

# VERÄNDERUNGEN IM PROTEOM DER MAUS NACH INFEKTION MIT DEM SCRAPIE-STAMM 139A

Dissertation

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom-Biologin Nicole Steireif  
aus Koblenz

März 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Joachim Klose

2. Gutachter: Prof. Dr. Carsten Niemitz

Disputation am 24.06.2010

*Es gibt zwei Arten, sein Leben zu leben:  
entweder so, als wäre nichts ein Wunder,  
oder so, als wäre alles eines.  
Ich glaube an Letzteres.*

*(Albert Einstein)*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>xi</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>xiii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Geschichte der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien . . . . .	1
1.2 Die Natur des Erregers . . . . .	3
1.2.1 Die Prion-Hypothese . . . . .	4
1.2.1.1 Das zelluläre Prion-Protein (PrP <sup>C</sup> ) . . . . .	4
1.2.1.2 Das fehlgefaltete Prion-Protein (PrP <sup>Sc</sup> ) . . . . .	5
1.2.1.3 Erreger-Replikation: Von der zellulären zur pathogenen Form des Prion-Proteins . . . . .	6
1.2.2 Weitere Erreger-Hypothesen . . . . .	7
1.3 Prionenausbreitung, Klinik und Diagnostik . . . . .	7
1.3.1 Das lymphoretikuläre System und die Rolle der Milz . . . . .	7
1.3.2 Die Ausbreitung ins neuronale Gewebe . . . . .	8
1.3.3 Klinische Symptome . . . . .	8
1.3.4 Histopathologische Veränderungen . . . . .	9
1.3.4.1 Prion-Protein-Ablagerungen . . . . .	9
1.3.4.2 Vakuolisierung . . . . .	9
1.3.4.3 Mikrogliaaktivierung . . . . .	10
1.3.4.4 Astrozytose (Gliose) . . . . .	11
1.3.4.5 Neuronenverlust . . . . .	12
1.3.5 Biochemische Detektion von PrP <sup>Sc</sup> . . . . .	12
1.4 Problemstellung und Zielsetzung . . . . .	13
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1 Labormaterial . . . . .	15
2.1.1 Chemikalien . . . . .	15
2.1.2 Gerätschaften und Hilfsmittel . . . . .	15
2.2 Tiere und Gewebe . . . . .	16
2.2.1 Orale Infektion . . . . .	16
2.2.2 Intrazerebrale Infektion . . . . .	16
2.2.3 Diagnose der Tiere . . . . .	16
2.2.4 Organgewinnung . . . . .	17
2.3 Proteinextraktion . . . . .	17

2.3.1	Fraktionierte Proteinextraktion . . . . .	18
2.3.1.1	Überstand Ü (plasmatische Fraktion) . . . . .	18
2.3.1.2	Rückstandsextrakt RE (membranassoziierte Fraktion) . . . . .	19
2.3.1.3	Rückstandssuspension RS (Kernfraktion) . . . . .	20
2.3.2	Gesamtproteinextraktion GE . . . . .	20
2.4	2D-Gel-Elektrophorese . . . . .	22
2.4.1	Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension) . . . . .	23
2.4.2	SDS-PAGE (2. Dimension) . . . . .	24
2.5	Färbungen . . . . .	25
2.5.1	Silberfärbungen . . . . .	25
2.5.1.1	Analytische Silberfärbung . . . . .	25
2.5.1.2	Massenspektrometrikompatible Silberfärbung . . . . .	25
2.5.2	Kolloidale Coomassie-G250-Färbung . . . . .	26
2.6	Bildauswertung . . . . .	26
2.7	Spotidentifizierung . . . . .	27
2.7.1	Ausstanzen von Proteinspots . . . . .	27
2.7.2	Massenspektrometrie . . . . .	28
2.7.3	Charakterisierung der Proteine . . . . .	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1	Untersuchung der Proteinmuster der Milz . . . . .	29
3.1.1	Differentielle Proteinspots im Überstand (plasmatische Fraktion) . . . . .	29
3.1.1.1	Das am weitesten fortgeschrittene Stadium (20 Wochen) . . . . .	29
3.1.1.2	In früheren Stadien wiederzufindende Unterschiede . . . . .	30
3.1.2	Differentielle Proteinspots im Rückstandsextrakt (membranassoziierte Fraktion) . . . . .	30
3.1.2.1	Das am weitesten fortgeschrittene Stadium (20 Wochen) . . . . .	30
3.1.2.2	In früheren Stadien wiederzufindende Unterschiede . . . . .	30
3.1.3	Differentielle Proteinspots in der Rückstandssuspension (Kernfraktion) . . . . .	30
3.1.4	Verteilung der Intensitätsänderungen in der Milz . . . . .	31
3.1.5	Überprüfung der Infektion in der Milz . . . . .	31
3.2	Untersuchung der Proteinmuster des Gehirns . . . . .	32
3.2.1	Unterschiede im terminalen Stadium (21 Wochen) . . . . .	32
3.2.2	In früheren Stadien wiederzufindende Unterschiede . . . . .	32
3.2.3	Verteilung der Intensitätsänderungen im Gehirn . . . . .	32
3.2.4	Überprüfung der Infektion im Gehirn . . . . .	32
3.3	Identifizierte Proteine . . . . .	33
3.3.1	Veränderte Proteine der Milz . . . . .	33
3.3.1.1	Klassifizierung der plasmatischen Proteine . . . . .	33
3.3.1.2	Klassifizierung der membranassoziierten Proteine . . . . .	36
3.3.1.3	Klassifizierung der Kernproteine . . . . .	39
3.3.2	Veränderte Proteine des Gehirns . . . . .	41
3.3.2.1	Klassifizierung der Gehirnpoteine . . . . .	41
3.4	In Milz und Gehirn veränderte Protein-Isoformen . . . . .	44

3.4.1	Moesin (Membrane-Organizing Extension Spike Protein) . . . . .	44
3.4.2	Elongation Factor 1 Alpha . . . . .	44
3.4.3	Tu Translation Elongation Factor . . . . .	45
3.4.4	Ubiquinol-Cytochrome-C Reductase Core Protein 2 . . . . .	45
3.4.5	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K . . . . .	45
3.5	In mehreren Milzfractionen veränderte Protein-Isoformen . . . . .	47
3.5.1	Proteasome Subunit Alpha Type 3 . . . . .	47
3.5.2	Gelsolin . . . . .	47
3.5.3	Ezrin (p81, Cytovillin, Villin 2) . . . . .	49
3.5.4	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 . . . . .	49
3.5.5	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2B1 . . . . .	50
3.5.6	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A3 . . . . .	50
3.6	Proteine und ihre Isoformen . . . . .	52
3.6.1	Milz . . . . .	52
3.6.1.1	Die Plasmatische Fraktion . . . . .	52
3.6.1.2	Die Membranassoziierte Fraktion . . . . .	54
3.6.1.3	Die Kernfraktion . . . . .	56
3.6.2	Gehirn . . . . .	57
3.7	Stadienübergreifend veränderte Spots . . . . .	59
3.7.1	Milz . . . . .	59
3.7.1.1	Die Plasmatische Fraktion . . . . .	59
3.7.1.2	Die membranassoziierte Fraktion . . . . .	63
3.7.2	Gehirn . . . . .	77
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>83</b>
4.1	Betrachtung einzelner Proteine . . . . .	83
4.1.1	Gehirn . . . . .	83
4.1.1.1	Cystatin C . . . . .	84
4.1.1.2	Saures Gliafaserprotein (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP) . . . . .	84
4.1.1.3	$\alpha$ -B-Crystallin . . . . .	84
4.1.1.4	Apolipoprotein E . . . . .	85
4.1.1.5	Annexin A5 . . . . .	85
4.1.2	Milz . . . . .	86
4.1.2.1	Heterogene nukleäre Ribonukleoproteine . . . . .	86
4.1.2.2	Proteasomuntereinheiten . . . . .	87
4.1.3	Elongation Factor 1 Alpha . . . . .	87
4.2	Oxidativer Stress durch Prioninfektion . . . . .	87
4.3	Zytoskelett-Proteine . . . . .	88
4.4	Eingriff in Zellkommunikation und Signaltransduktion . . . . .	88
4.5	Aussagekraft der veränderten Proteinlevel . . . . .	89
4.6	Zweidimensionale Gel-Elektrophorese – Grenzen und Möglichkeiten . . . . .	90
4.6.1	Grenzen . . . . .	90
4.6.2	Möglichkeiten . . . . .	90
4.6.3	Vergleich mit anderen Methoden . . . . .	90

4.7	Ausblick . . . . .	91
4.7.1	Genauere Betrachtung einzelner Proteine . . . . .	91
4.7.2	Identifizierung weiterer Proteinspots . . . . .	92
4.7.3	Analyse der frühen Stadien . . . . .	92
4.7.4	Vergleich mit anderen Modellen . . . . .	92
4.7.5	Auffinden von Proteinen geringerer Konzentration . . . . .	93
4.7.6	Einfluss des Prion-Proteins: Knockout-Mäuse . . . . .	93
4.7.7	Gewebe ohne nachweisbaren Erreger . . . . .	93
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>97</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>99</b>
	<b>Anhang</b>	<b>115</b>
<b>A</b>	<b>Standardgele</b>	<b>117</b>
A.1	Milz-Überstand . . . . .	117
A.2	Milz-Rückstandsextrakt . . . . .	118
A.3	Milz-Rückstandssuspension . . . . .	119
A.4	Gehirn-Gesamtextrakt . . . . .	120
<b>B</b>	<b>Tabellen der veränderten Spots</b>	<b>121</b>
B.1	Differentielle Spots Milz-Überstand . . . . .	121
B.2	Differentielle Spots Milz-Rückstandsextrakt . . . . .	123
B.3	Differentielle Spots Milz-Rückstandssuspension . . . . .	127
B.4	Differentielle Spots Gehirn-Gesamtextrakt . . . . .	129
<b>C</b>	<b>Proteintabellen</b>	<b>135</b>
C.1	Milz-Überstand . . . . .	136
C.2	Milz-Rückstandsextrakt . . . . .	141
C.3	Milz-Rückstandssuspension . . . . .	152
C.4	Gehirn-Gesamtextrakt . . . . .	154



## Abkürzungsverzeichnis

↑	Stärkere Spots
↓	Schwächere Spots
+	Leicht stärkere Spots
++	Deutlich stärkere Spots
+++	Sehr deutlich stärkere Spots
–	Leicht schwächere Spots
--	Deutlich schwächere Spots
---	Sehr deutlich schwächere Spots
Σ↑	Summe aller stärkeren Spots
Σ↓	Summe aller schwächeren Spots
Σ	Summe aller veränderten Spots
2-DE	Zweidimensionale Gel-Elektrophorese
AD	Alzheimersche Krankheit (»Alzheimer's Disease«)
AS	Aminosäure(n)
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CHAPS	3-[(3-Chloramidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CJK	Creutzfeld-Jakob-Krankheit
CWD	»Chronic Wasting Disease«
DTT	Dithiothreitol
EEG	Elektroenzephalographie
ESI	»Electrospray Ionisation«
EUE	Exotische Huftier Enzephalopathie (»Exotic Ungulate Encephalopathy«)
FDC	Follikulär dendritische Zellen
FFI	Fatale Familiäre Insomnie
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie
G	Gehirn
GE	Gesamtextrakt
GFAP	Saures Gliafaserprotein (»Glial Fibrillary Acidic Protein«)
GGE	Gehirn Gesamtextrakt
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HD	Chorea Huntington (»Huntington's Disease«)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
kDa	Kilodalton
LRS	lymphoretikuläres System
M	Molar (Mol/Liter)
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorptions-Ionisation (»Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation«)
MI	Milz

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

MIÜ	Milz-Überstand
MIRE	Milz-Rückstandsextrakt
MIRS	Milz-Rückstandssuspension
mRNA	Boten-(»messenger-«)RNA
MS	Massenspektrometrie
n. I.	nach Infektion
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
pI	isoelektrischer Punkt
PK	Proteinase K
Prion	» <b>proteinaceous infectious particle</b> «, wobei die exakte Abkürzung »Proin« zugunsten der besseren Aussprache in Prion geändert wurde
PrP	Prion-Protein
PrP <sup>0/0</sup>	Prion-Protein-Knockout
PrP <sub>27-30</sub>	Prion-Protein-Rest nach PK-Verdau
PrP <sup>C</sup>	zelluläres Prion-Protein
PrP <sup>Sc</sup>	fehlgefaltetes Prion-Protein
RE	Rückstandsextrakt (membranassoziierte Proteinfraktion)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (18–25 °C)
RS	Rückstandssuspension (Kernfraktion)
SDS	Natriumdodecylsulfat (»Sodiumdodecylsulfate«)
TME	Transmissible Enzephalopathie der Nerze (»Transmissible Mink Encephalopathy«)
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie(n)
Ü	Überstand (lösliche Proteinfraktion)
vCJK	variante Creutzfeld-Jakob-Krankheit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
ZNS	Zentralnervensystem

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des zellulären Maus-Prion-Proteins . . . . .	5
1.2	Dreidimensionale PrP-Struktur . . . . .	6
1.3	Histologische und Immunhistochemische Veränderungen . . . . .	10
3.1	Detektion des PrP <sup>Sc</sup> in der Milz mittels Immunoblot . . . . .	31
3.2	Detektion des PrP <sup>Sc</sup> im Gehirn mittels Immunoblot . . . . .	33
3.3	Verteilung der Spots und Proteine des Milz-Überstandes in Proteinklassen . .	34
3.4	Verteilung der Spots und Proteine des Milz-Rückstandsextraktes in Proteinklassen . . . . .	37
3.5	Verteilung der Spots und Proteine der Milz-Rückstandssuspension in Proteinklassen . . . . .	40
3.6	Verteilung der Spots und Proteine des Gehirn-Gesamtextraktes in Proteinklassen	42
3.7	Moesin (Membrane-Organizing Extension Spike Protein) in Milz und Gehirn .	44
3.8	Elongation Factor 1 Alpha (Eef1A1) in Milz und Gehirn . . . . .	45
3.9	Tu Translation Elongation Factor (Tufm) in Milz und Gehirn . . . . .	46
3.10	Ubiquinol-Cytochrome-C Reductase Core Protein 2 in Milz und Gehirn . . . .	46
3.11	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K (HnrpK) in Milz und Gehirn . .	47
3.12	Proteasome Subunit Alpha Type 3 in mehreren Milzfraktionen . . . . .	48
3.13	Gelsolin in mehreren Milzfraktionen . . . . .	48
3.14	Ezrin (p81, Cytovillin, Villin 2) in mehreren Milzfraktionen . . . . .	49
3.15	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 (HnrpA1) in mehreren Milzfraktionen . . . . .	50
3.16	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2B1 (HnrpA2B1) in mehreren Milzfraktionen . . . . .	51
3.17	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A3 (HnrpA3) in mehreren Milzfraktionen . . . . .	52
3.18	Isospots im Milz-Überstand . . . . .	53
3.19	Isospots im Milz-Rückstandsextrakt . . . . .	54
3.20	Isospots in der Milz-Rückstandssuspension . . . . .	56
3.21	Isospots im Gehirn . . . . .	57
3.22	Der unidentifizierte Spot MIÜ-B35 in allen drei Stadien des Milz-Überstandes	59
3.23	Der unidentifizierte Spot MIÜ-A01 in zwei Stadien des Milz-Überstandes . . .	60
3.24	14-3-3 Protein Eta in zwei Stadien des Milz-Überstandes . . . . .	60
3.25	Gelsolin in zwei Stadien des Milz-Überstandes . . . . .	61
3.26	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K in zwei Stadien des Milz- Überstandes . . . . .	62
3.27	Glia Maturation Factor Gamma (GMF-Gamma) in zwei Stadien des Milz- Überstandes . . . . .	62

3.28 Peroxiredoxin 2 in zwei Stadien des Milz-Überstandes . . . . .	63
3.29 Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 (HnrpA1) in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes . . . . .	64
3.30 Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2B1 (HnrpA2B1) in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes . . . . .	64
3.31 Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein D in zwei Stadien des Milz- Rückstandsextraktes . . . . .	65
3.32 Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K (HnrpK) in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes . . . . .	66
3.33 Dihydrolipoamide S-Succinyltransferase (E2 Component of 2-oxo-Glutarate Complex) in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes . . . . .	66
3.34 (Beta-)Aktin in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes . . . . .	67
3.35 Caldesmon 1 in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes . . . . .	68
3.36 ELAV-like 1 in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes . . . . .	68
3.37 Polyadenylate-binding Protein 1 in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes	69
3.38 Proteasome Subunit Alpha Type 2 in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes	70
3.39 Proteasome Subunit Alpha Type 3 in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes	70
3.40 Proteasome Subunit Alpha type 6 in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes	71
3.41 Proteasome Subunit MC13 in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes . . .	71
3.42 Nucleophosmin in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes . . . . .	72
3.43 Stathmin in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes . . . . .	73
3.44 Ribosomal Protein RS.40K in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes . . .	73
3.45 Nascent Polypeptide-associated Complex Alpha Polypeptide in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes . . . . .	74
3.46 Sideroflexin 3 in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes . . . . .	74
3.47 Polypyrimidine Tract Binding Protein in zwei Stadien des Milz- Rückstandsextraktes . . . . .	75
3.48 Chaperonin in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes . . . . .	76
3.49 Glutamate Dehydrogenase in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes . . .	76
3.50 Fumarate Hydratase 1 in zwei Stadien des Milz-Rückstandsextraktes . . . . .	77
3.51 GFAP in den vier Stadien des Gehirn-Gesamtextraktes . . . . .	78
3.52 Der unidentifizierte Spot GGE-B079 in den vier Stadien des Gehirn- Gesamtextraktes . . . . .	79
3.53 $\alpha$ -B-Crystallin in drei Stadien des Gehirn-Gesamtextraktes . . . . .	79
3.54 Ubiquinol Cytochrome C Reductase Core Protein 2 in drei Stadien des Gehirn- Gesamtextraktes . . . . .	80
3.55 Cystatin C Precursor in drei Stadien des Gehirn-Gesamtextraktes . . . . .	81
3.56 Chain A, Crystal Structure Of Murine Arl3-Gdp in drei Stadien des Gehirn- Gesamtextraktes . . . . .	81
A.1 Repräsentatives 2D-Gel des Milz-Überstandes . . . . .	117
A.2 Repräsentatives 2D-Gel des Milz-Rückstandsextraktes . . . . .	118
A.3 Repräsentatives 2D-Gel der Milz-Rückstandssuspension . . . . .	119
A.4 Repräsentatives 2D-Gel des Gehirn-Gesamtextraktes . . . . .	120

## Tabellenverzeichnis

2.1	Fraktionierte Extraktion aus Milzgewebe, Überstand . . . . .	18
2.2	Fraktionierte Extraktion aus Milzgewebe, Rückstandsextrakt . . . . .	20
2.3	Fraktionierte Extraktion aus Milzgewebe, Rückstandssuspension . . . . .	21
2.4	Gesamtextraktion aus Gehirngewebe . . . . .	22
3.1	Proteinklassen Milz-Überstand . . . . .	34
3.2	Proteine im Milz-Überstand . . . . .	35
3.3	Proteinklassen Milz-Rückstandsextrakt . . . . .	36
3.4	Proteine im Milz-Rückstandsextrakt . . . . .	37
3.5	Proteinklassen Milz-Rückstandssuspension . . . . .	39
3.6	Proteine in der Milz-Rückstandssuspension . . . . .	40
3.7	Proteinklassen Gehirn-Gesamtextrakt . . . . .	41
3.8	Proteine im Gehirn-Gesamtextrakt . . . . .	42
B.1	Differentielle Spots Milz-Überstand . . . . .	121
B.2	Differentielle Spots Milz-Rückstandsextrakt . . . . .	123
B.3	Differentielle Spots Milz-Rückstandssuspension . . . . .	127
B.4	Differentielle Spots Gehirn-Gesamtextrakt . . . . .	129
C.1	Proteinidentität und -funktion Milz-Überstand . . . . .	136
C.2	Proteinidentität und -funktion Milz-Rückstandsextrakt . . . . .	141
C.3	Proteinidentität und -funktion Milz-Rückstandssuspension . . . . .	152
C.4	Proteinidentität und -funktion Gehirn . . . . .	154



# 1 Einleitung

Eine Gruppe von Krankheiten ist in den vergangenen Jahren verstärkt ins Blickfeld der Öffentlichkeit und auch der Forschung gerückt: Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE). Auslöser für das verstärkte Interesse war die als Rinderseuche BSE bekannte Bovine Spongiforme Enzephalopathie.

Unter TSE versteht man neurodegenerative Erkrankungen, deren Krankheitsverläufe nach üblicherweise sehr langer Inkubationszeit stetig fortschreiten. Charakteristisch ist eine fehlende zelluläre und humorale Immunantwort, einhergehend mit Störungen des Zentralnervensystems (ZNS) und massivem Nervenzellsterben mit Vakuolisierung im Gehirn. Dies führt zu Ataxie und Demenz. Die Erkrankungen sind letal. Trotz langjähriger Forschungsbemühungen sind Impfstoffe oder Therapien gegen TSE-Erkrankungen noch immer nicht verfügbar. Forschergruppen weltweit suchen mittels unterschiedlicher Forschungsansätze nach Therapeutika.

Die Vakuolisierung im Gehirn verleiht dem Organ ein schwammartiges (spongiformes) Aussehen und verhalf der Krankheitsgruppe zu ihrem Namen. Darüber hinaus treten auch Ablagerungen aus Proteinzusammenschlüssen auf. Aufgrund dieser Proteinablagerungen ist eine Ähnlichkeit zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Chorea Huntington (»Huntington's Disease«, HD) oder der Alzheimer-Krankheit (Morbus Alzheimer, »Alzheimer's Disease«, AD) zu erkennen.

## 1.1 Geschichte der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien

Als erste bekannte TSE wurde im 18. Jahrhundert Scrapie beschrieben [133]. Die bei Schafen und Ziegen beinahe weltweit vorkommende Erkrankung äußert sich bei beiden Tierarten durch starken Juckreiz (der Name leitet sich vom englischen Wort für kratzen ab: »to scrape«) und Koordinationsstörungen, welche den Gang der Tiere stakend und trabend erscheinen lassen. Dies führte zu der deutschen Bezeichnung »Traberkrankheit« oder »Trab«. Die Übertragung kann auf natürlichem Wege grundsätzlich auf zwei Arten erfolgen: Während der Geburt oder kurz danach von der Mutter auf das Neugeborene (vertikal) [146, 147] oder horizontal durch die Umgebung, wenn diese beispielsweise durch Nachgeburten kontaminiert wurde [146, 147].

Eine experimentelle Übertragung des Scrapie-Erregers auf viele andere Tierarten ist möglich, darunter Mäuse, Hamster und Affen [58]. Seit den 60er-Jahren haben vor allem Untersuchungen am Modellorganismus Maus dazu beigetragen, den Erreger intensiv zu erforschen, denn die Haltung der kleinen Nager ist wesentlich einfacher und kostengünstiger als die Haltung von Schafen. Darüber hinaus liegt die Inkubationszeit ebenfalls deutlich unter der bei Schafen und Ziegen, was schneller zu Ergebnissen führt.

Es sind verschiedene Scrapie-Stämme bekannt, welche ein differenziertes Erscheinungsbild der Erkrankung erzeugen [51, 13, 162]. Bei der Empfänglichkeit des Tieres für das infektiöse Agens spielt zudem vermutlich der Genotyp des Wirtes eine Rolle [80]: Ist die Sequenzhomologie des Prion-Proteins (PrP) zwischen Donor und Empfänger groß, so ist auch die Wahrscheinlichkeit hoch, dass das infektiöse Agens sich in seinem neuen Wirt etablieren kann.

Es scheint, dass die bis in die 1990er-Jahre gängige Praxis, Tierkadaver in Form unzureichend sterilisierten Tiermehls an Wiederkäuer und andere Nutztiere zu verfüttern, es dem Scrapie-Erreger ermöglichte, sich an andere Spezies zu adaptieren [103]. Als Folge entwickelte sich die bei Rindern 1986 erstmalig beschriebene BSE [184]. Zwar trat 1988 ein Verbot in Kraft, Tiermehl an Wiederkäuer zu verfüttern, das zum Oktober 1990 sogar auf sämtliche Nutztiere ausgedehnt wurde. Es ist indes unklar, inwieweit eine BSE-Inzidenz aufgrund der horizontalen und vertikalen Übertragbarkeit von Rind zu Rind erhalten bleibt.

Die experimentelle Übertragbarkeit des BSE-Erregers auf Makaken [118] und andere nicht-humane Primaten [17] erhärtet den Verdacht, dass BSE auch auf den Menschen übertragen werden kann. Der Verzehr BSE-kontaminierten Rindfleisches wird für die neuartige Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit (vCJK) des Menschen verantwortlich gemacht. Eine Reihe von Untersuchungen zeigen, dass die Läsionsprofile im Hirn experimentell erzielter Übertragungen von vCJK und BSE sehr wahrscheinlich von demselben infektiösen Agens verursacht werden [44, 35, 89]. Der Vergleich der identischen Glykosylierungsmuster der Prion-Proteine bei BSE und vCJK gibt einen weiteren Hinweis auf den Zusammenhang zwischen beiden Erkrankungen [44].

Im Gegensatz zu der Mitte der 1990er-Jahre erstmals auftretenden vCJK ist die klassische CJK bereits 1920 von den Neurologen Hans-Gerhard Creutzfeld [47] und Alfons Jakob [93] beschrieben worden. Die Prävalenz dieser sehr seltenen Erkrankung beträgt 1–2 pro eine Million Einwohner und Jahr und äußert sich wie alle TSE-Erkrankungen durch Demenz und Ataxie. Die klassische CJK tritt in 85 bis 90 % der Fälle spontan ohne erkennbaren Auslöser auf (sporadische Form). Familiär oder genetisch durch Punkt- oder Insertions-Mutationen des PrP-codierenden Gens *PRNP* bedingt sind etwa 10–15 % der Fälle. Darüber hinaus ist bei 1–5 % der CJK-Fälle eine iatrogene Übertragung durch kontaminierte medizinische Instrumente, Transplantationen (infizierte Hornhaut oder Dura Mater (Harte Hirnhaut)) oder durch Gabe von Wachstumshormonen (gewonnen aus humanen Hypophysen) zu beobachten [31].

Im Unterschied zur klassischen CJK ist bei der vCJK das Überlebensalter der Patienten deutlich herabgesetzt und liegt bei etwa 35 Jahren gegenüber rund 65 Jahren bei der klassischen CJK. Der Krankheitsverlauf ist von ca. 6 Monaten auf bis zu 2 Jahre verlängert. Auch die typisch veränderten Muster der Elektroenzephalographie (EEG) der CJK-Patienten fehlen bei der vCJK.

Weiter gehören zu den humanen TSE-Erkrankungen die Kuru der Fore-People Papua-Neuguineas [73], das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) [74] und die Fatale Familiäre Schlaflosigkeit (»Fatal Familial Insomnia«, FFI) [128].

Neben den bereits erwähnten TSE Scrapie und BSE sind noch weitere tierische Transmissible Spongiforme Enzephalopathien bekannt. Die Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE) [121] von Katzen tritt sowohl bei Haustieren als auch bei Großkatzen in Zoos



auf, welche zumindest als Jungtiere in Großbritannien gehalten und mit rohen Schlachtabfällen gefüttert wurden. Es liegt die Annahme nahe, dass es sich um eine Form der BSE handelt, welche die Speziesbarriere Rind-Katze überwunden hat, fiel doch der erste Ausbruch der FSE in den 1990ern mit der größten BSE-Verbreitung in Großbritannien zusammen.

