **139**, 788-793.
- Zaballos, A., Gutierrez, J., Varona, R., Ardavin, C. and Marquez, G.** (1999) Cutting edge: identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK. *J Immunol*, **162**, 5671-5675.
- Zerr, I., Bodemer, M., Gefeller, O., Otto, M., Poser, S., Wiltfang, J., Windl, O., Kretzschmar, H.A. and Weber, T.** (1998) Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol*, **43**, 32-40.
- Zobeley, E., Flechsig, E., Cozzio, A., Enari, M. and Weissmann, C.** (1999) Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface. *Mol Med*, **5**, 240-243.

Publikationsliste

- Mok S.W., Thelen K.M., Riemer C., Bamme T., Gültner S., Lutjohann D., Baier M. (2006)**
Simvastatin prolongs survival times in prion infections of the central nervous system.
Biochem Biophys Res Commun, **348**, 697-702.
- Riemer C., Bamme T., Mok S.W., Baier M. (2006)** 3-Methyl-4-chlorophenol for prion decontamination of medical devices, *Infect Control Hosp Epidemiol*, **27**, 778-80.
- Miesbauer M., Bamme T., Riemer C., Oidtmann B., Winklhofer K.F., Baier M., Tatzelt J. (2006)**
Prion protein-related proteins from zebrafish are complex glycosylated and contain a glycosylphosphatidylinositol anchor, *Biochem Biophys Res Commun*, **341**, 218-24.
- Burwinkel M., Riemer C., Schwarz A., Schultz J., Neidhold S., Bamme T., Baier M. (2004)** Role of cytokines and chemokines in prion infections of the central nervous system, *Int J Dev Neurosci*, **22**, 497-505.
- Schwarz A., Kratke O., Burwinkel M., Riemer C., Schultz J., Henklein P., Bamme T., Baier M. (2003)** Immunisation with a synthetic prion protein-derived peptide prolongs survival times of mice orally exposed to the scrapie agent, *Neurosci Lett*, **350**, 187-9.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Danksagung

Mein Dank gilt Dr. Michael Baier für die Überlassung des interessanten Themas, die mir zur Verfügung gestellten Mittel und die hervorragende Betreuung der Arbeit.

Zudem danke ich Herrn Dr. Uwe Klemm für die Zusammenarbeit bei der Generierung der transgenen CXCL13-Mäuse. Für die Bereitstellung des Expressionsvektors pEGFP-1/GFAP danke ich Dr. Helmut Kettenmann.

Ich danke meinen Mitdoktoranden Julia Schultz, Sandra Gültner, Simon Mok und Ines Heise für die guten Gespräche, hilfreichen Diskussionen und die nette Zusammenarbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Lichy und Frau Krohn für die tierexperimentellen Arbeiten. Frau Wohler und Elke Westhäuser danke ich für die Unterstützung bei den immunhistologischen Untersuchungen.

Bei Constanze Riemer möchte ich mich für die gute Betreuung und natürlich für das Korrekturlesen bedanken.

Der gesamten Arbeitsgruppe 23 möchte ich für die vielen schönen Stunden im Labor danken.

Heike danke ich für die vielen erfrischenden Diskussionen und Gespräche bei Latte Macchiato und Pasta.

Sissi möchte ich für die wunderbare, ereignisreiche Zeit in Berlin und die daraus erwachsene Freundschaft danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester Bianca, die mich auf dem Weg hierher unterstützt haben. Sie haben mir auch in schweren Zeiten immer wieder Kraft gegeben, denn sie haben immer an mich geglaubt. Es ist ein gutes Gefühl zu wissen, dass sie hinter mir stehen. Zudem danke ich Matthias von ganzem Herzen für seinen Zuspruch und seine Unterstützung und dafür, dass er während der „heißen Phase“ einfach für mich da war.