Die »Chronic Wasting Disease« (CWD) nordamerikanischer Hirsche und Elche ist die einzige TSE, welche ebenso bei in Gefangenschaft gehaltenen wie wildlebenden Tieren auftritt [136]. Weiterhin sind die Exotische Huftier Enzephalopathie (»Exotic Ungulate Encephalopathy«, EUE) und die Übertragbare Enzephalopathie der Nerze (»Transmissible Mink Encephalopathy«, TME) [39, 86] bekannt.

## 1.2 Die Natur des Erregers

Lange blieb unklar, welches infektiöse Agens für Transmissible Spongiforme Enzephalopathien verantwortlich ist. Die infizierten Wirte weisen einen normalen Immunstatus auf [12, 104], dennoch konnte bislang keine Immunreaktion aufgrund der Infektion gezeigt werden [29, 45]. Zudem liegt eine äußerst ungewöhnliche Resistenz gegen die bei herkömmlichen Erregern wirksamen Desinfektions- und Inaktivierungsmittel vor. Starke Hitze, ultraviolette oder ionisierende Strahlung, Formalin oder Alkohol vermögen die Erreger der diversen TSE-Erkrankungen nicht effektiv zu inaktivieren [76, 176, 102, 30, 161, 178, 177, 2, 170]. Auch Salze, Detergenzien, Nukleasen und Phospholipidasen wirken schlecht bis gar nicht [32]. Dagegen erzielte man mit proteindenaturierenden Methoden Erfolge [153, 150, 165]. Medizinische Instrumente können zur Desinfektion einer Behandlung entweder mit 2 M Natronlauge, 2,5–5 % Natriumhypochlorid oder 4 M Guanidiniumisothiocyanat für jeweils zweimal 30 Minuten mit einem mechanischen Zwischenreinigungsschritt unterzogen werden. Für eine vollständige Hitzeinaktivierung muss eine Dampfsterilisation von mindestens einer Stunde bei 134 °C und 2 bar erfolgen, denn eine Behandlung nach üblichen Bedingungen (20 Minuten autoklavieren bei 121 °C) hinterlässt eine Restinfektiosität von rund 5 % [157, 158].

Die Erreger der unterschiedlichen TSE-Erkrankungen sind im Allgemeinen sehr gut an eine bestimmte Spezies adaptiert. Wird ein Erreger auf eine andere Spezies übertragen, so verlängert sich die Inkubationszeit bis zum ersten Auftreten klinischer Symptome, oder die Krankheit bricht gar nicht aus [33, 90]. Dafür wird die sogenannte Speziesbarriere verantwortlich gemacht [152]. Zur Charakterisierung der an einen Organismus angepassten Erregerstämme wird die Inkubationszeit, das Glykosylierungsmuster, die Ausprägung des Läsionsprofils und die Verteilung und Ausprägung der Amyloidose und Astrozytose im Gehirn herangezogen [51, 13, 162]. Allein beim Modellorganismus Maus können über 20 verschiedene Erregerstämme voneinander abgegrenzt werden [53, 34].

Das bereits erwähnte Glykosylierungsmuster des Prion-Proteins zeichnet sich durch drei im Western Blot als einzelne Banden sichtbare Glykosylierungsformen aus. Diese resultieren aus einer unterschiedlichen Besetzung zweier Glykosylierungsstellen in einem als Prion bezeichneten Protein (siehe Abschnitt 1.2.1). Die relative Verteilung der unglykosylierten, einfach glykosylierten und zweifach glykosylierten Form des Prion-Proteins scheint spezifisch für verschiedene Stämme zu sein [89, 169] und bleibt auch nach Passage in andere Spezies oder Spezieslinien erhalten [99, 115].

Eine weitere Besonderheit des infektiösen Agens ist seine hohe Resistenz gegenüber Proteinase K (PK). Während Proteinasen im allgemeinen Proteine vollständig degradieren, vermag PK das Prion-Protein nur unvollständig zu spalten. Das Enzym schneidet am Amino-Terminus lediglich 68 Aminosäuren ab, so dass im Western Blot ein Bandenmuster mit verringertem Molekulargewicht zu erkennen ist.

### 1.2.1 Die Prion-Hypothese

Aufgrund seiner unüblichen Eigenschaften ordnete Stanley Prusiner 1982 das infektiöse Agens der TSE einer neuartigen Erregerklasse zu und bezeichnete es als »Prion« (»**proteinaceous infectious particle**«, wobei die exakte Abkürzung »Proin« zugunsten der besseren Aussprache in Prion geändert wurde) [150]. Das Prion-Protein ist als einziges Molekül in jeglicher infektiöser Erregerpräparation zu finden und stellt das hauptsächliche, wenn nicht gar alleinige infektiöse Agens dar [150, 151]. Prusiner bezeichnet die infektiöse Form des PrP (**Prion-Protein**) als PrP<sup>Sc</sup>. Sie gilt als eine fehlgefaltete Form des im Organismus regulär vorkommenden zellulären Prion-Proteins PrP<sup>C</sup>. Aus dem PrP<sup>C</sup> wird bei Kontakt mit PrP<sup>Sc</sup> durch posttranslationale Konformationsänderung die fehlgefaltete Form des Proteins.

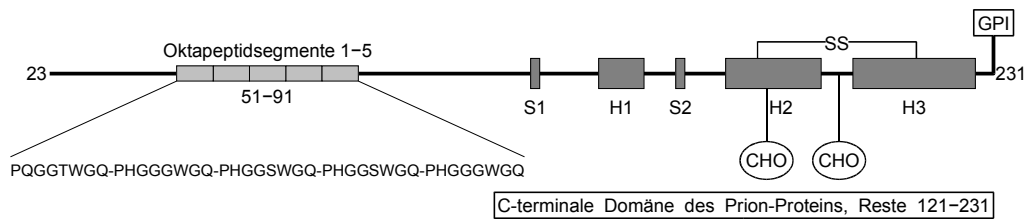
PrP<sup>Sc</sup> ist durch seine PK-Resistenz charakterisiert und bleibt auch durch den PK-Verdau als »Rest PrP<sub>27-30</sub>« infektiös. Das Auftreten mehrerer Gelbanden nach dem PK-Verdau ist auf die heterogene Glykosylierung des Prion-Proteins zurückzuführen. PrP<sup>Sc</sup> vermag zu Fibrillen zu aggregieren, den sogenannten »Prion-Rods« (auch »Scrapie associated fibrils«, kurz SAFs, genannt) [159], welche sich in Form amyloider Ablagerungen zu größeren Plaques ausbilden können.

Vor diesem Hintergrund lässt sich erklären, weshalb die infizierten Organismen keine Immunreaktion zeigen: Sowohl das PrP<sup>C</sup> als auch das PrP<sup>Sc</sup> stellen eine vom Wirt codierte, körpereigene Aminosäuresequenz dar, deren Unterschied lediglich in der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins besteht [6]. Das Immunsystem sieht das PrP<sup>Sc</sup> wahrscheinlich ebenso als körpereigen und damit nicht als Fremdkörper an wie das PrP<sup>C</sup>, da ihm eine Unterscheidung zwischen den beiden Faltungsformen PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> bei gleicher Aminosäuresequenz offenbar nicht möglich ist.

#### 1.2.1.1 Das zelluläre Prion-Protein (PrP<sup>C</sup>)

Das bereits in mehreren Organismen nachgewiesene zelluläre Prion-Protein PrP<sup>C</sup> ist ein Glykoprotein, welches mittels einer Glykosylphosphatidylinositol-Einheit (GPI-Anker) am Carboxy-Terminus des Proteins auf der Außenseite der Zellmembran angeheftet ist. Es ist ein unter zellulären Bedingungen lösliches Monomer von 33–35 kDa [142] und wird in verschiedenen Zelltypen exprimiert. Neurone [113], Mikroglia [26], Astro- und Oligodendrozyten [139], aber auch nicht neuronale Zellen wie Lymphozyten [41], folliculäre dendritische Zellen (FDC) [132] und Muskelzellen [26] tragen PrP<sup>C</sup> auf ihrer Oberfläche.

PrP<sup>C</sup> ist reich an  $\alpha$ -Helices, die mehr als 40 % der Konformation ausmachen [144]. Zusätzlich zu den drei  $\alpha$ -Helices der carboxy-terminalen Domäne (Rest 121–231) konnte dort auch ein kurzes antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt identifiziert werden, wohingegen das amino-terminale Polypeptidsegment 23–120 keine definierte Struktur aufweist, sondern



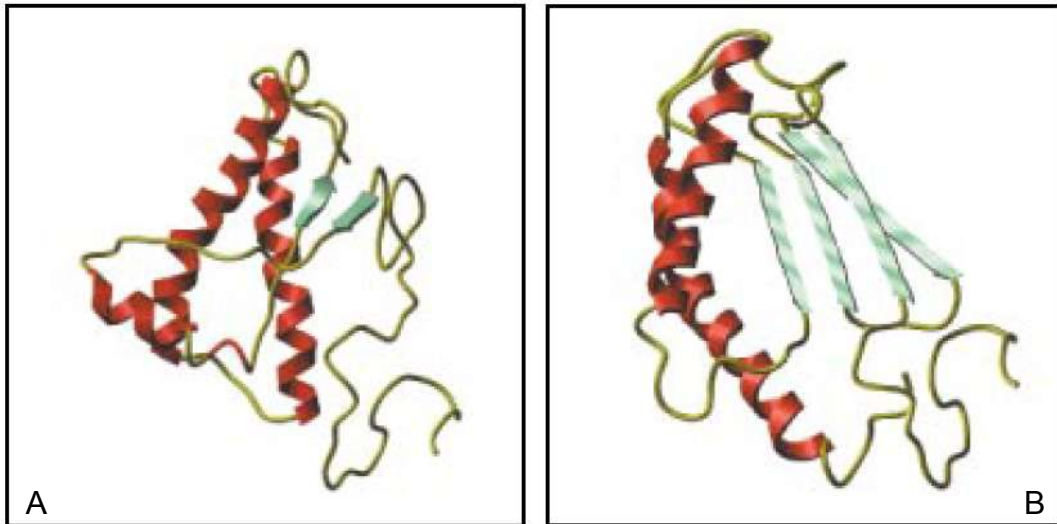
**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung des zellulären Maus-Prion-Proteins mit seinen posttranslationalen Modifikationen (nach Glockshuber [79], Numerierung der Aminosäuren (AS) analog zum humanen PrP). An den Resten Asn 181 und Asn 197 wird das PrP<sup>C</sup> glykosyliert (CHO) und zwischen den beiden einzigen Cysteinresten Cys 179 und Cys 214 bildet sich eine Disulfidbrücke aus (SS). Am C-ständigen Ser 231 wird der GPI-Anker angehängt. Lediglich die C-terminale Domäne (Reste 121–231) besitzt eine definierte, gefaltete Struktur. Diese besteht aus einem kurzen  $\beta$ -Faltblatt (S1, S2) und drei  $\alpha$ -Helices (H1–H3); siehe dazu auch Abb. 1.2.A. Der unstrukturierte, flexible N-Terminus (Reste 23–120) beinhaltet fünf sich wiederholende Oktapeptidsequenzen zwischen den AS 51–91 (hellgrau unterlegt), die als vierfache Kupferionenbindestelle identifiziert wurden [180].

dynamisch hoch beweglich ist [154]. Zwischen den beiden Cysteinresten Cys 179 und Cys 214 bildet sich eine Disulfidbrücke aus, und auch die beiden Glykosylierungsstellen (Asn 181 und Asn 197) des Proteins liegen im hochstrukturierten C-terminalen Bereich. Die dem Protein eigene Oktapeptidsequenz hingegen liegt in der unstrukturierten Region zwischen den AS 51–91. In Abb. 1.1 ist eine schematische Darstellung des Maus-Prion-Proteins zu sehen. Eine computergenerierte mögliche dreidimensionale Struktur des PrP<sup>C</sup> enthält Abb. 1.2.

Das PrP<sup>C</sup> weist eine konservierte Sequenz zwischen den bislang untersuchten Spezies auf. So betragen z. B. innerhalb der Mammalia die Homologien bis zu 90 % [191]. Die biologische Bedeutung konnte allerdings noch nicht vollständig geklärt werden. Möglicherweise dient das PrP<sup>C</sup> dazu, Kupferionen zu binden [172, 137]. Vier Kupferionen an der hoch konservierten Oktapeptidregion [180] des flexiblen Amino-Terminus des PrP<sup>C</sup> verleihen dem Protein eine Superoxiddismutase-Aktivität, welche Einfluss auf die Resistenz gegen freie Radikale und damit gegenüber oxidativem Stress in der Zelle haben könnte [27].

### 1.2.1.2 Das fehlgefaltete Prion-Protein (PrP<sup>Sc</sup>)

Das PrP<sup>Sc</sup> weist eine andere Konformation auf als das zelluläre PrP. Hauptsächlich ist es aus  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut (ca. 43 %),  $\alpha$ -Helices machen nur 30 % der Konformation aus [160]. In dieser an  $\beta$ -Faltblättern reichen Form ist das Protein weniger gut wasserlöslich als in der zellulären Isoform. Es wird nicht mehr metabolisiert, neigt zur Aggregation und lagert sich schließlich in Form amyloider Fibrillen bis hin zu großen Plaques ab. Eine exakte Aufklärung der Sekundär- und Tertiärstruktur des PrP<sup>Sc</sup> ist daher aufgrund der ungünstigen biophysikalischen Eigenschaften schwierig. Eine mögliche Konformation ist in Abb. 1.2 dargestellt.



**Abbildung 1.2:** Darstellung der dreidimensionalen Struktur des Prion-Proteins durch computergenerierte Modelle. **A:** PrP<sup>C</sup>, reich an  $\alpha$ -Helices und mit nur einem kurzen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt; **B:** PrP<sup>Sc</sup> mit überwiegend  $\beta$ -Faltblättern (nach [171]).

### 1.2.1.3 Erreger-Replikation: Von der zellulären zur pathogenen Form des Prion-Proteins

Untersuchungen an Knockout-Mäusen, die keinerlei PrP exprimieren (PrP<sup>0/0</sup>), ergaben, dass eine Infektion dieser Tiere mit dem Scrapie-Erreger nicht möglich ist [36, 163]. Die zelluläre Isoform des Prion-Proteins wurde daraufhin als essentiell für die Infektion angesehen. Die Infektion transgener Mäuse, welche PrP<sup>C</sup> überexprimierten, resultierte in einer verkürzten Inkubationszeit der Tiere [38]. Zudem korreliert das Maß der PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen mit dem Expressionslevel des PrP<sup>C</sup>: Infiziert man heterozygote Mäuse (PrP<sup>+/-</sup>), so beobachtet man eine deutlich verlängerte Inkubationszeit und eine Verminderung des PrP<sup>Sc</sup>-Akkumulationslevels auf etwa 50 % dessen einer Wildtypmaus [36, 164].

Ein wesentlicher, wenn nicht sogar der bedeutendste Unterschied der beiden Isoformen des PrP ist ihre räumliche Struktur. Wie diese Umwandlung *in vivo* stattfindet, blieb lange Zeit spekulativ. Heute geht man davon aus, dass einzelne PrP<sup>Sc</sup>-Moleküle in der Lage sind, zelluläre Prion-Proteine bei Kontakt zu einer Umfaltung in die an  $\beta$ -Faltblättern reiche Struktur anzuregen. Möglicherweise spielt ein Protein X genanntes Chaperon dabei eine wichtige Rolle [151]. Die neu entstandenen PrP<sup>Sc</sup>-Monomere sind nun ihrerseits in der Lage, weiteres PrP<sup>C</sup> zur Umfaltung in PrP<sup>Sc</sup> zu veranlassen. Auf diese Weise erfolgt die Replikation des infektiösen Agens [144, 141]. Die erst nach erfolgter Transformation von PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> entstehenden Amyloidfibrillen und größeren Akkumulate werden vielfach erst als Folgephänomen angesehen, welchem bei den Überlegungen zu Replikationsmodellen häufig nur sekundäre Bedeutung beigemessen wird [83, 151].

## 1.2.2 Weitere Erreger-Hypothesen

Seit Prusiner seine Prion-Hypothese formulierte, wird diese von einer breiten wissenschaftlichen Basis akzeptiert. Es existieren jedoch noch weitere Hypothesen.

Die **Virus-Hypothese** geht von einem bislang unbekanntem, langsam wirkenden Virus (»slow virus«) aus, dessen Nukleinsäure scrapiespezifisch sei [59, 129]. Im Gegensatz zur Prion-Hypothese kann mit der Existenz eines viralen Erregers das Vorhandensein verschiedener Stämme leichter erklärt werden. In der Tat konnten bereits einige Experimente eine Entkopplung von Infektiosität und PrP<sup>Sc</sup> darlegen [119, 91, 88]. Man geht davon aus, dass das PrP<sup>Sc</sup> für die Infektion nicht essentiell ist, sondern vielmehr eine kleine Nukleinsäure dafür verantwortlich sein muss. Für diese dient PrP<sup>C</sup> als Rezeptor und wird anschließend in PrP<sup>Sc</sup> transformiert. Bei PrP<sup>0/0</sup>-Mäusen fehlt demnach der Rezeptor, was die Resistenz dieser Tiere gegenüber der Infektion mit Prionen erklärt. Ein Nachweis solcher infektiöser Nukleinsäure gelang bisher noch nicht [60].

Bei der **Virino-Hypothese** geht man ebenfalls vom Vorhandensein einer erregerspezifischen Nukleinsäure aus, welche sehr klein, nicht-codierend und wirtsfremd ist. Anders als bei der Virus-Hypothese soll hier allerdings ein wirtseigenes Protein, wahrscheinlich das Amyloidprotein, die Nukleinsäure umhüllen [54]. Dieser Ansatz wurde in den letzten Jahren jedoch nicht weiter verfolgt.

Die »**Unified Hypothesis**« ist ein Vorschlag von Weissmann [182] und beruht auf einer Kombination der Prion- und Virus-Hypothesen-Ansätze. Ihm zufolge könnte das als Holoprion bezeichnete infektiöse Agens sich aus dem pathogenen Apoprion (PrP<sup>Sc</sup>) und dem Coprion (bestehend aus einer Nukleinsäure) zusammensetzen. Das Coprion solle für die Stammspezifität verantwortlich sein. Demnach müsste die komplette Zerstörung oder der Austausch der Nukleinsäure eine Änderung oder gar den Verlust der Stammspezifität zur Folge haben. Auch dieser Ansatz wird nicht weiter verfolgt.

## 1.3 Prionenausbreitung, Klinik und Diagnostik

Zumindest im tierischen Organismus stellt die orale Übertragung den natürlichen Infektionsweg der Prionen dar. Experimentell werden aber auch andere gängige Infektionsmethoden angewandt, welche sich in Effizienz und Inkubationszeit unterscheiden: Subkutan (s. c.), intravenös (i. v.), intraperitoneal (i. p.) und intrazerebral (i. c.). Letztere erweist sich als effizienteste Methode bei der Passage innerhalb einer Spezies.

### 1.3.1 Das lymphoretikuläre System und die Rolle der Milz

Im lymphoretikulären System (LRS) der meisten Mausmodelle lässt sich bereits wenige Tage nach der peripheren Infektion (oral, intraperitoneal) das Prion-Protein samt Infektiosität nachweisen, insbesondere in der Milz. Während der nächsten Wochen steigt die Infektiosität zunächst stetig an, bis sie schließlich weitgehend konstant verharrt. Wie bereits in Abschnitt 1.2.1.3 beschrieben, ist zur Erregerausbreitung zwingend PrP<sup>C</sup> notwendig. PrP<sup>0/0</sup>-Mäuse waren gegenüber einer intraperitonealen Infektion immun [36]. Das lymphoretikuläre System, in welchem PrP<sup>C</sup> exprimiert wird (siehe Abschnitt 1.2.1.1), spielt eine wichtige Rolle bei der peripheren Erregerausbreitung [101]. Geht man von der

Notwendigkeit PrP<sup>C</sup>-exprimierender Zellen für eine Erregerausbreitung aus, so kommen im LRS zu allererst die folliculären dendritischen Zellen (FDC) in Lymphgewebe und Milz in Frage. In den FDC infizierter Mäuse kann man akkumuliertes PrP<sup>Sc</sup> nachweisen [105]. Follikuläre dendritische Zellen spielen eine wichtige Rolle im Reifungsprozess von B-Zellen. Transgene Mäuse, bei denen die Ausdifferenzierung der B-Lymphozyten oder die B-Zellantwort gestört ist, konnten auf intraperitonealem Wege nicht oder nur sehr ineffizient infiziert werden. Dagegen verlief eine intrazerebrale Inokulation erfolgreich [107, 68, 119]. Dieser Effekt wurde dem Fehlen von FDC zugeschrieben. Doch es blieb unbekannt, welche Funktion diese Zellen in der Scrapie-Pathogenese einnehmen [28, 105]. Studien haben gezeigt, dass FDC-defiziente Mäuse sich intraperitoneal nicht infizieren lassen [28, 127, 138]. Weitere Studien haben zwischenzeitlich ergeben, dass die reifen folliculären dendritischen Zellen im Ganzen nicht für die Infizierbarkeit verantwortlich sein können, sondern dass vielmehr Subkomponenten des lymphoretikulären Systems die Scrapie-Pathogenese ermöglichen [108, 126, 149].

Untersuchungen an milzlosen Mäusen, welche gentechnisch erzeugt (Asplenie) oder einer chirurgischen Milzentfernung (Splenektomie) unterzogen worden waren, erkrankten nach anschließender experimenteller Infektion nach einer verlängerten Inkubation. Untersuchungen an Mäusen, denen der Thymus fehlte, zeigten hingegen keinen Einfluss dieser Drüse auf die Inkubationszeit [69, 70].

Die hohe Infektiosität in der Milz ist schon lange vor der Nachweisbarkeit des Erregers im Hirngewebe sichtbar [16], auch wenn dort der PrP<sup>Sc</sup>-Titer um das 10 bis 100fache höher ist als in der Milz [36, 63].

### 1.3.2 Die Ausbreitung ins neuronale Gewebe

Für die Ausbreitung infektiöser Prionen von der Peripherie ins Zentralnervensystem ist PrP<sup>C</sup>-exprimierendes Gewebe notwendig [16, 20]. Bei Hamstern, intraperitoneal infiziert mit dem Scrapie-Stamm 263K, konnte man die periphere Ausbreitung des Scrapie-Erregers über das Rückenmark ins Gehirn beobachten. Die Haupteintrittsstelle des infektiösen Agens liegt demnach im thorakalen Bereich des Rückenmarkes [4, 9]. Seine Ausbreitung im Spinalkanal erfolgt danach in aufsteigender sowie absteigender Richtung. Außerdem ergaben die Untersuchungen, dass bei den peritoneal infizierten Hamstern ebenso wie bei oral infizierten Tieren eine alternative Infektionsroute abseits der spinalen Wege existiert. Diese führt vom Gastrointestinaltrakt über parasymphatische Fasern des Vagusnerves in die Medulla oblongata des Gehirns [11]. Es bleibt noch zu erforschen, wie genau das Prion-Protein vom gastrointestinalen Bereich in das Nervensystem einwandert, doch werden Bereiche des Darmes wie die Peyerschen Plaques und die M-Zellen diskutiert [10, 148].

### 1.3.3 Klinische Symptome

Die Symptome der verschiedenen TSE ähneln sich im Wesentlichen. Die Organismen zeigen eine massive Schädigung des Hirnstamm- und Kleinhirngewebes sowie des gesamten Cortex. Doch es gibt auch einzelne krankheitsspezifische Symptome, die zur Diagnosestellung herangezogen werden können.

Scrapieinfizierte Schafe sind in der Regel von Verhaltens-, Sensibilitäts- und Bewegungsstörungen (Ataxie) betroffen, leiden an inkompletter Lähmung aller vier Extremitäten (Tetraparese), ruckartigen Zuckungen einzelner Muskeln (Myoklonie) und starkem Juckreiz. Auch in Modellorganismen (vornehmlich Nager) lassen sich entsprechende Symptome beobachten. Sie steigern sich im Krankheitsverlauf in der Regel von Schreckhaftigkeit hin zu plötzlichen Bewegungen und Lärmüberempfindlichkeit bis schließlich zur Unfähigkeit zur Futteraufnahme [100]. Auch Rinder mit experimentell übertragener Scrapie sind lethargisch und fressen nicht. Darüber hinaus ähneln die Symptome jenen mit BSE infizierter Rinder [48]. Die bei BSE beschriebene Aggressivität und Hypersensibilität gegenüber Lärm oder Berührung sind hingegen nicht festzustellen [184].

Menschen mit klassischer CJK leiden an progressiver Demenz mit typischen EEG-Veränderungen. Myoklonien, visuelle oder zerebrale Störungen, pyramidale oder extrapyramidale Störungen sowie akinetischer Mutismus zählen zu diagnostisch relevanten Symptomen, von denen zur Diagnosestellung bei einem Patienten mindestens zwei vorliegen müssen. Im Gegensatz dazu zeigen Patienten mit vCJK die für die klassische CJK typischen EEG-Veränderungen nicht. In diesen Fällen kann das klinische Bild allein keine gesicherte Diagnose liefern, sondern muss begleitet sein durch neuropathologische Untersuchungen (post-mortem oder bei Verfügbarkeit auch an Biopsie-Material des Gehirns) und den Nachweis des PrP<sup>Sc</sup>.

### 1.3.4 Histopathologische Veränderungen

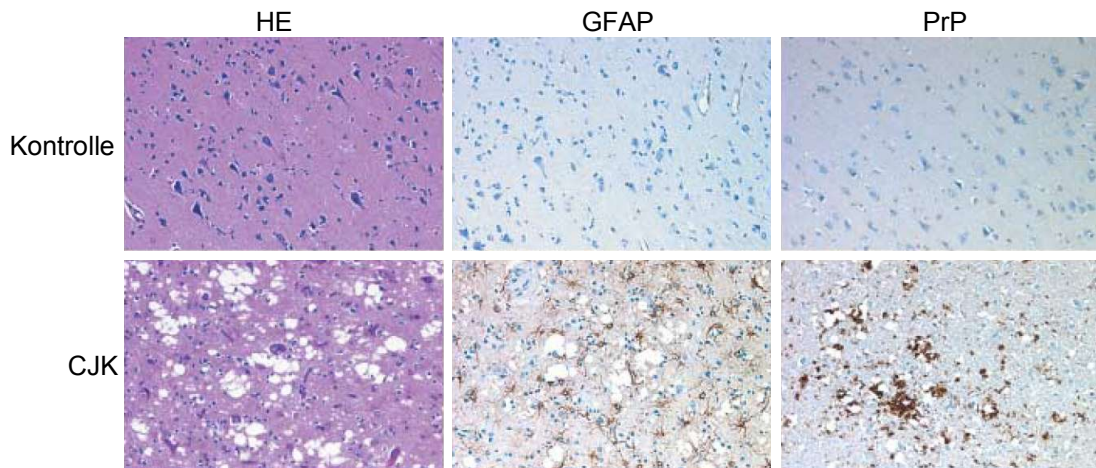
In der Milz sind keine histopathologischen Veränderungen nachweisbar, im Gehirn zeigen hingegen alle TSE deutliche Veränderungen, die je nach Erkrankung und Krankheitsstadium verschieden stark ausgeprägt sind.

#### 1.3.4.1 Prion-Protein-Ablagerungen

Als zentrales Merkmal der Prion-Erkrankung kann die Ablagerung fehlgefalteten, unlöslichen Prion-Proteins im Gehirn angesehen werden. Noch bevor andere histopathologische Veränderungen oder gar klinische Symptome erkennbar sind, akkumuliert das PrP<sup>Sc</sup> bereits in sehr frühem Krankheitsstadium [56, 186]. In und um Neuronen bilden sich zunächst kleine, diffuse Ablagerungen des Proteins. Bei manchen TSE kommt es auch zu größeren Ansammlungen, die als Plaques bezeichnet werden. Häufig treten Proteinansammlungen auch an Synapsen auf, z. B. in der Körnerschicht des Kleinhirns oder im Neocortex [106]. Größe und Intensität der Proteinaggregate variieren in Abhängigkeit von Erregerstamm, Wirtsorganismus und PrP-Genotyp. Ihre amyloidartigen Eigenschaften wie Anfärbbarkeit mit Kongorot und das Zeigen einer Doppelbrechung in polarisiertem Licht rücken TSE-Erkrankungen in die Verwandtschaft der Amyloidosen. In Abb. 1.3 ist am Beispiel der CJK eine solche Ablagerung dargestellt.

#### 1.3.4.2 Vakuolisierung

Ein wesentliches Merkmal des erkrankten Gehirns ist seine schwammartige (spongiforme) Veränderung. Diese Vakuolisierung ist eine bereits im Lichtmikroskop zu erkennende Ausbildung von Hohlräumen im Hirnparenchym. Vor allem die graue Substanz des



**Abbildung 1.3:** Vergleich zwischen dem frontalen Cortex eines humanen Kontrollgehirns (Kontrolle, oben) mit dem eines an der Creutzfeld-Jakob-Krankheit leidenden Patienten (CJK, unten). Die linke Spalte (HE) zeigt Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Schnitte, die den Neuronenverlust und die Vakuolisierung des CJK-Gehirns deutlich zeigen. Die mittlere Spalte (GFAP) zeigt die mit Antikörpern angefarbten sauren Gliafaserproteine der im kranken Gehirn stark proliferierenden Astrozyten. In der rechten Spalte (PrP) ist das Prion-Protein mit Antikörpern angefärbt und zeigt Akkumulate an Vakuolen. [1]

Hirnstammes ist davon betroffen [184], doch oft auch die weiße [95]. Es sind zudem unterschiedliche Hirnregionen beteiligt [96]. Das Ausmaß und die Verteilung der Vakuolisierung unterscheidet die diversen Erregerstämme und wird als Läsionsprofil definiert. Im Endstadium der neurodegenerativen Erkrankung durchsetzen die Läsionen das gesamte Hirnparenchym. Man spricht vom Status Spongiosus, in welchem das Gehirn durch große perizelluläre Spalträume und starke Auflockerung auffällt. Ausgeprägter Nervenzellverlust ist zu beobachten [95, 94] (siehe Abschnitt 1.3.4.5). Diese tiefgreifenden neurologischen Veränderungen führen zu den funktionellen Störungen wie Demenz und Ataxie, welche zu den typischen Symptomen der Prion-Krankheiten gehören (Abb. 1.3).

#### 1.3.4.3 Mikrogliaaktivierung

Das Stützgewebe des Gehirns besteht aus verschiedenen Neuroglia: Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Gliazellen dienen der Ernährung und Sauerstoffversorgung von Nervenzellen, sie beschleunigen die Erregungsleitung (Schwannsche Zellen) und nehmen in Form der Mikroglia unspezifische Abwehraufgaben wahr. Die meist kleinen, beweglichen und stark veränderlichen Mikrogliazellen sind in der Lage, Form und Position zu verändern [174, 114], weisen phagozytische Aktivität auf und haben eine zentrale Position bei immunologischen Vorgängen im Gehirn.

Ruhende Mikroglia haben eine verzweigte Morphologie [174, 114] und exprimieren nur geringe Mengen immunrelevanter Moleküle [114]. Pathologische Ereignisse wie Traumata oder neurodegenerative Erkrankungen des ZNS bewirken die Aktivierung von Mikroglia [114], welche mit einer morphologischen Veränderung der Zelle fort von der Verzweigung hin zu einem verdickten Zellkörper einhergeht [174, 114]. Im weiteren Verlauf findet eine Migration der aktivierten Zellen statt [114], welche nun verstärkt (immunrelevante) Moleküle wie CD45 und MHC-2 auf der Zelloberfläche exprimieren



[188, 81]. Die Aktivierung bewirkt auch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, welche eine wichtige Rolle bei der Induktion neuroinflammatorischer Prozesse im Gehirn spielen.

Nach der frühzeitigen Aggregation von PrP<sup>Sc</sup> im Gehirn TSE-infizierter Organismen zeigt sich zeitnah eine Mikrogliaaktivierung, welche entscheidend bei der Pathogenese der Prion-Krankheiten sein könnte [188] und welche noch vor Eintritt von Neuronenverlust (siehe Abschnitt 1.3.4.5) oder klinischen Symptomen stattfindet [187]. Neben proinflammatorischen Zytokinen werden auch Chemokine sezerniert [156, 97, 155, 122]. Diese wirken chemotaktisch auf inflammatorische Zellen und bewirken damit eine Aktivierung und Mobilisierung weiterer Mikrogliazellen, welche sich daraufhin zum Schädigungsherd begeben [173].

Der biologisch aktive Teil des Prion-Proteins zwischen den Aminosäuren 106–126 vermag *in vitro* Mikroglia zu aktivieren [67, 25]. Der Zellüberstand aktivierter Mikrogliazellen ist neurotoxisch und kann seinerseits Astrozyten aktivieren [24]. Für die neuronale Schädigung durch aktivierte Mikrogliazellen könnte deren Sekretion zytotoxischer Faktoren wie freie Sauerstoffradikale oder toxische Zytokine verantwortlich sein.

#### 1.3.4.4 Astrozytose (Gliose)

Ebenso wie Mikroglia gehören Astrozyten zu den Neuroglia. Astrozyten bilden zytoplasmatische Fortsätze aus, mit welchen sie in Kontakt zu Blutgefäßen oder Nervenzellen treten, um so Neurone mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Auch die Speicherung von Glykogen, der Abtransport neuronaler Stoffwechselprodukte und die Resorption überschüssiger Neurotransmitter an den Synapsen gehören zu den Funktionen dieser Zellen [181, 85, 179].

Im Verlauf neurodegenerativer oder von TSE-Erkrankungen werden Astrozyten aktiviert [50, 123, 56]. Dieses Phänomen wird auf die fortschreitende Akkumulation fehlgefalteter, unlöslicher Proteinaggregate und deren Induktion neuroinflammatorischer Prozesse im ZNS zurückgeführt. Die oben beschriebene resultierende Mikrogliaaktivierung ist im weiteren Krankheitsverlauf nun ihrerseits verantwortlich für die Aktivierung und Proliferation der Astrozyten. Dies geschieht mittels sezernierter proinflammatorischer Zytokine. Ähnlich dem Aktivierungsprozess der Mikroglia ist die Astrozytose eine sehr frühzeitige Folge einer TSE-Infektion und vor dem Auftreten neurodegenerativer Ereignisse zu beobachten [186, 56]. Spezifische Proteine können zum immunhistochemischen Nachweis der Astrozytose herangezogen werden, z. B. das auf den Fortsätzen aktivierter Astrozyten deutlich verstärkt exprimierte saure Gliafaserprotein (Glial Fibrillary Acidic Protein, Abb. 1.3).

Der biologisch aktive Teil des Prion-Proteins zwischen den Aminosäuren 106–126 kann *in vitro* Astrozyten in Anwesenheit von Mikrogliazellen zur Proliferation stimulieren [25, 26]. Eine Astrozytose bewirkt die Freisetzung neurotoxischer Faktoren. Die mögliche Dysregulation des extrazellulären Glutamatpiegels durch eine Astrozytose führt vermutlich zu einer letalen Neurodegeneration [23].

### 1.3.4.5 Neuronenverlust

Allen TSE ist der charakteristische fortschreitende Neuronenverlust (Neurodegeneration) eigen [94], dessen Ursache noch nicht endgültig geklärt werden konnte. Wichtige Mechanismen scheinen hierbei apoptotische und sekundär nekrotische Prozesse zu sein [145]. Auf nekrotische Prozesse deuten von Mitochondrien ausgehende Vakuolisierungsvorgänge hin [43]. Wenn auch das Auftreten von Apoptose räumlich nicht immer mit den PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen korreliert, so konnten doch andere typische Merkmale wie DNA-Fragmentierung und ein schrumpfendes Zellvolumen experimentell nachgewiesen werden [64, 78]. Ebenso wurden apoptosespezifische Proteine gefunden [145]. Angesichts der fehlenden Immunantwort [78] und der spezifischen Bindung von PrP an Bcl-2, ein durch Bindung an das Protein Bax normalerweise Zelltod unterbindendes Protein [116], erscheint Apoptose als zum Neuronenverlust führender Mechanismus sehr wahrscheinlich. Ausgelöst durch ins Zytoplasma freigesetzte Proteasen kommt es zu Zellabbau und letztlich der Selbstzerstörung (Autophagie) des Neurons [94]. Im Verlauf der Prion-Erkrankung korrelieren Regionen starken Neuronenverlustes und Areale starker Mikrogliaaktivierung miteinander [186, 77].

### 1.3.5 Biochemische Detektion von PrP<sup>Sc</sup>

Die Detektion von PrP<sup>Sc</sup> ist als einziger eindeutiger biochemischer Nachweis einer TSE zur Diagnosestellung unerlässlich. Soll die eindeutige Diagnose sich nicht nur auf postmortale Fälle beschränken, sind Alternativen zum Nachweis des PrP<sup>Sc</sup> im Gewebeschnitt notwendig. Gelegentlich lässt sich PrP<sup>Sc</sup> bereits zu Lebzeiten nachweisen: In den Tonsillen (vCJK, Scrapie beim Schaf) oder dem dritten Augenlid (Scrapie beim Schaf) kann die Detektion von akkumuliertem PrP<sup>Sc</sup> zu einem frühzeitigen Nachweis der Erkrankung beitragen. Auch bei der vCJK lässt sich eine Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> in den Tonsillen feststellen, was auch hier möglicherweise zu einem frühzeitigen Nachweis der Erkrankung beitragen kann.

Ein Western Blot aus PK-verdautem Gewebehomogenat stellt eine praktikable Möglichkeit der biochemischen Analyse dar. Lymphatisches Gewebe, welches PrP exprimiert, kann zur Diagnose herangezogen werden und in manchen Fällen bereits beim lebenden Patienten oder Tier entnommen werden. Das Prion-Protein wird aus dem Gewebehomogenat aufgereinigt und in einem Immunoblot nachgewiesen [135, 8]. Durch den vor den Blot geschalteten Proteinase-K-Verdau wird das PrP<sup>Sc</sup> eindeutig detektiert. Der Einsatz verschiedener, unterschiedlich sensitiver Nachweissysteme für den Primärantikörper stehen zur Verfügung.

Weitere einsetzbare Verfahren sind beispielsweise ein Dot-Blot-Immunoassay [166] oder ein ELISA (»Enzyme-Linked Immunosorbent Assay«) roher Gewebeextrakte [82].

## 1.4 Problemstellung und Zielsetzung

Es gibt bereits verschiedene Ansätze zur Identifizierung von Proteinen, welche an der Pathogenese von Prion-Erkrankungen beteiligt sind oder durch sie verändert werden. Im Wesentlichen zielen die verwendeten molekularbiologischen Methoden auf unterschiedliche mRNA-Konzentrationen ab. Eine Beeinflussung rein auf der posttranslationalen Ebene wurde wenig beachtet. So sind im Zusammenhang mit Prionerkrankungen noch keine umfangreichen Studien mit den Methoden aus der Proteomforschung durchgeführt worden. Es wurden zwar schon eine Reihe differentiell exprimierter Gene in Maus- und Hamstermodell nachgewiesen, die im Wesentlichen Marker für Astrozyten- (z. B. Peroxiredoxin) und Mikrogliaaktivierung (z. B. GFAP), Komplementfaktoren (z. B. die B- und C-Untereinheit des Komplementfaktors C1q), Proteasen, Zytokine (z. B. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), Transportproteine (z. B. Transferrin, Apolipoprotein D, E, J) und Stress- (z. B. Hitzeschockproteine, GSHPx-1,  $\alpha$ -B-Crystallin) bzw. Apoptoseprozesse (z. B. Bcl-2, Bax, Caspase-3) sind. Doch ein Ansatz, der mehr Einblick in die posttranslationalen Ereignisse des Proteoms bietet, könnte möglicherweise weitere veränderte Proteine zeigen.

Viele Prozesse und Wirkmechanismen der TSE-Infektionen sind noch nicht ausreichend bekannt. Die Entdeckung weiterer beteiligter Faktoren könnte zum tieferen Verständnis dieser neurodegenerativen Erkrankungen und ihrer Mechanismen beitragen.

Ziel dieser Arbeit ist es, neue Einblicke in die Ereignisse während einer Infektion auf der Proteomebene zu gewinnen. Dabei wird zunächst eine sensitive Extraktion der Proteine aus den zu untersuchenden Geweben [109] verschiedener Infektionsstadien zusammen mit der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese (2-DE) nach Kloise [111, 110] als Screeningmethode für die Suche nach Veränderungen in der Proteinkonzentration eingesetzt. Anschließend werden auf diese Weise gefundene Proteinspots massenspektrometrisch analysiert. Ziel hierbei ist es, möglicherweise im Zusammenhang mit einer Scrapie-Infektion noch unbekannte Proteine zu finden. Auch posttranslationale Proteinmodifikationen sind hierbei von Interesse, welche anhand der bisher angewandten herkömmlichen Methoden noch nicht entdeckt werden konnten.

Ein Protein kann aus mehreren Spots auf dem Gel bestehen. Die Ursache hierfür können vielfältig sein: Spleißvarianten sind ebenso denkbar wie Glykosylierungen und Phosphorylierungen als posttranslationale Ereignisse. Unabhängig von der Ursache werden in der vorliegenden Arbeit alle Spots desselben identifizierten Proteins als Isoform bezeichnet.

Bei dieser Untersuchung sind insbesondere im präklinischen Stadium auftretende Expressionsveränderungen von Interesse, da diese eher zum Verständnis der Krankheitsprogression beitragen können als später auftretende Veränderungen, welche auch eine Konsequenz der terminalen neuropathologischen Vorgänge sein können.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Labormaterial

#### 2.1.1 Chemikalien

Die meisten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (*Steinheim, Deutschland*), Serva (*Heidelberg, Deutschland*) und Merck (*Darmstadt, Deutschland*) bezogen. Chemikalien aus anderen Quellen sind nachfolgend aufgelistet.

Ammoniumpersulfat (*Biorad, Hercules, CA, USA*)  
Acrylamid (*für IEF; Biorad, Hercules, CA, USA*)  
Bromphenolblau (*Biorad, Hercules, CA, USA*)  
Complete<sup>®</sup> (*Roche, Mannheim, Deutschland*)  
DTT (*Biorad, Hercules, CA, USA*)  
Harnstoff (*Biorad, Hercules, CA, USA*)  
MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O (*Ferak, Berlin, Deutschland*)  
Natriumchlorid (*Fluka, Taufkirchen, Deutschland*)  
Pharmalyte-Ampholine pH 3.5–10.0 (*Pharmacia, Uppsala, Schweden*)  
Pharmalyte-Ampholine pH 4.0–6.5 (*Pharmacia, Uppsala, Schweden*)  
Pharmalyte-Ampholine pH 5.0–8.0 (*Pharmacia, Uppsala, Schweden*)  
Piperazine-Diacrylamid (*PDA; Biorad, Hercules, CA, USA*)  
SDS (*für Gel-Lösungen; Biorad, Hercules, CA, USA*)  
Sephadex-G-200 Superfine (*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland*)  
TEMED (*Biorad, Hercules, CA, USA*)

#### 2.1.2 Gerätschaften und Hilfsmittel

1D-Glasröhrchen (*Schott Glas, Mainz, Deutschland*)  
2D-Glasplatten (*verschiedene Bezugsquellen, u. a. Desaga, Wiesloch, Deutschland*)  
Durchlichtscanner UMAX Mirage II DIN A3 (*Umax, Willich, Deutschland*)  
Elektrophoresekammer 1D (*Wita, Berlin, Deutschland*)  
Elektrophoresekammer 2D, Desaphor VA300 (*Desaga, Wiesloch, Deutschland*)  
Feinanalysenwaage Research R 300 S (*Sartorius, Göttingen, Deutschland*)  
Glaskugeln Ø 2,5 ± 0,05 mm (*Worf Glaskugeln GmbH, Deutschland*)  
Leuchtkasten (*Biotec Fischer, Reiskirchen, Deutschland oder vergleichbare*)  
Manueller Gelstück-Ausstanzer (*Rosemann und Sohn, Stahnsdorf, Deutschland*)  
Nylonschnur (*herkömmliche Angelschnur; verschiedene Dicken und Hersteller*)  
Nylonpistill (*Wita GmbH, Berlin, Deutschland*)  
Quarzglasmörser (*Wita GmbH, Berlin, Deutschland*)

Spannungsgeräte (*Consort E833; Consort E815*)

Ultraschallbad Sonorex RK 102 P (*Bandelin electronic, Berlin, Deutschland*)

Ultrazentrifuge L8-70M (*Beckman, München, Deutschland*)

Ultrazentrifugenröhrchen 16 × 76 mm, 13,5 ml (*Nalgene Company, Rochester, NY, USA bzw. Beckman, München, Deutschland*)

Ultrazentrifugenrotor TI 50 (*Beckman, Fullerton, CA, USA*)

## 2.2 Tiere und Gewebe

In dieser Arbeit werden altersangepasste, weibliche *Mus musculus* des Stammes C57Bl/6 (Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin) mit dem Scrapie-Stamm 139A (R. H. Kimberlin, Edinburgh, UK) oral oder intrazerebral infiziert. Dazu verwendet man Hirnhomogenat terminal erkrankter, mit dem Stamm 139A infizierter Mäuse. Parallel zu den scrapieinfizierten Tieren werden Mock-Kontrolltiere mit negativem Material (Homogenat aus nichtinfiziertem Gehirn) behandelt und im selben Stall unter standardisierten Bedingungen gehalten (jedoch nicht im selben Käfig), um eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit durch möglichst geringe Schwankungen der Haltungsbedingungen zu gewährleisten. Sowohl die Infektion der Versuchstiere als auch die anschließende Diagnosestellung haben freundlicherweise Frau Sibyll Lichy (Robert-Koch-Institut, Berlin) und Frau Karin Krohn (Robert-Koch-Institut, Berlin) übernommen.

### 2.2.1 Orale Infektion

Für die orale Infektion setzt man die Mäuse im Alter von 12 Wochen einzeln und füttert diese mit 100 µl eines auf trockenes Toastbrot pipettierten Hirnhomogenates der Verdünnungsstufe  $10^{-1}$ . Nach dem vollständigen Verzehr des Infektionsmaterials werden die Tiere in Gruppen zu maximal 10 Individuen unter standardisierten Bedingungen gehalten.

### 2.2.2 Intrazerebrale Infektion

Die intrazerebrale Infektion sechs Wochen alter Mäuse erfolgt durch Injektion von 20 µl Hirnhomogenat der Verdünnungsstufe  $10^{-2}$  durch die Schädeldecke hindurch in den vierten Hirnventrikel. Auch diese Tiere werden parallel mit ihren Mock-Kontrollen in Tiere in Gruppen zu maximal 10 Individuen unter standardisierten Bedingungen gehalten.

### 2.2.3 Diagnose der Tiere

Der klinischen Diagnose der Scrapie-Erkrankung legt man Verhalten (z. B. Apathie, Nervosität), Konstitution (z. B. Gewichtsverlauf, Fellbeschaffenheit) und Bewegungsauffälligkeiten (z. B. Ataxie) der Tiere zugrunde. Mittels dieser Diagnose ermittelt man das terminale Stadium der Erkrankung, an welchem die letzte Organentnahme stattfindet. Die früheren Zeitpunkte sind bereits vor Beginn der Versuchsdurchführung anhand der bekannten Inkubationszeiten des Scrapie-Stammes 139A in C57Bl/6-Mäusen bei unterschiedlicher Erregerapplikation (in der vorliegenden Arbeit oral und intrazerebral) festzulegen.

#### 2.2.4 Organgewinnung

Die Gewinnung von Organen wird bereits ausführlich an anderer Stelle beschrieben [109]. Zu festgelegten Zeitpunkten und im terminalen Stadium der Erkrankung tötet man Kontrollen und scrapieinfizierte Tiere durch Dekapitation und lagert den Kopf bis zur weiteren Präparation auf Eis. Nach dem Eröffnen des Abdomens wird beidseits die Vena femoralis durchtrennt und die Leber mit Kochsalzlösung (0,9 % (w/v) NaCl) perfundiert. Die Milz wird freipräpariert, herausgelöst, von Bindegewebe und Fett befreit und in kalter NaCl-Lösung auf Eis gespült. Zur Entnahme des Gehirns eröffnet man mit einer Präparierschere den Schädelknochen sagittal vom Spinalkanal ausgehend. Der Knochen wird beidseits vorsichtig weggebrochen, so dass das Gehirn frei zu liegen kommt. Mit einer breiten, stumpfen Pinzette hebt man das Gehirn vorsichtig mitsamt der Bulbi olfactorii und einem Stück Rückenmark (bis zum Rhombenzephalon) heraus und spült das Organ gründlich in kalter Kochsalzlösung auf Eis. Mit einer feinen Pinzette werden Blutgefäße vorsichtig entfernt oder ausgedrückt und das Gehirn gründlich mit NaCl gespült.

Zur Lagerung werden die Organe nacheinander vorsichtig mit Kimwipes<sup>®</sup> trockengeputzt, einzeln in flüssigem Stickstoff eingefroren und in ein stickstoffgekühltes Cryoröhrchen mit Schraubverschluss überführt. Bis zur Verarbeitung verbleiben die Organe bei  $-80^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank.

### 2.3 Proteinextraktion

Das Konzept der Proteinextraktion beruht auf dem sequenziellen Einsatz verschiedener mechanischer und chemisch-enzymatischer Schritte. Die grundsätzliche Methode dieses Verfahrens wurde bereits ausführlich bei Klose [109] beschrieben. In der vorliegenden Arbeit kommen die fraktionierte Proteinextraktion (siehe Abschnitt 2.3.1) für die Milzproben der oral infizierten Mäuse (4 Probenpaare pro Stadium) und eine Gesamtproteinextraktion (GE) (siehe Abschnitt 2.3.2) für die Gehirne der intrazerebral infizierten Tiere (3 Probenpaare pro Stadium) zum Einsatz. Bei der fraktionierten Proteinextraktion werden den mechanischen und chemisch-enzymatischen Schritten Ultrazentrifugationen zwischengeschaltet, welche eine Trennung der Proteine in eine pufferlösliche Fraktion (Überstand Ü, vorwiegend plasmatische Proteine), eine Harnstoff/detergenlösliche Fraktion (Rückstandsextrakt RE, membranassoziierte Proteine) und eine Kernfraktion (Rückstandssuspension RS, vorwiegend nukleinsäure-assoziierte Proteine wie Histone) erlauben. Diese Ultrazentrifugationsschritte entfallen bei der Gesamtproteinextraktion, so dass man einen einzelnen Extrakt mit allen Proteinen des Ausgangsmaterials erhält. Die Proteinextraktion erfolgt grundsätzlich für jedes Individuum einzeln, selbst wenn später für die elektrophoretische Auftrennung Pools gebildet werden, um wie im Falle der Milz eine leichtere Auswertung zu ermöglichen oder mehr Material für präparative Gele zu erhalten.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

**Tabelle 2.1:** Übersicht der Arbeitsschritte zur fraktionierten Proteinextraktion aus Milzgewebe: Extraktion der plasmatischen Proteine (Überstand Ü).

SCHRITT & MATERIAL	MENGE (BERECHNUNG)
<b>1. Homogenisierung</b>	
Probenmenge PM	ganzes Organ (80–125 mg)
Puffer P1	$PM \times 1,0$ $\Sigma_1 = PM + P1$
Proteinase-Inhibitor H3	$\Sigma_1 \times 0,08$
Proteinase-Inhibitor H1	$\Sigma_1 \times 0,02$ $\Sigma_2 = \Sigma_1 + H1 + H3$
<b>Ultraschall</b>	
Glaskugelzahl ( $\varnothing 2,5 \pm 0,05$ mm)	$\Sigma_2 \times 0,034$
Wiederholungen à 10 sec	6
<b>1. Zentrifugation</b> (40 Minuten brutto, 4°C)	
Überstand Ü1 einfrieren	
Pellet Pe1 wiegen, einfrieren	
<b>2. Homogenisierung</b>	
Puffer P1	$Pe1 \times 1,5$ $\Sigma_3 = Pe1 + P1$
Proteinase-Inhibitor H3	$\Sigma_3 \times 0,08$
Proteinase-Inhibitor H1	$\Sigma_3 \times 0,02$
<b>Rühren</b> (45 Minuten bei 4°C)	
<b>2. Zentrifugation</b> (40 Minuten brutto, 4°C)	
Pellet Pe2 wiegen, einfrieren	
Überstand Ü2 zu Ü1 = Ü, wiegen	
Aliquotierung für 1D	Al à 50 µl
Harnstoff (9 M Endkonz. Probe)	Al × 1,08 (= 54 mg)
DTT (70 mM Endkonz. in Probe)	Al × 0,1 (= 5 µl)
Servalyte 2–4 (2% (v/v) Endkonz. Probe)	Al × 0,1 (= 5 µl)
Auftragsvolumen 1D	6 µl

### 2.3.1 Fraktionierte Proteinextraktion

#### 2.3.1.1 Überstand Ü (plasmatische Fraktion)

Für die fraktionierte Extraktion der Milzproteine wird das ganze Organ eingesetzt (80–125 mg). Bei den verwendeten Lösungen wird durchgängig von einer idealisierten Dichte von 1 g/ml ausgegangen (Zugabe in w/w). Eine Übersicht der Schritte, die zur Berechnung notwendigen Faktoren und einzusetzenden Substanzmengen in Abhängigkeit des Probengewichts können Tab. 2.1 entnommen werden.

Das Material wird einzeln in flüssigstickstoffgekühlten Quarzglasröhrern unter Zugabe von Puffer P1 (50 mM TrisBase, 100 mM KCl und 20% (w/v), pH 7,1), Proteinase-Inhibitor H3 (eine Tablette Complete® in 2 ml Puffer P1 gelöst) und Proteinase-Inhibitor H1 (0,14 mM Pepstatin A und 0,1 M Phenylmethylsulfonylfluorid in Ethanol) mit einem Nylonpistill zu einem feinen Pulver homogenisiert. Mittels eines schaufelförmig modifi-



zierten Spatels wird das Pulver in ein stickstoffkaltes 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und kann in flüssigem Stickstoff oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden.

Unter Zugabe einer definierten Anzahl Glaskugeln (Tab. 2.1) wird das Pulver für die Ultraschallbehandlung mit einem dünnen Metalldraht unter Rühren aufgetaut. Die Behandlung erfolgt im Schallzentrum eines mit Eiswasser gefüllten Ultraschallbades für 6 mal 10 Sekunden. Eine längere Schallung würde die Probe zu sehr erwärmen. Unmittelbar nach jeder einzelnen Schallbehandlung wird die Probe ins Eisbad eintauchend mit dem Metalldraht gerührt, um einen raschen Wärmeaustausch zu erreichen. Nach der Ultraschallbehandlung trennt eine kurze Zentrifugation in einer gekühlten Eppendorf-Zentrifuge die Probe nahezu verlustfrei von den Glaskugeln und überführt sie gleichzeitig in ein 13,5 ml-Ultrazentrifugenröhrchen. Das Material wird in flüssigem Stickstoff eingefroren und dort oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Für die erste Zentrifugation werden die Proben unter Rühren im Eisbad aufgetaut und in einem TI 50-Rotor 40 Minuten bei 50 000 rpm (226 240 g) in einer Ultrazentrifuge bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen, in ein Cryoröhrchen mit Schraubdeckel überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Das Pellet wird gewogen, in einer Eppendorfszentrifuge mit Schwingrotor leicht abzentrifugiert und eingefroren.

Zur zweiten Homogenisierung wird das Pellet wie oben beschrieben mit P1, H3 und H1 zusammen gemörsert und anschließend in das für die jeweilige Probe zuvor verwendete Ultrazentrifugenröhrchen verbracht. Das Pulver wird auf Eis aufgetaut und bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 45 Minuten gerührt. Die sich anschließende zweite Zentrifugation findet unter oben genannten Bedingungen statt. Der resultierende Überstand wird zu dem ersten Überstand der jeweiligen Probe pipettiert und ausgewogen. Das Pellet wird ebenfalls gewogen, leicht abzentrifugiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vom Überstand wird ein Aliquot abgenommen und für die erste Dimension der Elektrophorese vorbereitet. Der Extrakt wird mit Harnstoff, DTT (700 mM Lösung) und Servalyte 2–4 (Tab. 2.1) versehen und bis zur Durchführung der isoelektrischen Fokussierung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gefroren aufbewahrt.

### 2.3.1.2 Rückstandsextrakt RE (membranassoziierte Fraktion)

Der Rückstandsextrakt wird aus dem Pellet Pe2 der zweiten Zentrifugation gewonnen. Eine Übersicht der Schritte, die zur Berechnung notwendigen Faktoren und die einzusetzenden Substanzmengen in Abhängigkeit des Probengewichts können der Tab. 2.2 entnommen werden.

Das Sediment wird in einem dritten Homogenisierungsschritt mit dem Detergens-Puffer P2-CHAPS (200 mM KCl, 20 % (w/v) Glycerin, 100 mM Phosphatpuffer [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  im Verhältnis 1 : 2; pH 7,1], 7,3 % (w/v) 3-[(3-Chloramidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat [CHAPS]) und Proteinase-Inhibitor H4 (1 Tablette Complete<sup>®</sup> in 2 ml Puffer P2 ohne CHAPS) unter Flüssigstickstoff gemörsert. Das Pulver wird in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und nach dem Auftauen 60 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  gerührt. Unter Zugabe von Harnstoff und DTT (700 mM Lösung) schließt sich eine Rührphase von 45 Minuten bei Raumtemperatur (RT) an. Hat sich der Harnstoff vollständig gelöst, erfolgt die dritte Zentrifugation bei 226 240 g und  $17^{\circ}\text{C}$ . Der abgenommene Rückstandsextrakt

## 2 MATERIAL UND METHODEN

**Tabelle 2.2:** Übersicht der Arbeitsschritte zur fraktionierten Proteinextraktion aus Milzgewebe: Extraktion der membranassoziierten Proteine (Rückstandsextrakt RE).

SCHRITT & MATERIAL	MENGE (BERECHNUNG)
<b>3. Homogenisierung</b>	
Herstellung Puffer P2-CHAPS	900 $\mu$ l P2 + 73 mg CHAPS + 31 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
P2-CHAPS	Pe2 $\times$ 1,6 $\Sigma_4 = \text{Pe2} + \text{P2-CHAPS}$
Proteinase-Inhibitor H4	$\Sigma_4 \times 0,08$ $\Sigma_5 = \text{P2-CHAPS} + \text{H4}$
<b>Rühren</b> (60 Minuten bei 4 °C)	
<b>Rühren</b> (45 Minuten bei RT)	
Berechnung Faktor F	Pe2 $\times$ 0,3
Harnstoff	(F + $\Sigma_5$ ) $\times$ 1,08
DTT (700 mM Lösung)	(F + $\Sigma_5$ ) $\times$ 0,1
<b>3. Zentrifugation</b> (40 Minuten brutto, 17 °C)	
Pellet Pe3 wiegen, einfrieren	
Rückstandsextrakt RE wiegen	
Servalyte 2–4 (2 % (w/w) Endkonz. in Probe)	RE $\times$ 0,0526
RE wiegen, aliquotieren, einfrieren	
Auftragsvolumen 1D	8 $\mu$ l

wird in ein Cryoröhrchen mit Schraubdeckel gefüllt und gewogen. Das Pellet wird kurz abzentrifugiert, ebenfalls gewogen und eingefroren. Zum Rückstandsextrakt pipettiert man Servalyte 2–4, so dass auch diese Fraktion für die isoelektrische Fokussierung verwendet werden kann. Die Lagerung der Aliquots erfolgt bei  $-80\text{ °C}$ .

### 2.3.1.3 Rückstandssuspension RS (Kernfraktion)

Die letzte Fraktion dieser Extraktionsmethode ist die Rückstandssuspension, welche im Wesentlichen in einer Resuspendierung des letzten erhaltenen Pellets Pe3 besteht (Tab. 2.3).

Unter Zugabe von Puffer P3-MgSO<sub>4</sub> (2 mM MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O und 50 mM TrisBase) wird die Probe letztmalig im Quarzglasmörser homogenisiert und in ein Cryoröhrchen mit Schraubdeckel überführt. Dem rasch aufgetauten Pulver wird DNase (Benzonase) zugegeben und die Suspension unter Rühren bei 4 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Probe wird unter Zugabe von Harnstoff und DTT (700 mM Lösung) weitere 30 Minuten bei RT gerührt und anschließend gewogen. Abschließend wird Servalyte 2–4 zugegeben (Tab. 2.3). Die Rückstandssuspension wird gewogen, aliquotiert und kann für die Elektrophorese verwendet werden. Die Lagerung erfolgt auch hier bei  $-80\text{ °C}$ .

### 2.3.2 Gesamtproteinextraktion GE

Der wesentliche Unterschied der Gesamtextraktion von Proteingemischen gegenüber der fraktionierten Extraktion besteht darin, dass man nur einen einzigen Extrakt mit allen aus dem Gewebe gewonnen Proteinen erhält. Zudem kann die Extraktionsprozedur weitgehend in demselben Gefäß durchgeführt werden, so dass der Probenverlust auf ein

**Tabelle 2.3:** Übersicht der Arbeitsschritte zur fraktionierten Proteinextraktion aus Milzgewebe: Extraktion der Kernproteine (Rückstandssuspension RS).

SCHRITT & MATERIAL	MENGE (BERECHNUNG)
<b>4. Homogenisierung</b>	
Puffer P3-MgSO <sub>4</sub>	Pe3 × 1,0 Σ <sub>6</sub> = Pe3 + P3-MgSO <sub>4</sub>
<b>Rühren</b> (30 Minuten bei 4 °C)	
Benzonase	Σ <sub>6</sub> × 0,025
<b>Rühren</b> (30 Minuten bei RT)	
Harnstoff	(P3 + Benzonase) × 1,08
DTT (700 mM Lösung)	(P3 + Benzonase) × 0,1
Rückstandssuspension RS wiegen	
Servalyte 2–4	((Pe3 × 0,3) + P3-MgSO <sub>4</sub> + Benzonase) × 0,1
RS wiegen, aliquotieren, einfrieren	
Auftragsvolumen 1D	9 µl

Minimum reduziert ist. Der Arbeitsaufwand ist deutlich geringer, auch bei der nachfolgenden 2-DE-Analyse und Bildauswertung, da für jedes Probenpaar nur ein Gelpaar benötigt wird, und nicht für jede Fraktion eines wie bei der Fraktionierung. Die Gesamtextraktion ist in Tab. 2.4 dargestellt.

Der erste Schritt der Gesamtextraktion ist die Homogenisierung des Materials im stickstoffgekühlten Quarzglasmörser. Von dem fein vorgemörserten Gehirnpulver wird eine Probenmenge von ca. 150 mg (– 196 °C) in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingewogen und mit Puffer P (50 mM TrisBase, 50 mM KCl, 20% Glycerin (w/w) und 0,11 M CHAPS, pH 7,5) und den Proteinase-Inhibitoren H1 (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.3.1.1) und H5 (eine Tablette Complete<sup>®</sup> in 2 ml Puffer P ohne CHAPS gelöst) unter Rühren im Eisbad aufgetaut. Die Ultraschallbehandlung erfolgt exakt wie bereits beschrieben (siehe Abschnitt 2.3.1.1). Die zur Trennung von den Glaskugeln durchgeführte kurze Zentrifugation erfolgt in ein Cryoröhrchen mit Schraubdeckel. Der erhaltene Extrakt EX wird gewogen und während der Ultraschallbehandlung der übrigen Proben in Stickstoff eingefroren aufbewahrt. Der Extrakt wird wieder aufgetaut und unter Zugabe unterschiedlicher Mengen Puffer P-MgCl<sub>2</sub> (240 mM MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O, gelöst in Puffer P ohne CHAPS) und Benzonase 30 Minuten bei 4 °C gerührt (Tab. 2.4). Der Extrakt EX1 wird gewogen, ein für eine eventuelle Proteinbestimmung zurückzustellendes Aliquot Al-P entnommen und der Extrakt EX1a erneut gewogen. Während einer 30-minütigen Rührphase bei RT werden Harnstoff (Endkonzentration 6,5 M in der Probe) und Thioharnstoff (Endkonzentration in der Probe: 2 M) in dem Extrakt gelöst. Nach Wägung des Extraktes EX2 wird als Rückstellprobe für eine mögliche Anwendung eines neuartigen Fluoreszenzlabeling-Verfahrens der Probe bereits vor der Elektrophorese (DIGE [3]) das Aliquot Al-D entnommen und die Probe Al-S erneut gewogen. Anschließend wird zur Vorbereitung für die isoelektrische Fokussierung DTT und Servalyte 2–4 in die Probe gerührt, diese aliquotiert und bei – 80 °C gelagert.

**Tabelle 2.4:** Übersicht der Arbeitsschritte zur Gesamtproteinextraktion aus Gehirngewebe (GE).

SCHRITT & MATERIAL	MENGE (BERECHNUNG)
<b>Homogenisierung</b>	
Probenmenge PM	ca. 150 mg
<b>Ultraschall</b>	
Herstellung Puffer P	900 $\mu$ l P + 65 mg CHAPS + 38 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
Puffer P	PM $\times$ 1,6 $\Sigma_1 = \text{PM} + \text{P}$
Proteinase-Inhibitor H5	$\Sigma_1 \times 0,08$
Proteinase-Inhibitor H1	$\Sigma_1 \times 0,02$ $\Sigma_2 = \Sigma_1 + \text{H5} + \text{H1}$
Kugelzahl	$\Sigma_2 \times 0,034$
Wiederholungen à 10 sec	6
Extrakt EX wiegen	
<b>Rühren (30 Minuten bei 4 °C)</b>	
Puffer P-MgCl <sub>2</sub>	EX $\times$ 0,021
Benzonase	EX $\times$ 0,025
Extrakt EX1 wiegen	
Aliquot Al-P	15 $\mu$ l
Extrakt EX1a wiegen	
<b>Rühren (30 Minuten bei RT)</b>	
Harnstoff (6,5 M)	EX1a $\times$ 0,78
Thioharnstoff (2 M)	EX1a $\times$ 0,3
Extrakt EX2 wiegen	
Aliquot Al-D	50 $\mu$ l
Extrakt Al-S wiegen	
<b>Vorbereitung für 1D</b>	
DTT (700 mM Lösung)	((EX1a : EX2) $\times$ Al-S) $\times$ 0,1
Servalyte 2-4	((EX1a : EX2) $\times$ Al-S) $\times$ 0,1
Auftragsvolumen 1D	5 $\mu$ l

## 2.4 2D-Gel-Elektrophorese

Die zweidimensionale Gel-Elektrophorese (2-DE) ist eine hoch auflösende Großgeltechnik, mit welcher mehrere tausend Proteinspots voneinander getrennt werden können. Die Methode wurde im Labor von Professor Joachim Klose entwickelt und mit der Zeit weiter verfeinert [111, 110]. Die 2-DE basiert auf der elektrophoretischen Trennung der Proteine in zwei Schritten und nach zwei unterschiedlichen Kriterien. Im ersten Schritt, der isoelektrischen Fokussierung, werden die Proteine in einem während der Elektrophorese ausgebildeten pH-Gradienten entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (pI) separiert. Der zweite Schritt trennt in einer klassischen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) diese Proteine nach ihrer Masse weiter auf.

Die später als sogenannte Probenpaare miteinander zu vergleichenden Proben und Kontrollen werden im selben Elektrophoreselauf verarbeitet, um Abweichungen aufgrund experimentell bedingter Schwankungen gering zu halten. In der 1. Dimension können bis

zu 4 Probenpaare gleichzeitig in demselben Lauf aufgetrennt werden. In der 2. Dimension werden dann am ersten Tag die sauren Seiten der Probenpaare getrennt, am 2. Tag folgen die basischen Hälften. Die verwendeten Gel-Lösungen entstammen aus demselben Grunde auch immer demselben Ansatz, mindestens für die Proben eines Stadiums und Organs.

Aufgrund ihrer immunologischen Aktivität zeigt die Milz selbst bei den verwendeten Inzuchtmäusen eine größere Variabilität im Proteinstreifenmuster als es für eine Suche nach konstanten, durchgängigen Spotunterschieden wünschenswert ist. Daher werden die einzelnen Proteinextrakte stadienweise zu je einem Scrapie- und Kontrollmix gepoolt und dreimal parallel elektrophoretisch getrennt. So relativieren sich individuelle Spotunterschiede und gleichmäßige Spotveränderungen treten deutlicher hervor. Die Gehirnprouben bedürfen keiner solchen Behandlung, da hier bereits durch den inzestuösen genetischen Hintergrund der Tiere eine hohe Reproduzierbarkeit besteht; die Gehirnprouben werden als Individuen-Probenpaare untersucht.

### 2.4.1 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Die verwendete Methode zur isoelektrischen Fokussierung (IEF) der Proteine bedient sich Carrier Ampholyten, welche in die Gel-Lösung eingearbeitet sind. Der pH-Gradient bildet sich während der Elektrophorese allmählich aus. Die Separationsgellösung besteht aus 3,5 % (w/v) Acrylamid, 0,3 % (w/v) Piperazine-Diacrylamid, 9 M Harnstoff, 0,06 % (v/v) TEMED und 2 % (v/v) Ampholinmischung. Letztere enthält 1 Teil Pharmalyte-Ampholine pH 3.5–10.0, 1 Teil Servalyt® pH 2.0–11.0, 3 Teile Pharmalyte-Ampholine pH 4.0–6.5, 2 Teile Pharmalyte-Ampholine pH 5.0–8.0 und 1 Teil Servalyt pH 6.0–9.0. Um ein Auslaufen der Proteine am kathodischen Ende zu verhindern, wird dort an das Separationsgel ein Pfropfen aus festerem, sogenanntem Cappel angegossen. Die Gelzusammensetzung unterscheidet sich nur in der Acrylamid- und Diacrylamidkonzentration (12 % (w/v) Acrylamid, 0,13 % (w/v) Piperazine-Diacrylamid). Die Polymerisierung wird durch Zugabe von 0,02 % (w/v) Ammoniumpersulfat zu einem Aliquot Separations- bzw. Cappel initiiert. Die für die IEF verwendeten Elektrophoresepuffer bestehen aus 4,25 % (v/v) Phosphorsäure und 3 M Harnstoff (Anodenpuffer) bzw. 5 % (v/v) Ethylendiamin, 9 M Harnstoff und 5 % (w/v) Glycerin (Kathodenpuffer). Alle Lösungen für die 1. Dimension werden mit Millipore-Wasser ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) hergestellt und unbedingt entgast. Ausführliche Angaben zur Herstellung der Lösungen und zum Gießen der 1D-Gele können an anderer Stelle eingesehen werden [110].

Die Trennstrecke der IEF-Gele beträgt 40 cm, der Durchmesser für die analytischen Gele beträgt 0,9 mm, das Probenauftragsvolumen kann hier maximal 12  $\mu\text{l}$  betragen. Die präparativen IEF-Gele sind 1,5 mm im Durchmesser und können mit bis zu 60  $\mu\text{l}$  Probenlösung versehen werden. Zwischen Gel und Probe wird eine dünne Schicht Sephadex-Lösung aufgebracht (in Wasser gequollenes und in 25 % Glycerin gerührtes Sephadex, versetzt mit 9 M Harnstoff, 70 mM DTT und 2 % (v/v) der für die Gel-Lösungen verwendeten Ampholinmischung (siehe oben)). Auf die Probenlösung wird eine Schicht Schutzlösung (5 M Harnstoff, 5 % (w/v) Glycerin und 5 % Servalyte 2–4) gegeben, um die Proteine vor dem sauren Milieu des Anodenpuffers zu schützen und ihre Präzipitation zu verhindern. Die Spannungsabfolge ist bei beiden Geldurchmessern identisch und idealerweise in einem programmierbaren Spannungsgerät gespeichert:

1 h 100 V, 1 h 300 V, 23 h 1000 V, 30 min 1500 V, 10 min 2000 V

Um ein Auflaufen der in Rückstandsextrakt und Rückstandssuspension in größerer Zahl vorkommenden basischen Proteinspots zu reduzieren, wird für diese Proben eine um 2 Stunden verkürzte isoelektrische Fokussierung durchgeführt:

1 h 100 V, 1 h 300 V, 21 h 1000 V, 30 min 1500 V, 10 min 2000 V

Die Gele werden unmittelbar nach Beendigung der Fokussierung mit einem an der Spitze passend zum Röhrcheninnendurchmesser verdickten Nylonfaden (handelsübliche Angelschnur) von 0,8 mm bzw. 1,4 mm Durchmesser aus den Glaskapillaren in eine Equilibrierlösung ausgestoßen. Dabei werden die Gele in zwei gleich lange Hälften geteilt, da die 2. Dimension lediglich eine Breite von 23 cm aufweist. Die Equilibrierlösung besteht aus 125 mM TrisHCl, pH auf 6,8 justiert, 40 % (w/v) Glycerin, 65 mM DTT und 3 % (w/v) SDS. Die IEF-Gele werden entweder in Petrischalen mit dieser Lösung ausgestoßen, aus denen die Gele dann mittels einer Glaspipette sofort auf trockene Trägerschienen verbracht werden, oder direkt auf Trägerschienen mit etwas Flüssigkeit. In jedem Fall wird überschüssige Lösung sofort abgenommen. Erfolgt die SDS-PAGE nicht gleich im Anschluss an die 1. Dimension, können die Gele problemlos längere Zeit auf den Trägerschienen und mit einer Abdeckung versehen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 2.4.2 SDS-PAGE (2. Dimension)

Die Gel-Lösung für die SDS-PAGE enthält 15 % (w/v) Acrylamid 4x und 0,2 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid 2x, gepuffert in Laemmli-Puffer [117] (je 375 mM TrisBase und TrisHCl, 0,03 % (v/v) TEMED, 0,1 % (w/v) SDS). Zur Polymerisationsinitiation werden 0,08 % (w/v) Ammoniumpersulfat zugegeben. Die Gele werden in speziellen Kassetten zwischen Glasplatten der Maße  $25 \times 30$  cm gegossen, die Trennfläche beträgt letztlich ca.  $23 \times 28$  cm. Für analytische Gele werden Abstandshalter von 0,75 mm verwendet, für präparative Zwecke werden Gele von 1 mm Dicke gegossen. Nähere Angaben zur Lösungsherstellung und der Durchführung finden sich bei Klose [110].

Der Elektrophoresepuffer wird ebenfalls gemäß den Vorgaben nach Laemmli [117] hergestellt: 25 mM TrisBase, 192 mM Glyzin und 0,1 % SDS. Für Gel-Lösung und Kathodenpuffer wird immer Millipore-Wasser verwendet, für den Anodenpuffer reicht vollentionisiertes Wasser aus. Dem Kathodenpuffer wird außerdem etwas Bromphenolblau zugegeben. Zudem wird etwas Kathodenpuffer mit 1 % (w/v) Agarose versetzt und die aufgelegten IEF-Gele damit überschichtet, um ein Aufschwimmen des Gels zu unterbinden.

Einer Einlaufphase von 15 min bei 65 mA (87 mA bei 1 mm-Gelen) folgt die Trennphase bei 85 mA (113 mA bei 1 mm-Gelen), welche ca. 5–7 Stunden dauert. Der Elektrophoresepuffer muss während der gesamten Zeit auf  $15^{\circ}\text{C}$  gekühlt werden, um den pH-Wert des Puffers konstant auf 6,8 zu halten. Der Lauf gilt als beendet, wenn die durch das Bromphenolblau gut sichtbare Frontbande ca. 2 cm vom anodischen Gelende entfernt ist. Die Gele werden dann sofort in die für die jeweils vorgesehene Färbung adäquate Fixierlösung umgebettet.

## 2.5 Färbungen

Für die Visualisierung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine in einer Gelmatrix existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden. In der vorliegenden Arbeit kommen drei Färbungen zur Anwendung.

### 2.5.1 Silberfärbungen

Für die analytischen Gele wird eine sehr sensitive, jedoch für massenspektrometrische Untersuchungen untaugliche Silberfärbung eingesetzt. Sie folgt mit einigen Modifikationen durch Jungblut [98] Heukeshovens Vorgaben [87]. Eine weitere Abwandlung dieser analytischen Silberfärbung durch Giavalisco [75] ermöglicht die anschließende massenspektrometrische Analyse der fraglichen Spots und kommt für präparative Gele zum Einsatz.

#### 2.5.1.1 Analytische Silberfärbung

Unmittelbar nach der SDS-PAGE beginnt die Färbung mit einem Fixierschritt. Mindestens zwei Stunden werden die Gele in einer Lösung aus 10 % (v/v) Essigsäure und 50 % Ethanol in Millipore-Wasser geschüttelt. Pro Gel beträgt das benötigte Lösungsvolumen 1 Liter, angesetzt werden die Lösungen immer mit Millipore-Wasser zu 2 Liter für ein Probenpaar.

Nach der Fixierung erfolgt eine Inkubation von 2 Stunden in 4,1 % (w/v) Natriumacetat, 0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat, 30 % (v/v) Ethanol und 0,2 % Glutardialdehyd. Nach zweimaligem Waschen der Gele für jeweils 20 Minuten in Millipore-Wasser werden sie in einer Silberlösung (0,1 % Silbernitrat und 0,01 % Formaldehyd) 30 Minuten geschüttelt. Ein kurzer Waschschriff mit Millipore-Wasser und eine Spülung (1 Minute) mit 2,5 %iger (w/v) Natriumcarbonatlösung leiten die eigentliche Entwicklung ein. In einer 2,5 %igen (w/v) Natriumcarbonatlösung mit 0,01 % (v/v) Formaldehyd werden die Gele einzeln inkubiert, bis die gewünschte Färbungsintensität erreicht ist. Umbetten in 0,05 M Titriplex mit 0,02 % (w/v) Thimerosal stoppt die Entwicklung ab. Nach 20 Minuten in der Stopplösung können die Gele in vollentionisiertes Wasser gegeben und getrocknet werden [110]. Zu Dokumentationszwecken wird jedes Gel eingescannt.

#### 2.5.1.2 Massenspektrometriekompatible Silberfärbung

Im wesentlichen lehnt sich diese Silberfärbung [75] an die analytische Silberfärbung an, jedoch wird auf das Glutardialdehyd verzichtet. Dieses Dialdehyd hat die Eigenschaft, Proteine über deren Aldehydgruppen miteinander zu vernetzen, was eine Extraktion der Proteine aus der Gelmatrix erschwert und auch aus massenspektrometrischen Aspekten ungünstig ist. Der Fixierschritt nach der SDS-PAGE wird auch hier mit 10 % (v/v) Essigsäure und 50 % Ethanol in Millipore-Wasser für mindestens 1 Stunde durchgeführt. Der Verzicht auf den Sensibilisierungsschritt mit Glutardialdehyd hat zur Folge, dass nachfolgende Waschschriffe nicht in dem Umfang wie bei der analytischen Silberfärbung durchzuführen sind. Es wird daher ein 10-minütiger Waschschriff in 30 % (v/v) Ethanol durchgeführt. Nach 1 Minute Inkubation in 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat folgen zwei einminütige Spülungen mit Millipore-Wasser und 1 Stunde Inkubation in 0,15 %

(w/v) Silbernitratlösung. Die Entwicklung der Gele folgt demselben Schema wie bei der analytischen Silberfärbung, jedoch mit abgewandelter Entwicklerlösung (2,5 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,02 % (w/v) Natriumhydrogencarbonat, 0,015 % (v/v) Formaldehyd und 0,025 % (w/v) Thimerosal) und reiner EDTA-Lösung (0,05 M Titriplex ohne Formaldehyd) zur Abstopfung der Entwicklung. Nach mindestens 20-minütiger Inkubation in der Stopplösung werden die Gele in Millipore gewässert, zur Dokumentation eingescannt und eingeschweißt bei 4 °C gelagert. Ein rasches Ausstanzen zu identifizierender Proteinspots ist empfehlenswert, da eine Diffusion der Proteine im Gel nicht ausgeschlossen werden kann.

### 2.5.2 Kolloidale Coomassie-G250-Färbung

Eine bereits seit längerer Zeit verfügbare Färbemethode für massenspektrometrische Analyse Zwecke ist die kolloidale Coomassie-G250-Färbung nach Doherty et al. [61]. Ihre Sensitivität liegt unter denen der beiden verwendeten Silberfärbungen, und auch das resultierende Spotmuster unterscheidet sich teilweise. Ein weiterer Nachteil ist der hohe Zeitaufwand. Daher kommt diese Färbung nur für die ersten analytischen Gele vor der Verfügbarkeit der massenspektrometrie-kompatiblen Silberfärbung zum Einsatz.

Nach der SDS-PAGE erfolgt eine mindestens zweistündige Fixierung der Gele in 2 % (v/v) Phosphorsäure und 50 % (v/v) Methanol. Es schließt sich eine Inkubation in 17 % (w/v) Ammoniumsulfat, 2 % (v/v) Phosphorsäure und 50 % (v/v) Methanol an. Nach Ablauf einer Stunde wird pro Liter Inkubationslösung 0,66 g Coomassie-G250 gleichmäßig über die Flüssigkeitsoberfläche gestreut. Die Färbung wird dann bis zu 5 Tage durchgeführt und ist beendet, wenn die Färbelösung beginnt, wässrig-klar zu werden und im Gel deutlich Spots zu erkennen sind. Mehrfaches Spülen in Millipore-Wasser entfernt Farbreste von den Gelen, so dass diese bis zur Verwendung eingeschweißt bei 4 °C gelagert werden können.

## 2.6 Bildauswertung

Obwohl es mittlerweile eine Vielzahl von Programmen zur computergestützten Bildauswertung von 2-DE-Gelen gibt (zum Beispiel Z3 [168] (Compugen Tel Aviv, Israel), Proteomweaver™ (DEFiNiENS, München, Deutschland) oder Delta 2D [124] (Decodon, Greifswald, Deutschland)) wird die alte, analoge Methode der visuellen Auswertung auf einem Leuchtkasten bevorzugt. In gewissem Rahmen mögen die Programme durchaus eine Erleichterung darstellen, und in jedem Fall liefern sie Zahlenwerte für quantitative Unterschiede von Spots. Jedoch ist auch heute noch entgegen aller Herstellerangaben ein nicht zu unterschätzender Aufwand zur Nachbearbeitung der detektierten Spots und ihrer Zuordnung zwischen den Probenpaaren notwendig. Dies kann bei so komplexen Proteinmustern, wie sie durch die Klose-Technik [110] erreicht werden, einen erheblichen Zeitaufwand bedeuten. Der Nutzen hieraus ist für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit hingegen gering. Zudem kann ein solcher Ansatz der 2-DE, wie er in dieser Arbeit verwendet wird, als Screeningmethode angesehen werden, die nicht zur Ermittlung genauer Quantitäten dienen soll. Es wird lediglich ermittelt, welche Proteine überhaupt



für weitere Untersuchungen von Interesse sein können. Daher wird auch auf eine computergestützte Quantifizierung der durch eine visuell-analoge Untersuchung beobachteten Unterschiede verzichtet.

Zur Auswertung der Spotmuster werden immer die korrespondierenden, im selben Elektrophoreselauf miteinander aufgetrennten Gelhälften eines Probenpaares verglichen und nach sich unterscheidenden Spots durchsucht. Es werden quantitative (größerer/kleinerer, intensiverer/lichterer oder auch vorhandener/fehlender Spot) und qualitative (Positionsveränderung) Unterschiede berücksichtigt und entsprechend gekennzeichnet. Begonnen wird mit dem am weitesten fortgeschrittenen Stadium des jeweiligen Organs. Es werden nur jene Spots weiter untersucht, die sich in allen Probenpaaren in der gleichen Weise verändert zeigen. Diese Spots werden dann in früheren Infektionsstadien betrachtet und bei einer Veränderung entsprechend gekennzeichnet. Um neben der Art der Veränderung eine gewisse Einteilung vornehmen zu können, wird eine »Intensitätsänderung« für jeden einzelnen Spot jedes einzelnen Stadiums im Vergleich zur Kontrolle vergeben. Dabei werden folgende Kürzel zur Bezeichnung und Zusammenfassung der beobachteten Veränderungen verwendet:

↑	Stärkere Spots
↓	Schwächere Spots
+	Leicht stärkere Spots
++	Deutlich stärkere Spots
+++	Sehr deutlich stärkere Spots
–	Leicht schwächere Spots
--	Deutlich schwächere Spots
---	Sehr deutlich schwächere Spots
Σ↑	Summe aller stärkeren Spots
Σ↓	Summe aller schwächeren Spots
Σ	Summe aller veränderten Spots

## 2.7 Spotidentifizierung

### 2.7.1 Ausstanzen von Proteinspots

Die differenziert bewerteten Spots werden für eine massenspektrometrische Analyse aus massenspektrometrie-kompatibel gefärbten Gelen ausgestanzt. Heben und Senken eines Pumpenkolbens saugt Luft oder Flüssigkeit durch die im Innendurchmesser 1 mm weite, zylindrische Spitze in einen manuellen Ausstanzer oder stößt diese wieder aus. Das zu bearbeitende Gel wird unter Wasser gelagert, um eine Kontamination mit Keratinmaterial gering zu halten und einen besseren Saugeffekt des Ausstanzers zu erreichen. Mit heruntergedrücktem Kolben wird die Gerätespitze auf den intensivsten Bereich des auszustanzenden Spots gesetzt. Langsames Heben des Kolbens saugt das ausgeschnittene Gelstück zusammen mit etwas Flüssigkeit in den Spotausstanzer. Das Material kann in ein Eppendorfgefäß oder das Well einer Mikrotiterplatte überführt werden. Die Proben werden bis zur Weiterverarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.7.2 Massenspektrometrie

Alle nach dem Ausstanzen der Spots notwendigen Arbeiten bis hin zur Datenbanksuche/Identifizierung wurden in der AG Klose, Humangenetik Charité von Frau Dipl.-Ing. (FH) Grit Nebrich (MALDI), Frau Silke Becker und Herrn Dipl.-Ing. (FH) Maik Wacker (beide ESI) durchgeführt.

Die Massenspektrometrie ist eine Technik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen in einem Hochvakuum. Dazu werden die zu analysierenden Proteine in ihren ausgestanzten Gelstücken tryptisch zu Peptiden verdaut, diese aus der Gelmatrix herausgelöst und mittels verschiedener Techniken (je nach Massenspektrometer) in einen geladenen Zustand versetzt (»ionisiert«). Die Ionen werden durch ein Hochvakuum geschossen und treffen in Abhängigkeit ihrer Größe und Ladung nach unterschiedlicher Zeit am Detektor auf. Das daraus errechnete Massenspektrum und die bestimmten Peptidsequenzen werden zur computergestützten Suche in der nicht-redundanten Sequenz-Datenbank NCBI verwendet.

### 2.7.3 Charakterisierung der Proteine

Weitere Informationen zu den identifizierten Proteinen (z. B. Alternativnamen, Genbezeichnung ...) werden anhand der gi-Nummern der *Entrez*-Proteindatenbank entnommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Zusätzliche Informationen zur Charakterisierung der Proteine, z. B. Informationen zu Funktion und Molekülklasse, werden der *UniProt*-Datenbank (<http://www.ebi.uniprot.org/>) und der *Human Protein Reference Database* (<http://www.hprd.org/>) entnommen.

## 3 Ergebnisse

Die verwendeten Proteinextrakte der vorliegenden Untersuchung entstammen zwei verschiedenen Tierserien. Die Milzen stammen aus oral infizierten C57Bl/6-Mäusen zu den definierten Zeitpunkten 12, 16 und 20 Wochen nach der Erregerapplikation, die Extraktion der Proteine erfolgte fraktioniert (plasmatische Fraktion (Milz-Überstand, MIÜ), membranassoziierte Fraktion (Milz-Rückstandsextrakt, MIRE), Kernfraktion (Milz-Rückstandssuspension, MIRS)). Die Proteinextraktion der Gehirne aus den intrazerebral infizierten C57Bl/6-Mäusen erfolgte als Gesamtextrakt (GGE) der definierten Zeitpunkte 11, 14 und 18 Wochen nach Erregerapplikation sowie im terminalen Stadium 21 Wochen nach der Infektion.

Ein Protein kann aus mehreren Spots auf dem Gel bestehen. Die Ursache hierfür können vielfältig sein: Spleißvarianten sind ebenso denkbar wie Glykosylierungen und Phosphorylierungen als posttranslationale Ereignisse. Unabhängig von der Ursache werden in der vorliegenden Arbeit alle Spots desselben identifizierten Proteins als Isoform bezeichnet.

### 3.1 Untersuchung der Proteinmuster der Milz

Für die Untersuchung differentieller Proteinspots im Milzgewebe werden die Organe dreier Stadien der oral infizierten Tiere verwendet. 12 Wochen (12 W) nach der Verfütterung des infektiösen Materials ist noch keine oder eine beginnende Infektion in der Milz zu erwarten, nach 16 Wochen (16 W) hat sich die Infektion im Organ etabliert, und das Stadium 20 Wochen (20 W) nach Infektion lässt eine voll ausgeprägte Infektion erwarten. Eine Überprüfung des Infektionsstatus erfolgt durch einen Immunoblot des PrP<sup>Sc</sup>.

#### 3.1.1 Differentielle Proteinspots im Überstand (plasmatische Fraktion)

##### 3.1.1.1 Das am weitesten fortgeschrittene Stadium (20 Wochen)

Die Auswertung der löslichen Proteinmuster der Milz (MIÜ; Abb. A.1) wird zunächst so durchgeführt, dass nach Möglichkeit alle in den drei Laufpaaren gleichgerichteten Unterschiede erfasst und numeriert werden, selbst wenn diese äußerst schwach erscheinen. Es sind nur Intensitätsvarianten, aber keine konstanten Positionsveränderungen vorhanden:

Intensitätsänderung:	↑		↓		Σ
Spotzahl MIÜ (20 W):	116		47		163

### 3.1.1.2 In früheren Stadien wiederzufindende Unterschiede

Diese insgesamt 163 Spots, welche im Stadium 20 W nach der Infektion in der plasmatischen Fraktion der Milz verändert sind, werden in den Gelpaaren der früheren Milz-Stadien 16 W und 12 W auf Veränderungen hin untersucht. Nur diejenigen Spots werden weiterhin in die Untersuchungen einbezogen, welche innerhalb des Stadiums gleichgerichtet verändert sind. Anschließend wird die »Intensitätsänderung« für jeden einzelnen Spotunterschied vergeben (Tab. B.1). Diese wird nun zur Eingrenzung der gefundenen Spotunterschiede herangezogen: Um einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen zu werden, muss ein Spot entweder auch in einem früheren Stadium verändert sein oder mindestens einen deutlichen (++) Unterschied im 20 W-Stadium aufweisen. Diese Kriterien werden von 51 Spots der plasmatischen Fraktion erfüllt.

### 3.1.2 Differentielle Proteinspots im Rückstandsextrakt (membranassoziierte Fraktion)

#### 3.1.2.1 Das am weitesten fortgeschrittene Stadium (20 Wochen)

Die Auswertung der membranassoziierten Proteinmuster (MIRE; Abb. A.2) ergibt nur Intensitätsvarianten, jedoch keine konstanten Positionsveränderungen:

Intensitätsänderung:	↑	↓	Σ
Spotzahl MIRE (20 W):	137	76	213

#### 3.1.2.2 In früheren Stadien wiederzufindende Unterschiede

Analog zur Untersuchung der plasmatischen Fraktion werden diese 213 Proteinspots im 16 W-Stadium auf eine Veränderung hin untersucht (Tab. B.2; das Stadium 12 Wochen nach Infektion kann aus technischen Gründen nicht zur Auswertung herangezogen werden). Die angelegten Kriterien werden von 110 Spots der membranassoziierten Fraktion erfüllt.

### 3.1.3 Differentielle Proteinspots in der Rückstandssuspension (Kernfraktion)

Für die Kernproteine (MIRS) liegen aus technischen Gründen nur Daten des am weitesten fortgeschrittenen Stadiums 20 W vor. Die Auswertung erfolgt prinzipiell wie zuvor bereits für die beiden anderen Fraktionen beschrieben. Die erste Auswertung ergibt wiederum nur einheitliche Intensitäts-, jedoch keine Positionsvarianten

Intensitätsänderung:	↑	↓	Σ
Spotzahl MIRS (20 W):	77	22	99

Ein Beispiel des 2-DE-Musters zeigt die Abb. A.3. Da für diese Milz-Fraktion keine Daten aus früheren Infektionsstadien herangezogen werden können, dient allein die Intensitätsänderung des 20 W-Stadiums (Tab. B.3) als Kriterium für die weitere Untersuchung der

betreffenden Spots. Dazu muss ein Spot eine mindestens »deutliche« (++) Änderung aufweisen, um massenspektrometrisch analysiert zu werden.

### 3.1.4 Verteilung der Intensitätsänderungen in der Milz

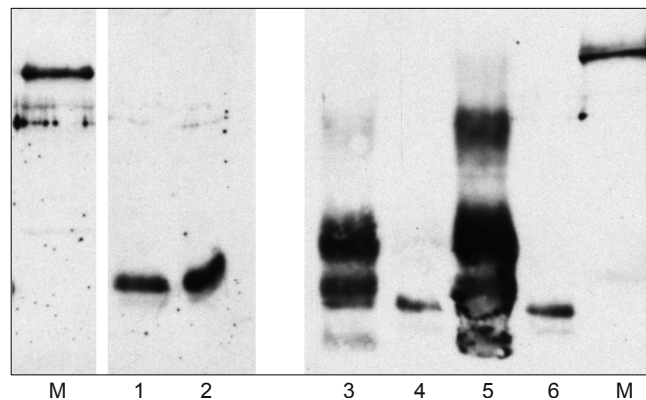
Eine Übersicht der Intensitätsänderungen der einer massenspektrometrischen Analyse unterzogenen Proteinspots aller drei Fraktionen zeigt, dass im am weitesten fortgeschrittenen Stadium (20 W) in der Milz überwiegend eine Intensitätserhöhung nach der Infektion mit Scrapie erfolgt.

	+	++	+++	$\Sigma \uparrow$	-	--	---	$\Sigma \downarrow$	$\Sigma$
MIÜ	3	32	0	35	1	15	0	16	51
MIRE	7	51	0	58	0	49	3	52	110
MIRS	/	12	0	12	/	10	0	10	22

MIÜ: plasmatische Fraktion; MIRE: membranassoziierte Fraktion; MIRS: Kernfraktion;  
/: entspricht nicht den Kriterien

### 3.1.5 Überprüfung der Infektion in der Milz

Zur Kontrolle des Infektionsstatus in der Milz stehen aus zurückgestellten Organen derselben Tierserie angefertigte Immunoblots aus dem Robert-Koch-Institut, »P25 Neurodegenerative Erkrankungen« zur Verfügung. Abb. 3.1 zeigt die Detektion des PrP<sup>Sc</sup> in Milzen der Stadien 12 W, 16 W und 20 W nach Proteinase-K-Verdau.



**Abbildung 3.1:** Detektion des PrP<sup>Sc</sup> in der Milz mittels Immunoblot nach Beekes [8] (Blotting des aufgereinigten Prion-Proteins nach Proteinase-K-Verdau und anschließende Detektion mit hauseigenem Anti-Maus-Prion-Protein-Antikörper). (M) Marker, (1) 12 Wochen nach Infektion (n. I.) Scrapie, (2) 12 Wochen n. I. Mock, (3) 16 Wochen n. I. Scrapie, (4) 16 Wochen n. I. Mock, (5) 20 Wochen n. I. Scrapie, (6) 20 Wochen n. I. Mock. 12 Wochen nach der oralen Infektion ist noch nicht das typische Dreibandmuster des PrP<sup>Sc</sup>, verursacht durch seine drei möglichen Glykosylierungsformen, zu sehen. Erst nach 16 Wochen ist der Erreger in der infizierten Milz nachzuweisen (Spalte 4), seine Konzentration nimmt zum letzten untersuchten Stadium von 20 Wochen n. I. noch weiter zu (Spalte 6). Die Kontrolltiere sind erwartungsgemäß negativ. (Blot freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Baier und K. Krohn, RKL.)

## 3.2 Untersuchung der Proteinmuster des Gehirns

Für die Untersuchung der differentiellen Proteinexpression des Gehirns werden die Proben aus der Serie intrazerebral infizierter Tiere verwendet. Die Proben entstammen den dem Infektionsverlauf angepassten vier Stadien 11 Wochen (11 W), 14 Wochen (14 W), 18 Wochen (18 W) und 21 Wochen (21 W; terminal) nach der Erregerapplikation. Eine Überprüfung des Infektionsstatus erfolgt durch einen Immunoblot des PrP<sup>Sc</sup>.

### 3.2.1 Unterschiede im terminalen Stadium (21 Wochen)

Auch beim Gesamtextrakt des Gehirns (GGE) wird mit dem spätesten Stadium begonnen. Ein repräsentatives 2D-Gel ist im Anhang in Abb. A.4 zu sehen. Die Auswertung der Individuen-Probenpaare erfolgt unabhängig voneinander, die gefundenen Spotunterschiede werden zwischen den drei Paaren verglichen. Nur die innerhalb des terminalen Stadiums gleichgerichtet veränderten Spots werden für eine weitere Analyse markiert und numeriert. Es sind auch hier ausschließlich homogene Intensitätsänderungen zu finden:

Intensitätsänderung:	↑	↓	Σ
Spotzahl GGE (21 W):	266	69	335

### 3.2.2 In früheren Stadien wiederzufindende Unterschiede

Jeder dieser 335 veränderten Proteinspots wird mit jedem einzelnen Probenpaar der drei früheren Stadien (18 W, 14 W und 11 W) verglichen und markiert (Tab. B.4). Anders als bei der Milz, wo aufgrund des Poolens der Ausgangsproben immer eine einheitliche Veränderung eines Spots innerhalb eines Stadiums für dessen weitere Betrachtung zugrunde gelegt wird, werden die Spotunterschiede der jüngeren Gehirn-Stadien individuell in der Liste weitergeführt. Als Einschlusskriterium für weitere Betrachtungen dient hier eine gleichgerichtete Veränderung sowohl im terminalen Stadium 21 W als auch in allen drei Probenpaaren des davorliegenden Stadiums 18 W. Ist die Veränderung im 18 W-Stadium nicht einheitlich, so werden weiterhin diejenigen Spots erfasst, welche eine mindestens »deutliche« (++) Intensitätsänderung aufweisen.

### 3.2.3 Verteilung der Intensitätsänderungen im Gehirn

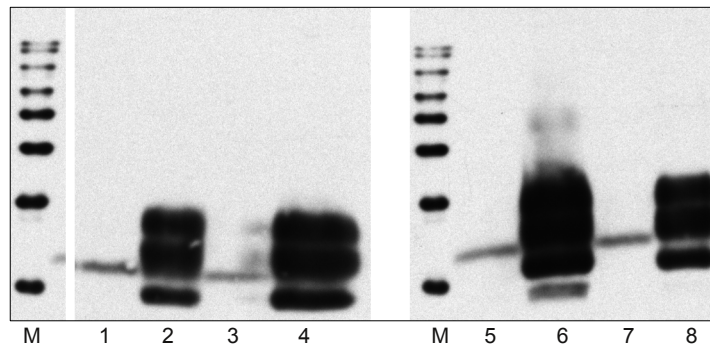
Eine Übersicht der Intensitätsänderungen der einer massenspektrometrischen Analyse unterzogenen Proteinspots zeigt, dass im terminalen Stadium (21 W) im Gehirn überwiegend eine Intensitätserhöhung nach der Infektion mit Scrapie erfolgt.

	+	++	+++	Σ↑	-	--	---	Σ↓	Σ
GGE-21 W	24	53	12	89	7	12	1	20	109

GGE: Gehirn Gesamtextrakt

### 3.2.4 Überprüfung der Infektion im Gehirn

Von den intrazerebral infizierten Tieren wurden Immunoblots aus Rückstellproben angefertigt, die eine grobe Verlaufskontrolle der Infektion ermöglichen (Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2:** Detektion des PrP<sup>Sc</sup> im Gehirn mittels Immunoblot nach Beekes [8] (Blotting des aufgereinigten Prion-Proteins nach Proteinase-K-Verdau und anschließende Detektion mit hauseigenem Anti-Maus-Prion-Protein-Antikörper). (M) Marker, (1) 11 Wochen n. I. Mock, (2) 11 Wochen n. I. Scrapie, (3) 14 Wochen n. I. Mock, (4) 14 Wochen n. I. Scrapie, (5) 18 Wochen n. I. Mock, (6) 18 Wochen n. I. Scrapie, (7) 21 Wochen n. I. Mock, (8) 21 Wochen n. I. Scrapie. In allen vier untersuchten Stadien ist die Infektion im Gehirn voll etabliert und das typische Dreibandmuster des PrP<sup>Sc</sup>, verursacht durch seine drei möglichen Glykosylierungsformen, zu sehen, die Kontrollen sind erwartungsgemäß negativ. (Blot freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Baier und K. Krohn, RKI.)

### 3.3 Identifizierte Proteine

Von den insgesamt 292 einer massenspektrometrischen Analyse unterzogenen Spots wurden 195 Spots identifiziert (ca. 67 %). Darin enthalten sind ausschließlich sicher identifizierte Einzelspots. Die erhaltenen Proteine werden einer Datenbankrecherche unterzogen und anhand ihrer Zuteilung zu biologischen Prozessen in Gruppen eingeteilt.

#### 3.3.1 Veränderte Proteine der Milz

Insgesamt sind 183 Spots in allen drei Milzfraktionen von einer Veränderung betroffen. Davon konnten 132 Spots (72 %) identifiziert werden. Diese Spots repräsentieren 106 unterschiedliche Proteine. Dieser Unterschied ist damit zu erklären, dass ein Protein aus mehreren Spots, in der vorliegenden Arbeit unabhängig von der Ursache (Spleißvariante, posttranslationale Modifikation) als Isoformen bezeichnet, bestehen kann, welche in Form mehrerer Spots an unterschiedlichen Positionen des Gels erscheinen. Ein Spot repräsentiert somit eine Protein-Isoform.

##### 3.3.1.1 Klassifizierung der plasmatischen Proteine

Aus der Überstandsfraktion der Milz (MIÜ) konnten 38 der 51 differentiellen Spots identifiziert werden (75 %). Sie repräsentieren 34 verschiedene Proteine und können in sechs Proteinklassen unterteilt werden. In Tab. 3.1 ist die Verteilung der Spots und Proteine in die verschiedenen Klassen dargestellt.

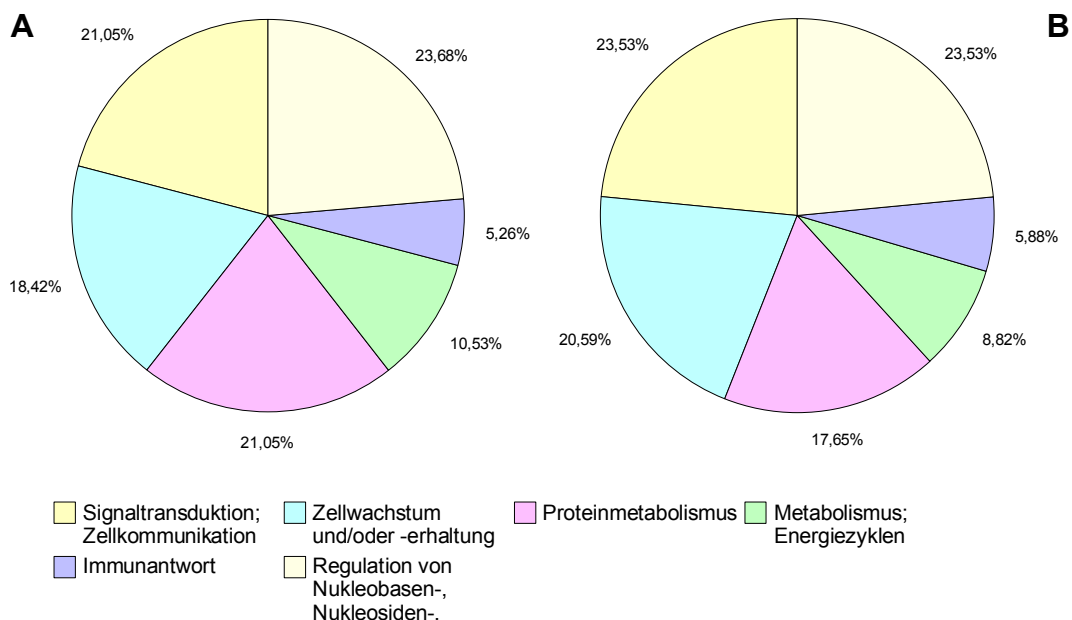
Einen grafischen Überblick über die Klassenverteilung geben die Kreisdiagramme in Abb. 3.3. Im linken Diagramm (A) ist die Verteilung der Spotanzahl pro Klasse dargestellt. Im rechten Diagramm (B) ist die Verteilung der verschiedenen identifizierten Proteine pro Klasse dargestellt. Die Verteilung in die Klassen ist für Spots und Proteine sehr ähnlich. Jedes Protein repräsentiert im Schnitt 1,12 Spots (bzw. jeder Spot 0,89 Proteine).

### 3 ERGEBNISSE

**Tabelle 3.1:** Klassenzuordnung (Biologischer Prozess) der in der plasmatischen Fraktion (Milz-Überstand) gefundenen und identifizierten Proteinspots.

PROTEINKLASSE	SPOTS	PROTEINE
Signaltransduktion, Zellkommunikation	8	8
Zellwachstum und/oder -erhaltung	7	7
Proteinmetabolismus	8	6
Metabolismus; Energiezyklen	4	3
Immunantwort	2	2
Regulation von Nucleobasen-, Nucleosiden-, Nucleotiden- und Nucleinsäure-Metabolismen	9	8
Summe	38	34

Eine Übersicht über alle identifizierten Proteine dieser Fraktion, ihre Klassenzugehörigkeit, Funktion und jeweilige Spotanzahl stellt Tab. 3.2 dar.



**Abbildung 3.3:** Klassifizierung der plasmatischen Fraktion (MIÜ). Prozentuale Verteilung der Spots (A) und Proteine (B) des Milz-Überstandes auf die verschiedenen Proteinklassen.



### 3.3 Identifizierte Proteine

**Tabelle 3.2:** Zuordnung der im Milz-Überstand identifizierten plasmatischen Proteine zu den Proteinklassen. Ebenfalls angegeben ist die Anzahl der pro Protein beteiligten Spots in dieser Fraktion. Details, wie z. B. eventuelle Synonyme sowie die Art und der Grad der Expressionsveränderung sind in Tab. C.1 aufgeführt.

KLASSE	PROTEIN	FUNKTION	SPOTS
<i>Signaltransduktion, Zellkommunikation</i>			
	Annexin A6	Kalziumbindung	1
	MNUDC protein (Nuclear distribution gene C homolog)	Zellzyklusregulation	1
	14-3-3 protein eta	Adaptermolekül; Signaltransduktion	1
	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	Adaptermolekül; Signaltransduktion	1
	Glia maturation factor gamma	Wachstumsfaktor	1
	Stress-induced-phosphoprotein 1	Adaptermolekül; Signaltransduktion	1
	Tyrosine-protein phosphatase, non-receptor type 6	Tyrosinphosphatase	1
	FK506-binding protein 2 precursor	Enzym: Isomerase	1
<i>Zellwachstum und/oder -erhaltung</i>			
	Ubiquitous tropomodulin	Zytoskelett (Bindung)	1
	Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	Zytoskelett (Struktur)	1
	Transgelin	Zytoskelett (Bindung)	1
	Ezrin	Zytoskelett (Ankerprotein)	1
	Radixin	Zytoskelett (Bindung)	1
	Gelsolin precursor	Zytoskelett (Struktur)	1
	Talin 1	Zytoskelett (Bindung)	1
<i>Proteinmetabolismus</i>			
	Elongation factor 2 (EF-2)	Translationsregulation	2
	Heat shock 70 kDa protein 4	Chaperon	1
	Placental thrombin inhibitor	Protease-Inhibitor	2
	Proteasome subunit alpha type 3	Ubiquitin Proteasom- System Protein	1
	Proteasome activator complex subunit 2	Ubiquitin Proteasom- System Protein	1
	Protein disulfide-isomerase A4 precursor	Chaperon	1
<i>Metabolismus; Energiezyklen</i>			
	Peroxiredoxin 2	Enzym: Peroxidase	2
	Peroxiredoxin 1	Enzym: Peroxidase	1
	Carbonic anhydrase II	Enzym: Carbonic Anhydrase	1
<i>Immunantwort</i>			
	Annexin A11	nicht klassifiziert	1
	Ig kappa chain V-V region MOPC 21 precursor	Immunglobulin	1

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. 3.2: Proteine im Milz-Überstand

KLASSE	PROTEIN	FUNKTION	SPOTS
<i>Regulation von Nukleobasen-, Nukleosiden-, Nukleotiden- und Nukleinsäure-Metabolismen</i>			
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Ribonukleoprotein	2
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	RNA-Bindung	1
	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	Ribonukleoprotein	1
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1/B0	Ribonukleoprotein	1
	Nucleolin (Protein C23)	RNA-Bindung	1
	SET protein	MHC-Komplex-Protein	1
	Chromobox protein homolog 1	DNA-Bindung	1
	DJ-1 protein	RNA-Bindung	1

### 3.3.1.2 Klassifizierung der membranassoziierten Proteine

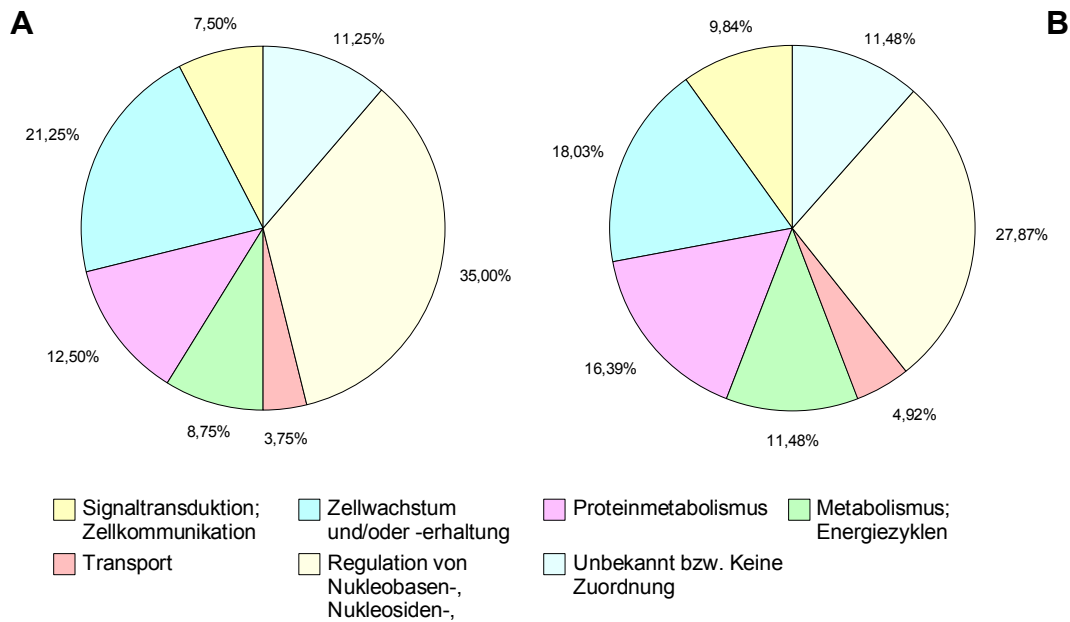
Aus dem Rückstandsextrakt der Milz (MIRE) sind 80 der 110 als differentiell gekennzeichneten Spots identifiziert (73 %). Sie repräsentieren 61 verschiedene Proteine. Von ihnen können 54 Proteine sechs Proteinklassen zugeordnet werden (Tab. 3.3).

Im grafischen Überblick über die Klassenverteilung erkennt man, dass die Verteilung in die Klassen für Spots und Proteine ähnlich ist. Es wird jedoch deutlich, dass die Verteilung der Proteine in die Klassen sich etwas gleichmäßiger darstellt als die Verteilung der Spots in die Proteinklassen. Den deutlichsten Unterschied zwischen den beiden Diagrammen zeigt die Klasse *Regulation von Nukleobasen-, Nukleosiden-, Nukleotiden- und Nukleinsäure-Metabolismen*. Schaut man sich das Verhältnis von Spots zu Proteinen an, fällt ein, dass das Verhältnis der Klasse *Regulation von Nukleobasen-, Nukleosiden-, Nukleotiden- und Nukleinsäure-Metabolismen* mit fast 1,65 Spots pro Protein am größten ist. Im Schnitt repräsentiert jedes Protein 1,31 Spots (bzw. jeder Spot nur 0,76 Proteine). Andererseits repräsentiert in den Klassen *Signaltransduktion, Zellkommunikation, Proteinmetabolismus, Metabolismus; Energiezyklen* und *Transport* genau ein Spot ein Protein.

Eine Übersicht wird in Tab. 3.4 gegeben.

**Tabelle 3.3:** Klassenzuordnung (Biologischer Prozess) der in der membranassoziierten Fraktion (Milz-Rückstandsextrakt) gefundenen und identifizierten Proteinspots.

PROTEINKLASSE	SPOTS	PROTEINE
Signaltransduktion, Zellkommunikation	6	6
Zellwachstum und/oder -erhaltung	17	11
Proteinmetabolismus	10	10
Metabolismus; Energiezyklen	7	7
Transport	3	3
Regulation von Nukleobasen-, Nukleosiden-, Nukleotiden- und Nukleinsäure-Metabolismen	28	17
Unbekannt bzw. Keine Zuordnung	9	7
Summe	80	61



**Abbildung 3.4:** Klassifizierung der membranassoziierten Fraktion (MIRE). Prozentuale Verteilung der Spots (A) und Proteine (B) des Milz-Rückstandsextraktes in die verschiedenen Proteinklassen.

**Tabelle 3.4:** Zuordnung der im Milz-Rückstandsextrakt identifizierten membranassoziierten Proteine zu den Proteinklassen. Ebenfalls angegeben ist die Anzahl pro Protein beteiligter Spots in dieser Fraktion. Details, wie z. B. eventuelle Synonyme sowie die Art und der Grad der Expressionsveränderung sind in Tab. C.2 aufgeführt.

KLASSE	PROTEIN	FUNKTION	SPOTS
<i>Signaltransduktion, Zellkommunikation</i>			
	Annexin A2	Kalziumbindung	1
	40S ribosomal protein SA	Ribosomale Untereinheit	1
	Prohibitin	Adaptormolekül; Signaltransduktion	1
	Bcas2 protein	Zellzyklusregulation	1
	A6 related protein (Twintifin-like protein)	Tyrosinkinase	1
	Malignant T cell amplified sequence 1	Zellzyklusregulation	1
<i>Zellwachstum und/oder -erhaltung</i>			
	Lamin B1	Strukturprotein	1
	Ezrin	Zytoskelett (Ankerprotein)	1
	Gelsolin precursor	Zytoskelett (Struktur)	1
	Aktin (vermutlich Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin))	Zytoskelett (Struktur)	3
	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	Zytoskelett (Struktur)	1
	Dynein intermediate chain 2, cytosolic	Motorprotein	1
	Vimentin	Zytoskelett (Struktur)	2
	F-actin capping protein alpha-2 subunit	Strukturprotein	1
	Stathmin	Strukturprotein	1
	Tubulin beta-5 chain	Zytoskelett (Struktur)	1

Fortsetzung nächste Seite

### 3 ERGEBNISSE

Fortsetzung von Tab. 3.4: Proteine im Milz-Rückstandsextrakt

KLASSE	PROTEIN	FUNKTION	SPOTS
	Caldesmon 1	Zytoskelett (Bindung)	4
<i>Proteinmetabolismus</i>			
	Nascent polypeptide-associated complex alpha polypeptide	Chaperon	1
	Elongation factor 1-alpha 1	Translationsregulation	1
	Eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit, X-linked	Translationsregulation	1
	Proteasome subunit alpha type 3	Ubiquitin-Proteasom-System	1
	Proteasome subunit alpha type 2	Ubiquitin-Proteasom-System	1
	Proteasome subunit beta type 8 precursor	Ubiquitin-Proteasom-System	1
	Proteasome subunit alpha type 6	Ubiquitin-Proteasom-System	1
	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1 alpha	Translationsregulation	1
	Nucleophosmin	Chaperon	1
	Poly [ADP-ribose] polymerase-1	Enzym: Ribosyltransferase	1
<i>Metabolismus; Energiezyklen</i>			
	Acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain	Enzym: Dehydrogenase	1
	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	Transportprotein	1
	Dihydrolipoamide S-succinyltransferase	Enzym: Acyltransferase	1
	Glutamate dehydrogenase, mitochondrial precursor (GDH)	Enzym: Dehydrogenase	1
	Fumarate hydratase, mitochondrial precursor	Enzym: Hydratase	1
	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mitochondrial precursor	Enzym: Dehydrogenase	1
	Glutaredoxin	Enzym: Oxidoreductase	1
<i>Transport</i>			
	Apolipoprotein A-I precursor	Transportprotein	1
	Ribosome-binding protein 1	Integrales Membranprotein	1
	Synaptosomal-associated protein 29	Membrantransportprotein	1
<i>Regulation von Nukleobasen-, Nukleosiden-, Nukleotiden- und Nukleinsäure-Metabolismen</i>			
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Ribonukleoprotein	1
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	RNA-Bindung	3
	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	Ribonukleoprotein	2
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1/B0	Ribonukleoprotein	3
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	Ribonukleoprotein	2
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	Ribonukleoprotein	1

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. 3.4: Proteine im Milz-Rückstandsextrakt

KLASSE	PROTEIN	FUNKTION	SPOTS
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	Ribonukleoprotein	3
	PTB-associated splicing factor	RNA-Bindung	1
	Chromobox protein homolog 3	DNA-Bindung	2
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	RNA-Bindung	1
	DNA topoisomerase I	Enzym: Topoisomerase	1
	Probable RNA-dependent helicase p68	RNA-Bindung	1
	Polyadenylate-binding protein 1	RNA-Bindung	1
	Transcription elongation regulator 1	Transkriptionsfaktor	1
	ELAV-like protein 1	RNA-Bindung	2
	Fibrillarin	Ribonukleoprotein	2
	Histone H4	DNA-Bindung	1
<i>nicht klassifiziert</i>			
	Polypirimidine tract binding protein	<i>nicht klassifiziert</i>	1
	Sideroflexin 3	<i>nicht klassifiziert</i>	1
	Chain L, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of The Mouse Anti- Human Fas Antibody Hfe7a	<i>nicht klassifiziert</i>	3
	Snd1-pending protein		1
	Pleiotropic regulator 1	<i>nicht klassifiziert</i>	1
	DnaJ homolog subfamily C member 9	<i>nicht klassifiziert</i>	1
	Chaperonin	<i>nicht klassifiziert</i>	1

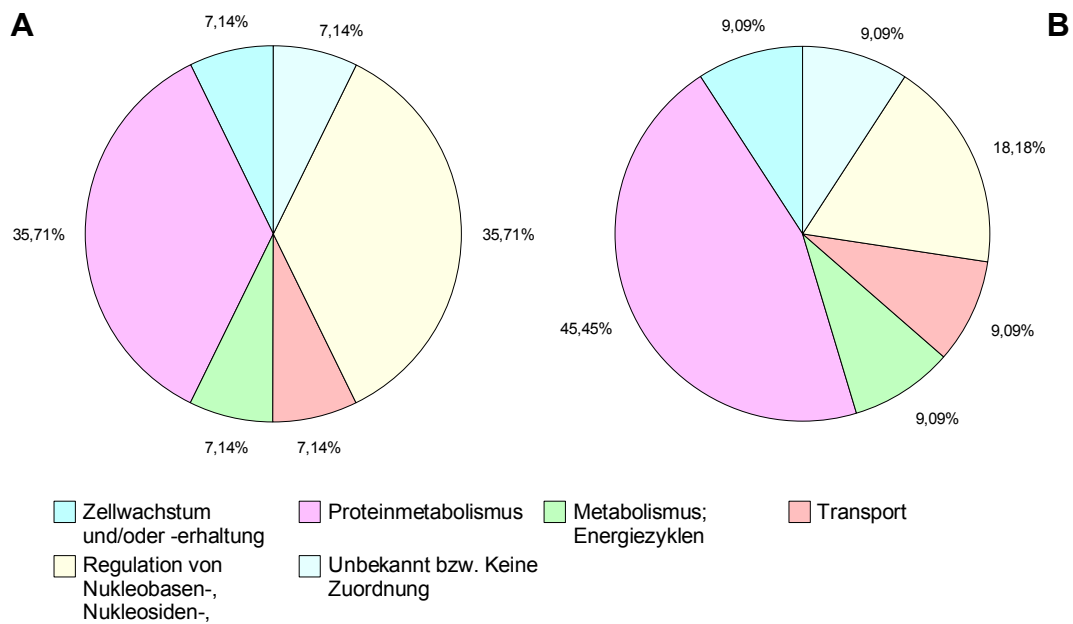
### 3.3.1.3 Klassifizierung der Kernproteine

Aus der Rückstandssuspension der Milz sind 14 der 22 als differentiell gekennzeichneten Spots identifiziert (64 %). Sie repräsentieren 11 verschiedene Proteine. Zehn von diesen können in fünf Proteinklassen eingeordnet werden (Tab. 3.5).

Einen grafischen Überblick über die Klassenverteilung geben die Kreisdiagramme in Abb. 3.5. Im linken Diagramm (A) ist die Verteilung der Spotanzahl pro Klasse dargestellt. Im rechten Diagramm (B) ist die Verteilung der verschiedenen identifizierten Proteine pro Klasse dargestellt.

**Tabelle 3.5:** Klassenzuordnung (Biologischer Prozess) der in der Kernfraktion (Milz-Rückstandssuspension) gefundenen und identifizierten Proteinspots.

PROTEINKLASSE	SPOTS	PROTEINE
Zellwachstum und/oder -erhaltung	1	1
Proteinmetabolismus	5	5
Metabolismus; Energiezyklen	1	1
Transport	1	1
Regulation von Nukleobasen-, Nukleosiden-, Nukleotiden- und Nukleinsäure-Metabolismen	5	2
Unbekannt bzw. Keine Zuordnung	1	1
Summe	14	11



**Abbildung 3.5:** Klassifizierung der Kernfraktion (MIRS). Prozentuale Verteilung der Spots (A) und Proteine (B) der Milz-Rückstandssuspension in die verschiedenen Proteinklassen.

**Tabelle 3.6:** Zuordnung der im Milz-Rückstandssuspension identifizierten Kernproteine zu den Proteinklassen. Ebenfalls angegeben ist die Anzahl pro Protein beteiligter Spots in dieser Fraktion. Details, wie z. B. eventuelle Synonyme sowie die Art und der Grad der Expressionsveränderung sind in Tab. C.3 aufgeführt.

KLASSE	PROTEIN	FUNKTION	SPOTS
<i>Zellwachstum und/oder -erhaltung</i>	Gelsolin precursor	Zytoskelett (Struktur)	1
<i>Proteinmetabolismus</i>	Tufm protein	Translationsregulation	1
	Proteasome subunit beta type 10 precursor	Ubiquitin-Proteasom-System	1
	60S ribosomal protein L12	Ribosomale Untereinheit	1
	T-complex protein 1, zeta subunit	Chaperon	1
	T-complex protein 1, alpha subunit A	Chaperon	1
<i>Metabolismus; Energiezyklen</i>	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2, mitochondrial precursor	Enzym: Reductase	1
<i>Transport</i>	Ferritin light chain 1	Speicherprotein	1
<i>Regulation von Nucleobasen-, Nucleosiden-, Nucleotiden- und Nucleinsäure-Metabolismen</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	Ribonucleoprotein	4
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	Ribonucleoprotein	1
<i>nicht klassifiziert</i>	Barrier-to-autointegration factor	DNA-Bindung	1

Da hier insgesamt nur relativ wenige Ergebnisse vorliegen, ist die Aussagekraft begrenzt. Schon eine kleine Änderung in der Aufteilung der Klassenzugehörigkeit hat große Auswirkungen auf die Zusammensetzung. Die Klasse *Regulation von Nukleobasen-, Nukleosiden-, Nukleotiden- und Nukleinsäure-Metabolismen* beherbergt als einzige einen Unterschied in Spot- und Proteinzahl. Beträgt das Verhältnis von Spots zu Proteinen insgesamt 1,27 (bzw. 0,78 Proteine pro Spot), so steigt es alleine für diese eine Klasse auf 2,5 Spots pro Protein (oder 0,4 Proteine pro Spot). Fünf Spots, welche nur zwei Proteine repräsentieren, verschieben die Anteile der Klassen sehr stark (Tab. 3.6).

### 3.3.2 Veränderte Proteine des Gehirns

#### 3.3.2.1 Klassifizierung der Gehirnproteine

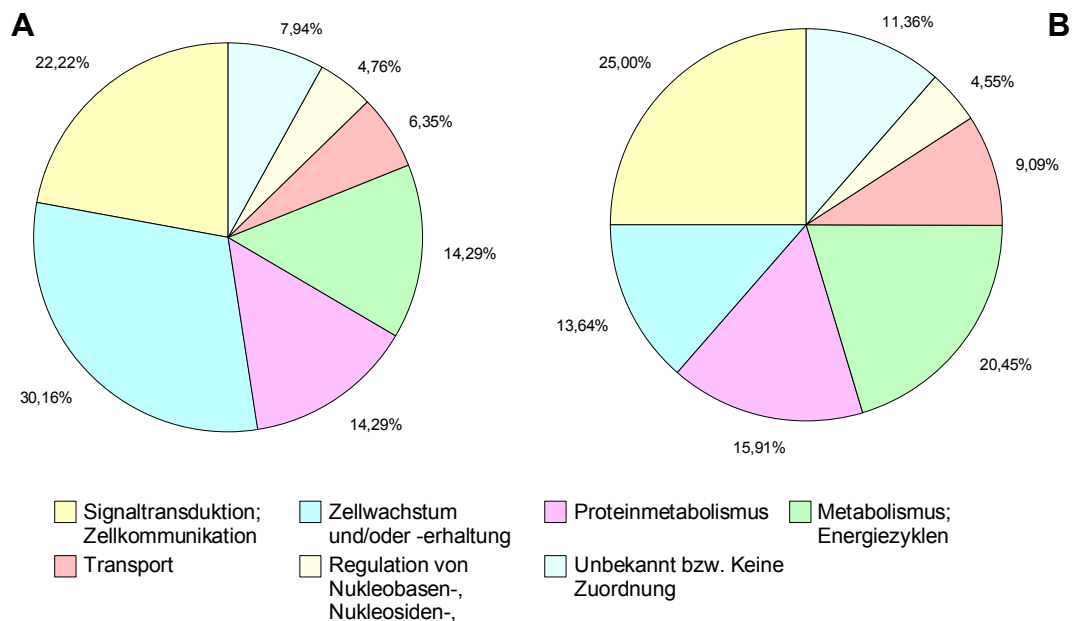
Aus dem Gesamtextrakt des Gehirns sind 63 der 109 als differentiell gekennzeichneten Spots identifiziert (58 %). Sie repräsentieren 44 verschiedene Proteine. Davon können 39 Proteine sechs Proteinklassen zugeordnet werden (Tab. 3.7).

Einen grafischen Überblick über die Klassenverteilung geben die Kreisdiagramme in Abb. 3.6 wieder. Im linken Diagramm (A) ist die Verteilung der Spotanzahl pro Klasse dargestellt. Im rechten Diagramm (B) ist die Verteilung der verschiedenen identifizierten Proteine pro Klasse dargestellt. Die Verteilung in die Klassen ist für Spots und Proteine zum Teil sehr unterschiedlich. Auch hier stellt die Verteilung der Proteine in die Klassen sich etwas gleichmäßiger dar als bei jener der Spots. Die größte Anteilseinbuße erleidet die Klasse *Zellwachstum und/oder -erhaltung*. Betrachtet man das Verhältnis von Spots zu Proteinen fällt auf, dass nur nahezu jeder dritte Spot dieser Klasse ein neues Protein repräsentiert (3,17 Spots pro Protein bzw. 0,32 Proteine pro Spot). Im Schnitt repräsentiert jedes Protein 1,43 Spots (bzw. jeder Spot 0,70 Proteine). Die Klassen *Metabolismus; Energiezyklen* und *Transport* haben ein ausgeglichenes Spot-Proteinverhältnis von 1:1, die übrigen Klassen zeigen nur moderate Abweichungen.

Alle identifizierten Proteine dieser Fraktion, ihre Klassenzugehörigkeit, Funktion und jeweilige Spotanzahl sind in Tab. 3.8 dargestellt.

**Tabelle 3.7:** Klassenzuordnung (Biologischer Prozess) der im Gehirn-Gesamtextrakt gefundenen und identifizierten Proteinspots.

PROTEINKLASSE	SPOTS	PROTEINE
Signaltransduktion, Zellkommunikation	14	11
Zellwachstum und/oder -erhaltung	19	6
Proteinmetabolismus	9	7
Metabolismus; Energiezyklen	9	9
Transport	4	4
Regulation von Nukleobasen-, Nukleosiden-, Nukleotiden- und Nukleinsäure-Metabolismen	3	2
Unbekannt bzw. Keine Zuordnung	5	5
Summe	63	44



**Abbildung 3.6:** Klassifizierung der Gehirnpoteine (GGE). Prozentuale Verteilung der Spots (A) und Proteine (B) des Gehirn-Gesamtextraktes in die verschiedenen Proteinklassen.

**Tabelle 3.8:** Zuordnung der im Gehirn-Gesamtextrakt identifizierten Proteine zu den Proteinklassen. Ebenfalls angegeben ist die Anzahl pro Protein beteiligter Spots in dieser Fraktion. Details, wie z. B. eventuelle Synonyme sowie die Art und der Grad der Expressionsveränderung sind in Tab. C.4 aufgeführt.

KLASSE	PROTEIN	FUNKTION	SPOTS
<i>Signaltransduktion, Zellkommunikation</i>			
	Dynamin-1	GTPase	1
	Dihydropyrimidinase-like 2	Zytoskelett (Bindung)	2
	Annexin A5	Kalziumbindung	1
	Annexin A4	Kalziumbindung	1
	Elongation factor 1-delta	Guaninaustausch	2
	APC-binding protein EB1 homolog	Zellzyklusregulation	1
	Toll-interacting protein	Adaptermolekül; Signaltransduktion	1
	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	Transportprotein	1
	Synapsin I	nicht klassifiziert	1
	Synapsin II	nicht klassifiziert	2
	Septin 7	Zellzyklusregulation	1
<i>Zellwachstum und/oder -erhaltung</i>			
	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP)	Strukturprotein	11
	Actin-like protein 3	Zytoskelett (Struktur)	1
	Tropomodulin 2	Zytoskelett (Bindung)	1
	Calponin-3	Zytoskelett (Bindung)	1

Fortsetzung nächste Seite



### 3.3 Identifizierte Proteine

Fortsetzung von Tab. 3.8: Proteine im Gehirn-Gesamtextrakt

KLASSE	PROTEIN	FUNKTION	SPOTS
	Tropomyosin <sup>1</sup>	Zytoskelett (Bindung)	3
	Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	Zytoskelett (Struktur)	2
<i>Proteinmetabolismus</i>			
	Heat shock 70 kDa protein 4L	Hitzeschockprotein	1
	78 kDa glucose-regulated protein precursor	Chaperon	1
	Elongation factor 1 A-1	Translationsregulation	1
	Tufm protein	Translationsregulation	1
	Alpha(B)-crystallin	Hitzeschockprotein	2
	Cystatin C precursor	Proteaseinhibitor	2
	Ribonuclease UK114	Translationsregulation	1
<i>Metabolismus; Energiezyklen</i>			
	Creatine kinase, B chain	Enzym: Phosphotransferase	1
	Annexin A3	Enzym: Hydrolase	1
	Peroxiredoxin 6	Enzym: Peroxidase	1
	Guanine deaminase	Enzym: Deaminase	1
	Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	Enzym: Synthetase	1
	Trifunctional enzyme beta subunit, mitochondrial precursor	Enzym: Dehydrogenase	1
	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2, mitochondrial precursor	Enzym: Reductase	1
	Nitrilase homolog 1	<i>nicht klassifiziert</i>	1
	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A, ubiquitous isoform	Transportprotein	1
<i>Transport</i>			
	Apolipoprotein E precursor	Transportprotein	1
	Chloride intracellular channel protein 1	Intrazellulärer Kanal (Ligandvermittelt)	1
	Complexin 2	Transportprotein	1
	Voltage-gated potassium channel beta-2 subunit	Spannungsvermittelter Kanal	1
<i>Regulation von Nukleobasen-, Nukleosiden-, Nukleotiden- und Nukleinsäure-Metabolismen</i>			
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Ribonukleoprotein	2
	Chromatin assembly factor 1 subunit C	Transkriptionsregulation	1
<i>nicht klassifiziert</i>			
	Transgelin-2	<i>nicht klassifiziert</i>	1
	Septin 11	<i>nicht klassifiziert</i>	1
	Monoglyceride lipase	<i>nicht klassifiziert</i>	1
	repressor of estrogen receptor activity; B-cell associated protein	<i>nicht klassifiziert</i>	1
	Chain A, Crystal Structure Of Murine Arl3-Gdp	<i>nicht klassifiziert</i>	1

<sup>1</sup>eine genaue Klassifizierung der Isoform mittels MS gelang nicht

### 3.4 In Milz und Gehirn veränderte Protein-Isoformen

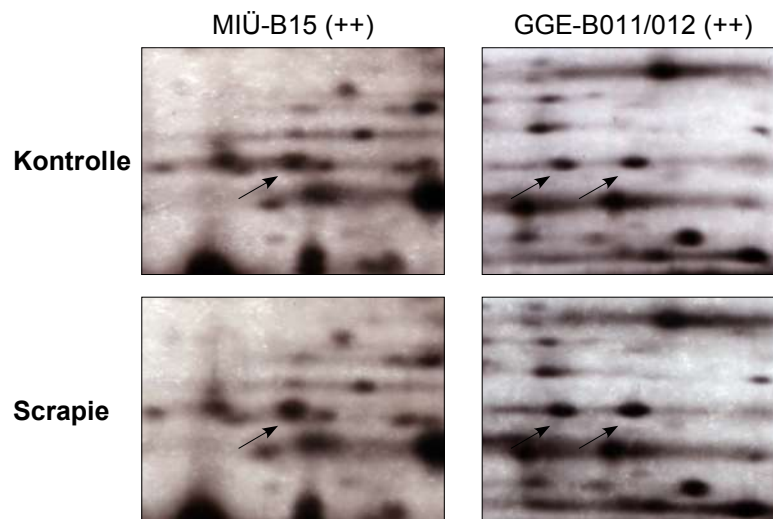
Einige Proteine zeigen sich nicht nur in einem der untersuchten Organe verändert, sondern in Gehirn und mindestens einer Milzfraktion zugleich. Diese fünf Proteine werden hier vorgestellt und anhand der Gelausschnitte je eines repräsentativen Probenpaares pro betroffenem Organ (bzw. der Milz-Fraktionen) des spätesten untersuchten Stadiums (Gehirn 21 W bzw. Milz 20 W) einander gegenübergestellt. Die betroffenen Spots sind mit einem Pfeil angezeigt und über den Probenpaaren ist die genaue Spotbezeichnung mit Organ- und Fraktionskürzel und Spotnummer und der Grad der Veränderung angegeben.

#### 3.4.1 Moesin (Membrane-Organizing Extension Spike Protein)

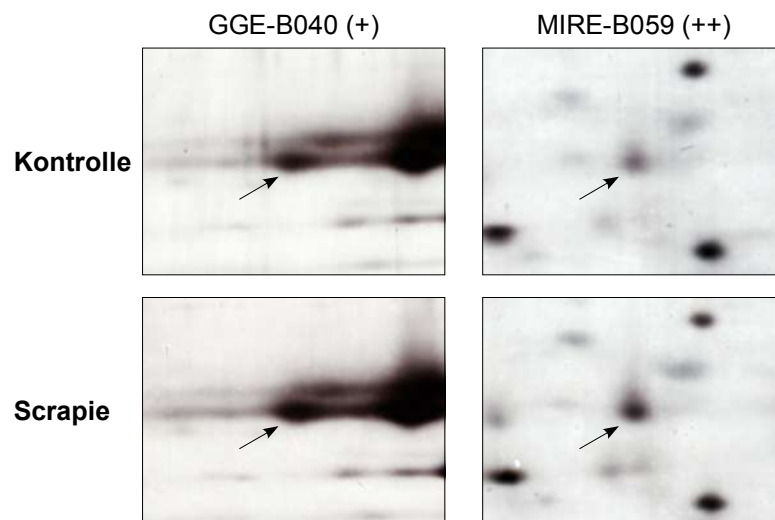
Das Protein Moesin (Membrane-Organizing Extension Spike Protein) liegt sowohl im Gesamtextrakt des Gehirns als auch im Überstand der Milz verändert vor. Es ist als Strukturprotein des Zytoskeletts an Zellwachstum und/oder -erhaltung beteiligt und in allen drei gefundenen Spots gegenüber der Kontrolle deutlich erhöht (++) , wie Spots der beiden Organe in Abb. 3.7 zeigen. Abb. 3.21 verdeutlicht die Position der beiden Gehirnsports zueinander.

#### 3.4.2 Elongation Factor 1 Alpha

Der Elongation Factor 1 Alpha (Eef1A1) ist im Gehirn und im Rückstandsextrakt der Milz verändert. Das an der Translationsregulation des Proteinmetabolismus beteiligte Protein ist im Gehirn zum Ende der Erkrankung hin leicht erhöht (+), in der Milz sogar deutlich (++) (siehe Abb. 3.8).



**Abbildung 3.7:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Dargestellt sind die als Moesin identifizierten Spots im Vergleich zwischen Gehirn und Milz-Überstand. Die markierten Spots entsprechen den Proteinspots MIÜ-B15 (plasmatische Fraktion Milz, linkes Ausschnitt-paar) sowie GGE-B011 und GGE-B012 (Gehirn-Gesamtextrakt, rechtes Ausschnitt-paar).



**Abbildung 3.8:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Der Elongation Factor 1 Alpha im Vergleich zwischen Gehirn und Milz-Rückstandsextrakt. Die Pfeile zeigen auf den als Eef1A1 identifizierten Spot in Gehirn (GGE-B040) bzw. Milz-Rückstandsextrakt (membranassozierte Fraktion, MIRE-B059).

### 3.4.3 Tu Translation Elongation Factor

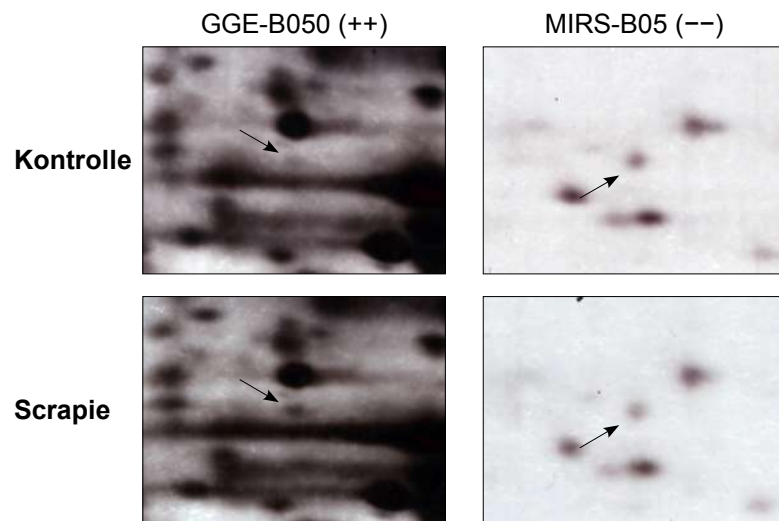
Der Tu Translation Elongation Factor (Tufm) ist im Gehirn und der Milz-Rückstandssuspension verändert. Während im Gehirn eine deutliche Erhöhung der Spotintensität aufgrund der Erkrankung festzustellen ist (++)), stellt sich der betreffende Spot in der Milzfraktion je nach Probenpaar leicht bis deutlich schwächer gegenüber der Kontrolle dar (- bzw. --). Die Abb. 3.9 zeigt zwei repräsentative Ausschnittpaare dieses an der Translationsregulation des Proteinmetabolismus beteiligten Proteins.

### 3.4.4 Ubiquinol-Cytochrome-C Reductase Core Protein 2

Das Ubiquinol-Cytochrome-C Reductase Core Protein 2, auch als RIKubiquinol Cytochrome C Reductase Core Protein 2 oder Ubiquinol-Cytochrome-C Reductase Complex Core Protein 2, Mitochondrial Precursor bezeichnet, ist eine an Metabolismus und Energiezyklen beteiligte Reduktase. Sie ist Bestandteil des Ubiquinol-Cytochrome-C-Reduktase-Komplexes (auch »Cytochrome B-C1 Komplex«, »Komplex III«), einem Teil der mitochondrialen Atmungskette. Es findet sich neben dem deutlich erhöhten Gehirnsput (++) noch ein deutlich erniedrigter Spot in der Milz-Rückstandssuspension (--) (Abb. 3.10).

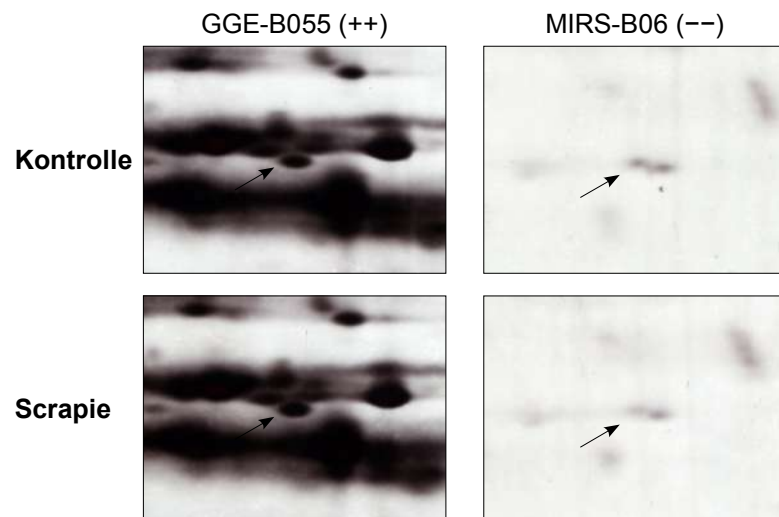
### 3.4.5 Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K

Ein weiteres Ribonucleoprotein aus der großen Gruppe der für die Regulation von Nucleobasen-, Nucleosiden-, Nucleotiden- und Nucleinsäure-Metabolismen verantwortlichen Proteine ist das Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K (HnripK). Seine veränderte Expression ist in beiden untersuchten Organen und gleich zwei Fraktionen der Milz festzustellen. Die beiden Spots im Gehirn sind leicht bis deutlich (GGE-A022 (+ bzw. ++)) bzw. deutlich (GGE-A023 (++) erhöht. Ihre Position im Gel veranschaulicht Abb. 3.21.

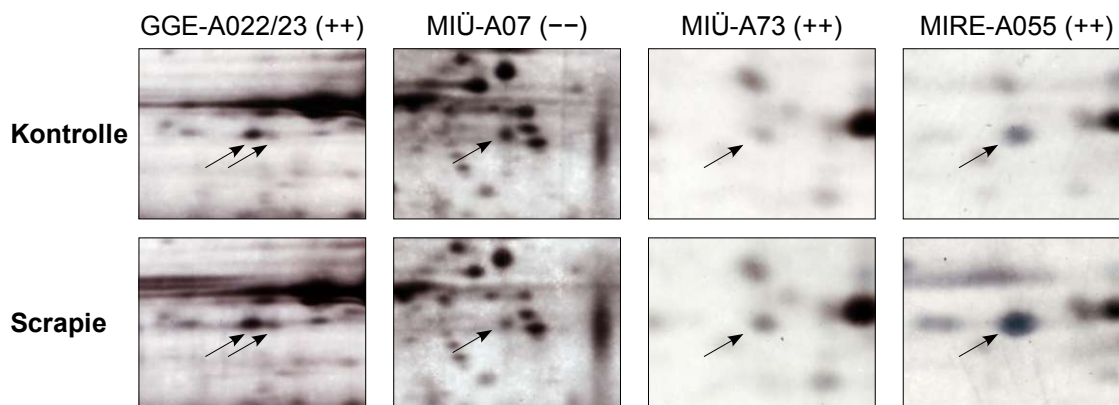


**Abbildung 3.9:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Der Tu Translation Elongation Factor im Vergleich zwischen Gehirn und Milz-Rückstandssuspension. Die Pfeile zeigen auf den als Tu<sub>fm</sub> identifizierten Spot GGE-B050 (Gehirn) bzw. MIRS-B05 (Milz-Kernfraktion, hier ein Paar mit deutlicher Erniedrigung im infizierten Tier (–)).

Im Milz-Überstand sind zwei Spots von einer Veränderung betroffen. Der Spot MIÜ-A07 ist deutlich erniedrigt, während der Spot MIÜ-A73 eine deutliche Erhöhung durch die Infektion aufweist. Abb. 3.18 zeigt die Lage dieser beiden Spots zueinander. Der Spot MIÜ-A73 liegt auch gleichzeitig an identischer Position im Gel wie der Spot im Rückstandsextrakt (MIRE-A055), welcher ebenfalls eine deutliche Erhöhung (++) durch die Infektion aufweist. Bei diesen beiden erhöhten Rückstandsextrakt-Spots ist aufgrund der Position im Gel von Fragmenten des HnrpK auszugehen (Abb. 3.11).



**Abbildung 3.10:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Ubiquinol-Cytochrome-C Reductase Core Protein 2: Vergleich zwischen Gehirn (GGE-B055) und Milz-Rückstandssuspension (Kernfraktion, MIRS-B06).



**Abbildung 3.11:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Das Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K im Vergleich zwischen Gehirn (GGE-A022/23), Milz-Überstand (plasmatische Fraktion, MIÜ-A07, MIÜ-A73) und Milz-Rückstandsextrakt (membranassoziierte Fraktion, MIRE-A055). Die Spots MIÜ-A73 (dritte Spalte) und MIRE-A055 (letzte Spalte) sind aufgrund der Gelposition vermutlich identisch.

### 3.5 In mehreren Milzfraktionen veränderte Protein-Isoformen

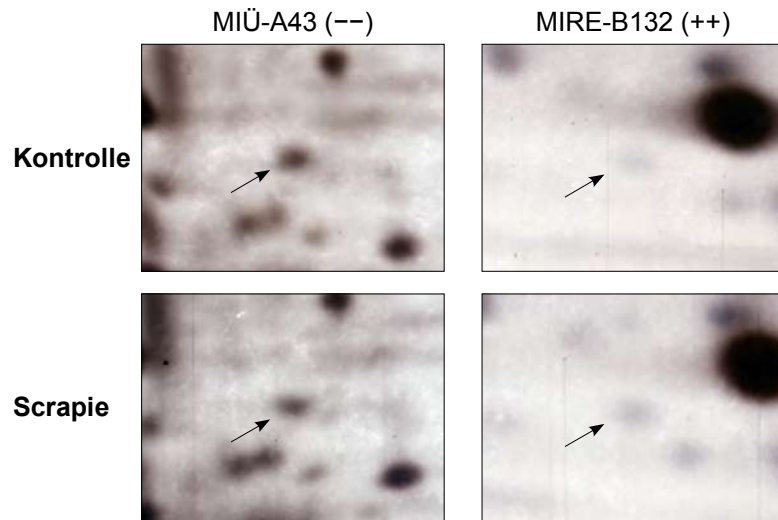
Einige der identifizierten Proteine kommen nicht nur in einer Fraktion der Milz vor, sondern lassen sich sogar in zwei oder gar allen drei Milzfraktionen nachweisen. Hier werden diese Proteine vorgestellt und anhand der Gelausschnitte je eines repräsentativen Probenpaares pro betroffener Fraktion des spätesten untersuchten Stadiums (20 W) einander gegenübergestellt. Die fraglichen Spots sind mit einem Pfeil angezeigt und über den Probenpaaren ist die genaue Spotbezeichnung mit Organ- und Fraktionskürzel und Spotnummer und der Grad der Veränderung angegeben. Ausgenommen ist hier das Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K (HnrpK) (Abschnitt 3.4.5).

#### 3.5.1 Proteasome Subunit Alpha Type 3

Die Proteasome Subunit Alpha Type 3 ist im Überstand deutlich erniedrigt (--) und im Rückstandsextrakt weitgehend deutlich erhöht (++). Abb. 3.12 stellt die Fraktionen einander gegenüber. Das Protein ist Teil des Ubiquitin-Proteasom-Systems und am Proteinmetabolismus beteiligt.

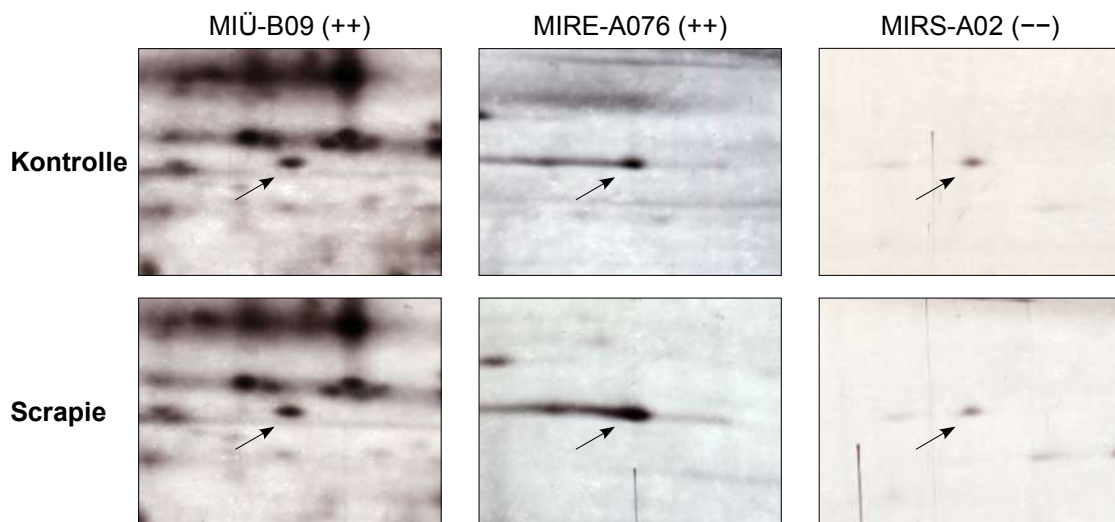
#### 3.5.2 Gelsolin

Das Protein Gelsolin ist in jeweils einem Spot des Überstandes, des Rückstandsextraktes und der Rückstandssuspension verändert. Es ist als Strukturprotein des Zytoskeletts an Zellwachstum und/oder -erhaltung beteiligt. Gelsolin ist involviert in die Bildung von Aktinfilamenten, indem es nach Kalziumaktivierung an das Plus-Ende der Aktinfilamente bindet (»Capping«) und so den Aktinmoneraustausch blockiert. Ebenso kann es Aktinfilamente aufbrechen und durch *Capping* eine Quervernetzung der Aktinfilamente verhindern. Andererseits kann es durch Nukleationsbildung den Aktinfilamentaufbau forcieren. Im Überstand ist eine leichte bis deutliche Erhöhung der Spotintensität nachzuweisen (+ bzw. ++), im Rückstandsextrakt eine durchweg deutliche Erhöhung (++)

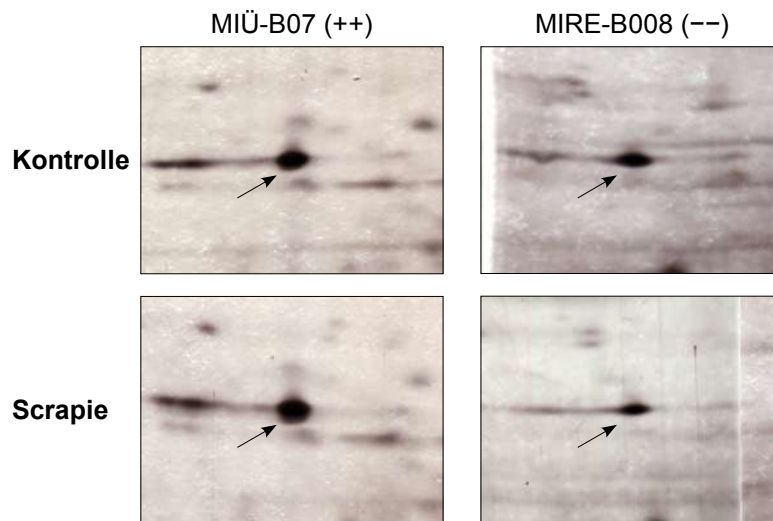


**Abbildung 3.12:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Die Proteasome Subunit Alpha Type 3 im Vergleich zwischen plasmatischer (MIÜ-A43) und membranassoziierter Fraktion (MIRE-B132).

und in der Rückstandssuspension eine einheitliche Erniedrigung (– –). Dies deutet auf eine Beeinflussung der Löslichkeit des Proteins oder des Protein-Turnovers infolge der Erkrankung hin (Abb. 3.13).



**Abbildung 3.13:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Der als Gelsolin identifizierte Spot im Vergleich zwischen den Fraktionen: plasmatische Fraktion (MIÜ-B09), membranassozierte Fraktion (MIRE-A076), Kernfraktion (MIRS-A02).



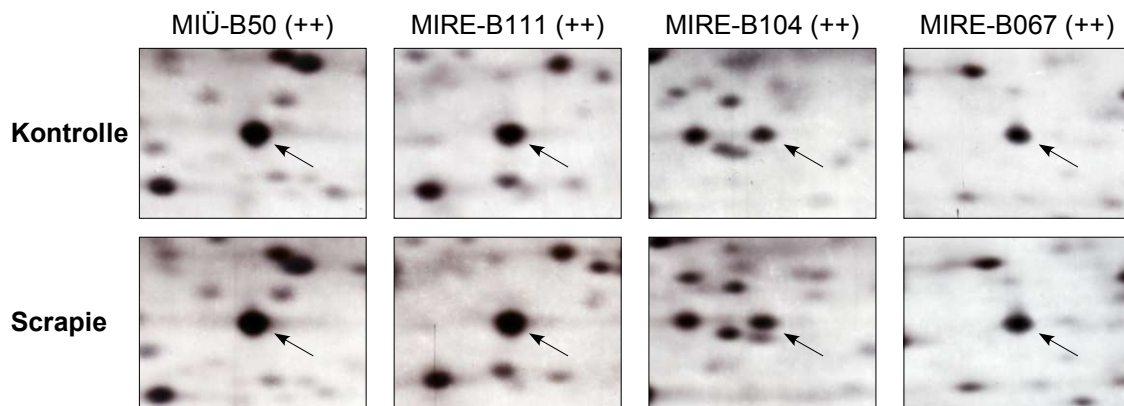
**Abbildung 3.14:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Das Protein Ezrin im Vergleich zwischen plasmatischer (Überstand, MIÜ-B07) und membranassoziierter Fraktion (Rückstandsextrakt, MIRE-B008). Ein Pfeil markiert die als verändert gekennzeichneten und als Ezrin identifizierten Proteinspots.

### 3.5.3 Ezrin (p81, Cytovillin, Villin 2)

Ezrin wird auch p81, Cytovillin und Villin 2 genannt und ist in jeweils einem Spot des Milz-Überstandes und des Rückstandsextraktes verändert. Es ist als Ankerprotein des Zytoskeletts an Zellwachstum und/oder -erhaltung beteiligt. Die Position der beiden Spots im Gel ist wahrscheinlich identisch, so dass es sich höchstwahrscheinlich um denselben Spot handelt, der in beiden Fraktionen vorkommt. Die Expressionsänderung der beiden Spots ist gegensätzlich: Im Überstand ist eine deutliche Intensitätserhöhung nachzuweisen (++) , im Rückstandsextrakt hingegen eine deutliche Erniedrigung (--). Dies deutet auf eine Beeinflussung der Löslichkeit oder Veränderung des Turnovers des Proteins infolge der Erkrankung hin (Abb. 3.14).

### 3.5.4 Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1

Das Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 (HnrpA1) zeigt in einem Spot des Überstandes und in drei Spots des Rückstandsextraktes eine deutliche Erhöhung (++) in der Expression. Es ist an der RNA-Bindung beteiligt und in die Regulation von Nukleobasen-, Nukleosiden-, Nukleotiden- und Nukleinsäure-Metabolismen eingebunden. Der Spot im Überstand (MIÜ-B50) ist aufgrund seiner Lage im Gel als identisch mit einem der Spots des Rückstandsextraktes (MIRE-B111) einzustufen. In Abb. 3.15 sind die vier Spots beider Fraktionen einander gegenübergestellt. Zur Position der drei Milz-Rückstandsextrakt-Spots zueinander siehe Abb. 3.19.



**Abbildung 3.15:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Das Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 (HnrpA1) im Vergleich zwischen plasmatischer (MIÜ-B50) und membranassoziierter Fraktion (MIRE-B111, MIRE-B104, MIRE-B067). Die beiden Ausschnittspaare links zeigen den wahrscheinlich identischen Spot MIÜ-B50 und MIRE-B111, das dritte und vierte Paar zeigt die beiden weiteren HnrpA1-Spots im Rückstandsextrakt der Milz.

### 3.5.5 Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2B1

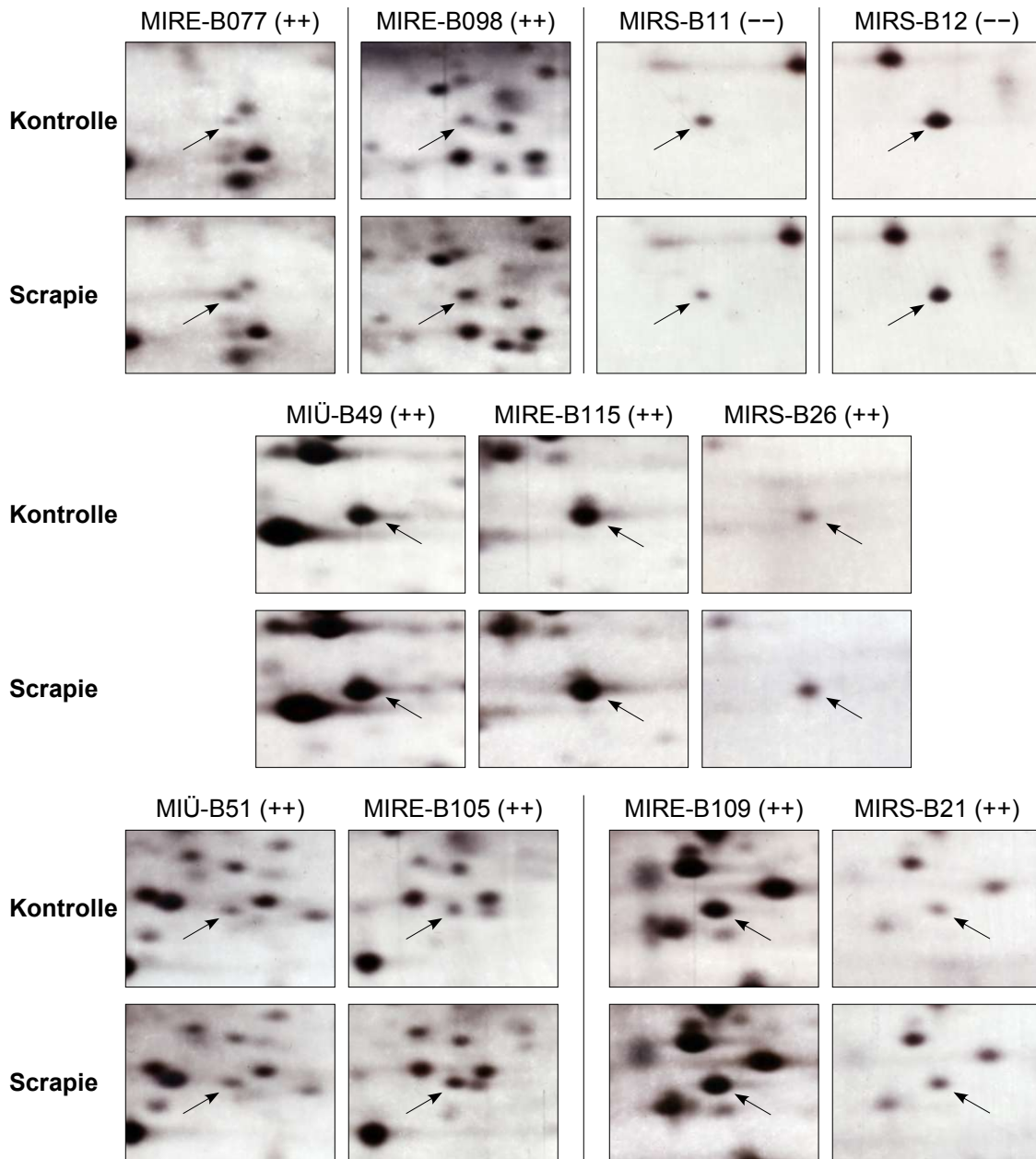
Mit einer Vielzahl veränderter Spots reagiert das Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2B1 (HnrpA2B1) auf die Infektion. Es sind insgesamt elf Spots in allen drei Fraktionen betroffen, davon zwei im Überstand (beide deutlich erhöht (++)), fünf im Rückstandsextrakt (vier deutlich (++) und einer innerhalb der drei Laufpaare leicht bis deutlich (+ bzw. ++) erhöht) und vier in der Rückstandssuspension (zwei deutlich erniedrigt (--) und zwei deutlich erhöht (++)). Es gibt drei Spots, die wahrscheinlich aufgrund ihrer Lage im Gel als fraktionsübergreifend gelten müssen. Dies sind der Spot MIÜ-B51, welcher mit dem Spot MIRE-B105 an entsprechender Stelle im Gel liegt, die Spots MIRE-B109 und MIRS-B21 sowie die sogar alle drei Fraktionen einschließenden Spots MIÜ-B49, MIRE-B115 und MIRS-B26. Abb. 3.16 zeigt die elf Pärchen dieses in die Regulation von Nucleobasen-, Nucleosiden-, Nucleotiden- und Nucleinsäure-Metabolismen eingebundenen Ribonucleoproteins in einer Übersicht.

### 3.5.6 Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A3

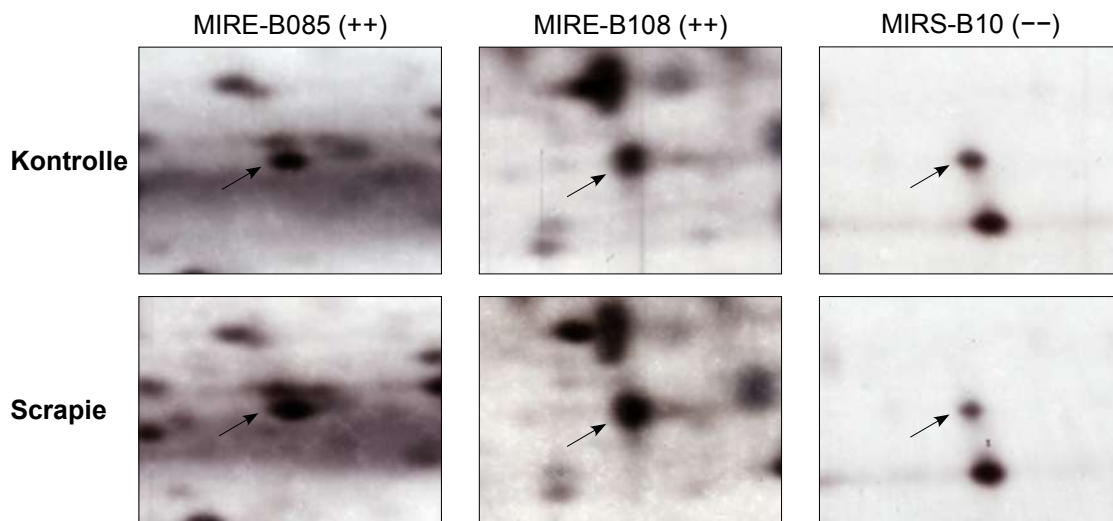
Auch das in die Regulation von Nucleobasen-, Nucleosiden-, Nucleotiden- und Nucleinsäure-Metabolismen eingebundene Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A3 (HnrpA3) ist mit insgesamt drei Spots aus Rückstandsextrakt und Rückstandssuspension an den Veränderungen beteiligt. Hier sind keine fraktionsübergreifenden Spots vorhanden. Abb. 3.17 zeigt die im Rückstandsextrakt deutlich erhöhte (++) und in der Rückstandssuspension deutlich erniedrigte (--) Veränderung der Spots im infizierten Organ.



### 3.5 In mehreren Milzfraktionen veränderte Protein-Isoformen



**Abbildung 3.16:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Die elf identifizierten Spots des Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2B1 (HnrpA2B1) in den drei Milzfraktionen. Der obere Viererblock zeigt die vier nur in ihrer jeweiligen Fraktion vorkommenden Spots. Der Dreierblock in der Mitte verdeutlicht die in allen drei Fraktionen an entsprechender Stelle liegenden Spots MIÜ-B49, MIRE-B115 und MIRS-B26. Die linke Hälfte des unteren Viererblocks zeigt die beiden sich in Überstand (MIÜ, plasmatische Fraktion) und Rückstandsextrakt (MIRE, membranassoziierte Fraktion) entsprechenden Spots, die rechte Hälfte jene aus Rückstandsextrakt und Rückstandssuspension (MIRS, Kernfraktion).



**Abbildung 3.17:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Das Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A3 (HnrpA3) mit den zwei identifizierten Spots der membranassoziierten (MIRE-B085, MIRE-B108) und einem Spot der Kernfraktion (MIRS-B10) der Milz.

## 3.6 Proteine und ihre Isoformen

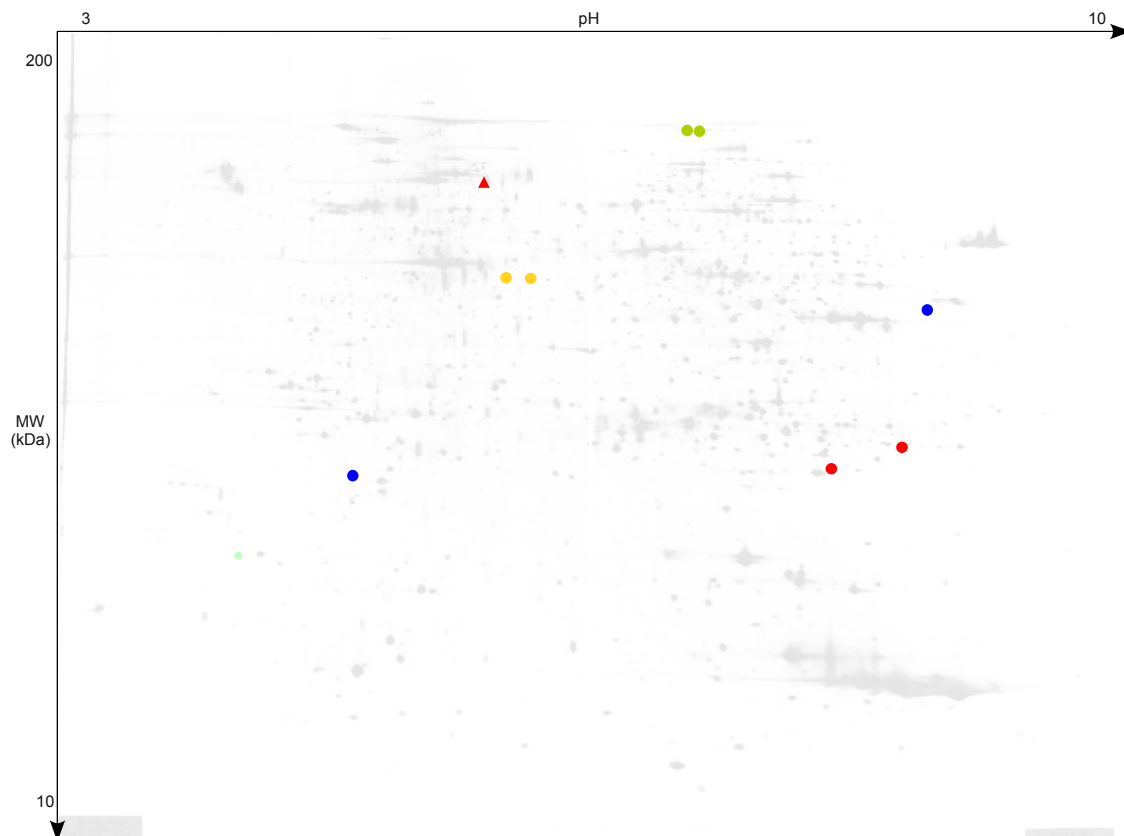
Wie zuvor erwähnt, bestehen einige Proteine aus mehr als einem Spot, jedoch verteilt auf mehrere Fraktionen oder beide untersuchten Organe. Im Folgenden werden jene Proteine vorgestellt, die ebenfalls aus mehreren Spots bestehen, dabei aber ausschließlich im Gehirn oder einer Milz-Fraktion vorkommen.

### 3.6.1 Milz

#### 3.6.1.1 Die Plasmatische Fraktion

Hier treten neben den zwei bereits zuvor erwähnten drei weitere Proteine auf, welche jeweils aus zwei sicher identifizierten Spots bestehen. Diese drei Proteine sind in dieser Untersuchung nur im Milz-Überstand nachzuweisen. In Abb. 3.18 sind die Positionen dieser fünf Proteine dargestellt. Der Vollständigkeit halber werden auch die bereits in den Abschnitten 3.4 und 3.5 vorgestellten, mit mindestens zwei Spots im Überstand vertretenen Proteine in dieser Abbildung farbig gekennzeichnet.

**Placental Thrombin Inhibitor** wird auch Protease Inhibitor 6 (PI-6) oder Serine (or Cysteine) Proteinase Inhibitor, Clade B, Member 6a genannt. Das Protein ist, wie der Name bereits andeutet, ein Protease-Inhibitor und beteiligt am Proteinmetabolismus. Die beiden veränderten Spots sind Doppelspots, d. h. sie bestehen aus zwei sehr dicht beieinanderliegenden Spots im mäßig sauren Bereich. Diese Spots (MIÜ-A24 und MIÜ-A25) weisen jeweils eine deutliche Erniedrigung (--) im Gel des erkrankten Gewebes auf. In Abb. 3.18 sind die beiden Spots mit einem gelben Punkt ● markiert.



**Abbildung 3.18:** Repräsentatives 2D-Gel der plasmatischen Fraktion der Milz scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse, modifiziert. Im Milz-Überstand befinden sich fünf Proteine, die aus mehr als einem Spot bestehen: Placental Thrombin Inhibitor (●), Peroxi-redoxin 2 (●), Elongation Factor 2 (●), Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K (HnrpK) (▲, siehe auch Abschnitt 3.4.5 und Abb. 3.21), Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2B1 (HnrpA2B1) (●, siehe auch Abschnitt 3.5.5, Abb. 3.19 und Abb. 3.20). Nähere Erläuterungen im Text.

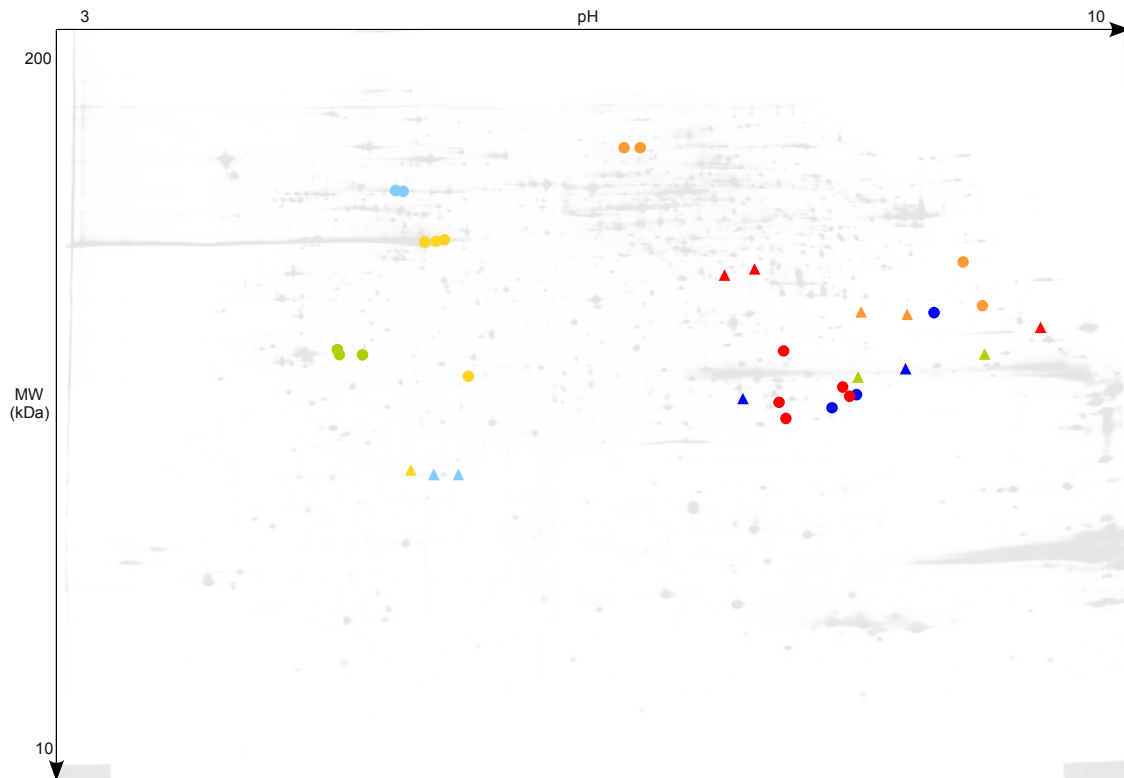
**Peroxi-redoxin 2** wird auch als Thioredoxin Peroxidase 1, Thioredoxin-dependent Peroxide Reductase 1, Thiol-specific Antioxidant Protein oder TSA bezeichnet. Das Protein ist als Peroxidase in Metabolismus und Energiezyklen integriert. Die beiden identifizierten Spots liegen im Gel weit auseinander. Der relativ saure Spot MIÜ-A56 ist leicht erhöht (+). Recht weit auf der basischen Seite liegt MIÜ-B31 und ist deutlich erhöht (++). In Abb. 3.18 sind die beiden Spots blau ● markiert.

**Elongation Factor 2 (EF-2)** (auch Eukaryotic Translation Elongation Factor 2) ist ein Protein, das sich im Proteinmetabolismus an der Translationsregulation beteiligt. Die beiden Spots MIÜ-B01 und MIÜ-B02 liegen etwa im neutralen Bereich des Gels und sind deutlich erhöht (++). In Abb. 3.18 sind die beiden Spots grün ● markiert.

### 3.6.1.2 Die Membranassoziierte Fraktion

Hier treten neben den bereits zuvor erwähnten acht weitere Proteine auf, welche aus jeweils mindestens zwei sicher identifizierten Spots bestehen. Abb. 3.19 zeigt die Positionen der zwölf Proteine. Der Vollständigkeit halber werden auch die bereits in Abschnitt 3.5 vorgestellten, mit mindestens zwei Spots im Rückstandsextrakt vorkommenden Proteine in dieser Abbildung farbig gekennzeichnet.

**Aktin** ist ein strukturelles Zytoskelettprotein und wesentlicher Bestandteil des Zellwachstums und/oder der Zellerhaltung. Vier Spots sind vermutlich als die Beta-Isoform identifiziert: MIRE-A020 und MIRE-A021 sind sehr deutlich erniedrigt (---) und liegen direkt neben dem immerhin noch deutlich erniedrigten (--) Spot MIRE-A022 im leicht sauren Bereich. Der Dreifachspot MIRE-A040 weist eine deutliche Erniedrigung (--) auf und liegt etwas niedermolekularer als die drei vorigen Spots im vergleichbaren pH-Bereich. Die Spots werden in Abb. 3.19 mit einem gelben Kreis ● markiert. Ihre Ausprägung zu einem früheren Zeitpunkt der Infektion zeigt Abb. 3.34.



**Abbildung 3.19:** Repräsentatives 2D-Gel der membranassoziierten Fraktion der Milz scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse, modifiziert. Im Milz-Rückstandsextrakt befinden sich zwölf Proteine, die aus mehr als einem Spot bestehen: (Beta-)Aktin (●), Gamma-Aktin (MIRE-A050; ▲), Vimentin (●), Caldesmon 1 (●), hnRNP D0 (▲), Chromobox Protein Homolog 3 (▲), ELAV-like Protein 1 (▲), Fibrillarin (▲), Chain L, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of The Mouse Anti-Human Fas Antibody Hfe7a (●), HnrpA1 (●, siehe Abschnitt 3.5.4), HnrpA2B1 (●, siehe Abschnitt 3.5.5, Abb. 3.18 und Abb. 3.20), HnrpA3 (▲, siehe Abschnitt 3.5.6). Nähere Erläuterungen im Text.

Ein weiterer Spot (MIRE-A050) (– –), welcher noch niedermolekularer und etwas saurer ist als die erwähnten Spots, ist als Gamma-Aktin identifiziert und mit einem gelben Dreieck ▲ markiert.

**Vimentin** ist ein strukturelles Zytoskelettprotein und an Zellwachstum und/oder -erhaltung beteiligt. Die beiden identifizierten Spots MIRE-A010 und MIRE-A011 liegen im leicht sauren Bereich des Gels und sind beide deutlich erniedrigt (– –). Vimentin ist in Abb. 3.19 mit einem blauen Kreis ● angedeutet.

**Caldesmon 1** ist ein Bindeprotein des Zytoskeletts mit Aufgaben im Bereich Zellwachstum und/oder -erhaltung. Die sehr hochmolekularen, im neutralen Bereich des Gels liegenden Spots MIRE-B010 und MIRE-B011 sind deutlich erniedrigt (– –). Leicht erhöht (+) hingegen sind die sehr basischen Spots MIRE-B053 und MIRE-B068 mit sehr geringem Molekulargewicht. Diese Konstellation von Spots desselben Proteins in erniedrigter, hochmolekularer sowie erhöhter, niedrigmolekularer Form deutet auf Fragmentation oder Aufschluss fester Multimere hin. In Abb. 3.19 zeigen Kreise in orange ● diese vier Spots.

**Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein D** wird auch Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein D0, hnRNP D0 oder AU-rich Element RNA-binding Protein 1 genannt. Die Regulation von Nukleobasen-, Nukleosiden-, Nukleotiden- und Nukleinsäure-Metabolismen gehört zur Aufgabe dieses Ribonucleoproteins. Es tritt in drei deutlich erhöhten (++) Spots auf, welche in Abb. 3.19 mit roten Dreiecken ▲ gekennzeichnet sind. Während MIRE-B054 nahe bei MIRE-B055 im schwach basischen Bereich liegt, ist der etwas niedrigermolekulare Spot MIRE-B073 wesentlich basischer.

**Chromobox Protein Homolog 3** wird auch als Heterochromatin Protein 1 Homolog Gamma, HP1 Gamma, Modifier 2 Protein oder M32 bezeichnet. Zur Aufgabe dieses Proteins gehören die Regulation von Nukleobasen-, Nukleosiden-, Nukleotiden- und Nukleinsäure-Metabolismen; es ist involviert in die DNA-Bindung. Die Spots MIRE-A051 und MIRE-A052 liegen im schwach sauren Bereich und weisen eine deutliche Erniedrigung auf (– –). Abb. 3.19 zeigt die beiden Spots als hellblaue Dreiecke ▲.

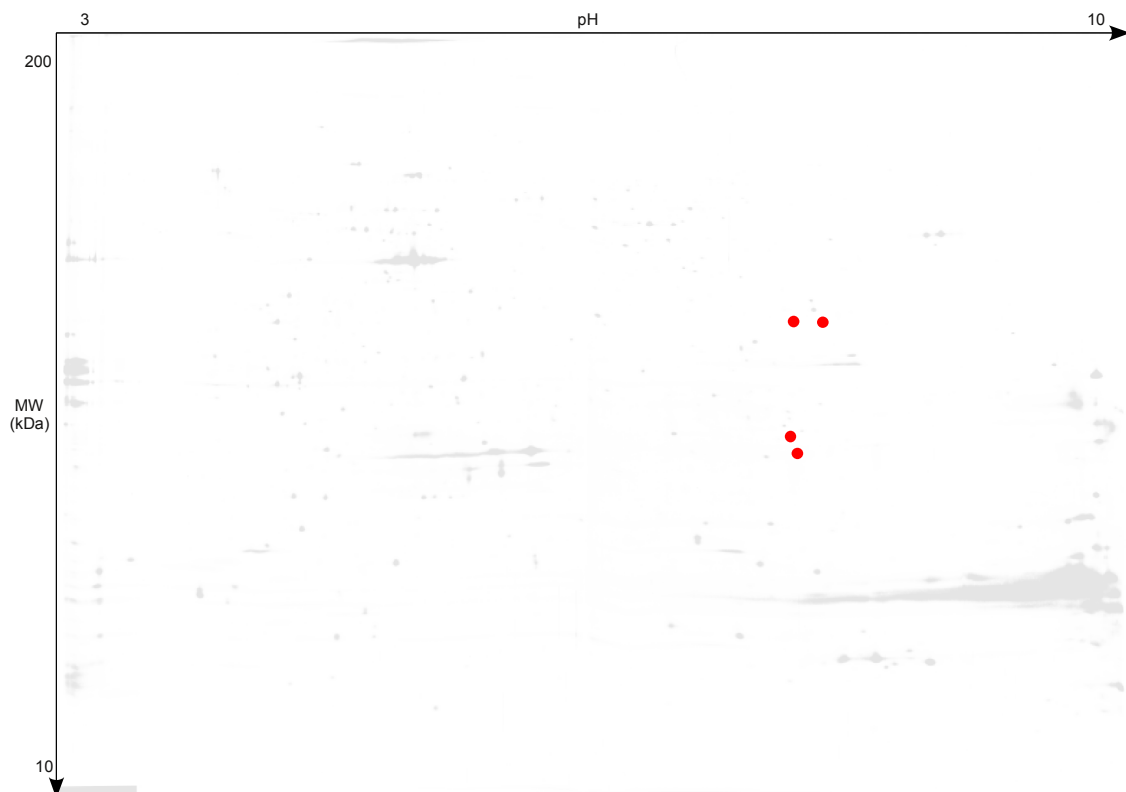
**ELAV-like Protein 1** hat auch die Synonyme Hu-antigen R, HuR, Elav-like Generic Protein und MelG. Das Protein hat die Fähigkeit zur RNA-Bindung und ist an der Regulation von Nukleobasen-, Nukleosiden-, Nukleotiden- und Nukleinsäure-Metabolismen beteiligt. Die Spots MIRE-B065 und MIRE-B066 liegen nicht weit voneinander entfernt im basischen Bereich, sind deutlich erhöht (++) und erscheinen in Abb. 3.19 als orange Dreiecke ▲.

**Fibrillarin** wird auch als Nucleolar Protein 1 bezeichnet. Das Ribonucleoprotein ist an der Regulation von Nukleobasen-, Nukleosiden-, Nukleotiden- und Nukleinsäure-Metabolismen beteiligt. Die beiden Spots MIRE-B082 und MIRE-B090 sind deutlich erhöht (++) und liegen ein gutes Stück auseinander, jedoch beide im basischen Bereich des Gels. Dreiecke in grün ▲ markieren ihre Position in Abb. 3.19.

**Chain L, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of The Mouse Anti-Human Fas Antibody Hfe7a** ist ebenfalls mit mehr als einem Spot vertreten. Eine Klassifizierung dieses Proteins ist nicht möglich, seine Intensitätsänderung uneinheitlich. Während die Spots MIRE-A034 und MIRE-A036 deutlich erniedrigt sind (– –), ist der Spot MIRE-A035 deutlich erhöht (++). Alle drei liegen nah beieinander im relativ sauren Bereich und erhalten in Abb. 3.19 einen grünen Kreis ● als Kennzeichnung.

### 3.6.1.3 Die Kernfraktion

Hier treten keine zusätzlichen Proteine mit mehreren Spots pro Protein auf. Das in Abschnitt 3.5.5 als fraktionsübergreifend vorgestellte Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2B1 (HnrpA2B1) ist mit vier Spots in der Milz-Rückstandssuspension vertreten und die Spotpositionen im Gel in Abb. 3.20 gezeigt.

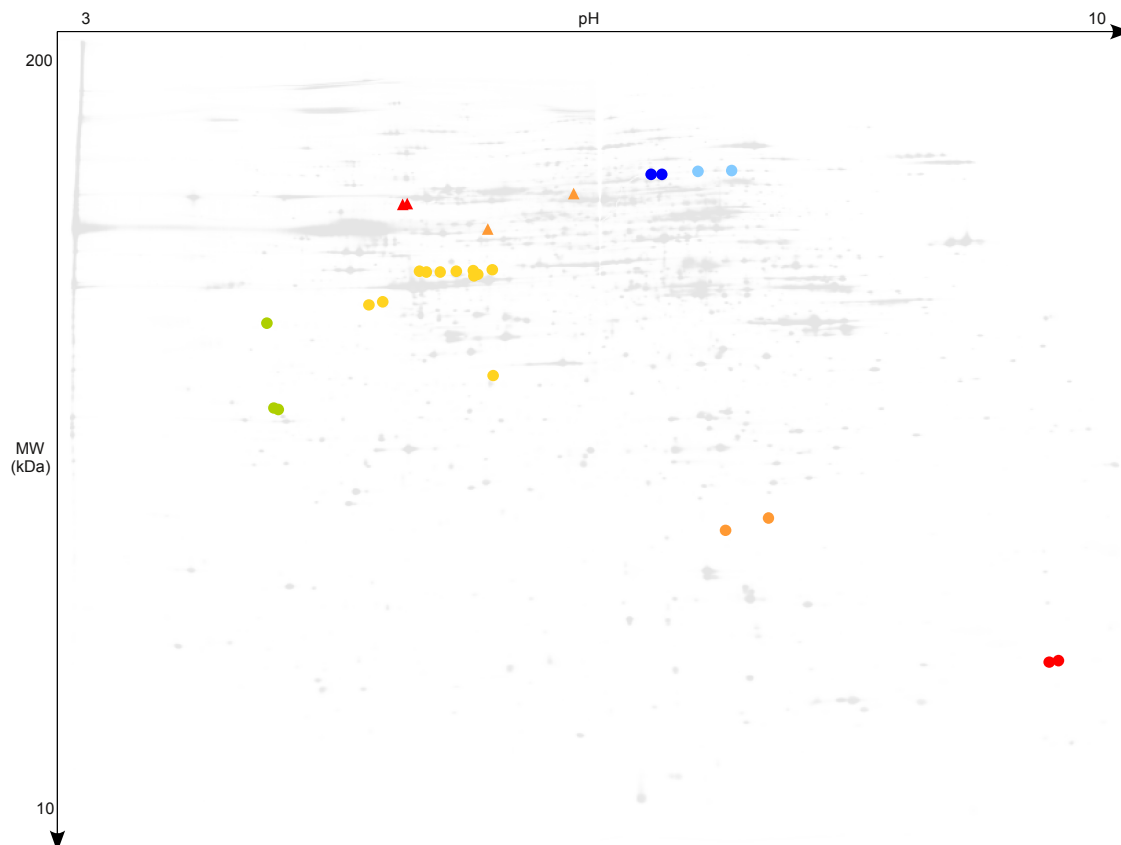


**Abbildung 3.20:** Repräsentatives 2D-Gel der Kernfraktion der Milz scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse, modifiziert. Das einzige Protein mit mehreren Spots in der Milz-Rückstandssuspension ist das HnrpA2B1. Es wird in Abschnitt 3.5.5 besprochen. Die vier Spots sind rot ● markiert. Siehe auch Abb. 3.18 sowie Abb. 3.19.

### 3.6.2 Gehirn

Hier treten neben den bereits zuvor erwähnten Proteinen sechs weitere Proteine auf, welche aus mindestens zwei sicher identifizierten Spots bestehen. Abb. 3.21 zeigt die Positionen aller acht Proteine. In Abschnitt 3.4 werden im Zusammenhang mit organübergreifend identifizierten Proteinen bereits Moesin (siehe Abschnitt 3.4.1) und das Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K (HnrpK) (siehe Abschnitt 3.4.5) vorgestellt. Ihre Spotpositionen werden ebenfalls in der nachfolgenden Abbildung berücksichtigt.

**Dihydropyrimidinase-like 2** ist als Bindeprotein des Zytoskeletts beteiligt an der Signaltransduktion und Zellkommunikation. Die Spots sind gegensätzlich verändert. Während Spot GGE-A021 eine deutliche Erniedrigung (–) aufweist, zeigt sich der Spot GGE-A030 im erkrankten Gewebe deutlich erhöht (+). Die beiden Spots liegen nicht sehr nahe beieinander, unterscheiden sich aber mehr in der Position bezüglich des pH als im Molekulargewicht, wie die symbolischen Dreiecke in orange ▲ in Abb. 3.21 zeigen.



**Abbildung 3.21:** Repräsentatives 2D-Gel der Gehirnproteine scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse, modifiziert. Im Gehirn befinden sich acht Proteine, die aus mehr als einem Spot bestehen: Dihydropyrimidinase-like 2 (▲), Synapsin-2 (●), Glial fibrillary acidic protein (●), Tropomyosin (●), α-B-Crystallin (●), Cystatin C precursor (●), Moesin (●, siehe auch Abschnitt 3.4.1), Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K (HnrpK) (▲, siehe auch Abschnitt 3.4.5) (vgl. auch Abb. 3.18).

**Glial Fibrillary Acidic Protein** oder kurz GFAP ist ein Strukturprotein, das eine Rolle in Zellwachstum und/oder -erhaltung spielt. Es ist mit außerordentlich vielen Spots vertreten, die vermutlich noch nicht alle Isoformen widerspiegeln. Alle Spots sind gegenüber der Kontrolle erhöht: GGE-A048, GGE-A049, GGE-A051, GGE-A052, GGE-A066, GGE-A067 und GGE-A111 sind sehr deutlich erhöht (+++), GGE-A047, GGE-A050 und GGE-A054 sind deutlich erhöht (++) und GGE-A055 weist immerhin noch eine leichte Veränderung auf (+). Einen Eindruck von Fülle und Position der Spots bieten die Markierungen in gelb ● in Abb. 3.21.

**Tropomyosin** ist als Bindeprotein des Zytoskeletts an Zellwachstum und/oder -erhaltung beteiligt. Eine genaue Klassifizierung der Isoform mittels Massenspektrometrie gelang nicht, doch alle drei Spots sind einheitlich leicht erhöht (+). Der Spot GGE-A078 liegt beinahe auf einer pH-Linie, jedoch ein gutes Stück weiter im höheren Molekulargewichtsbereich als die beiden beinahe aufeinanderliegenden Spots GGE-A131 und GGE-A133. Die Spots sind grün ● in Abb. 3.21.

**$\alpha$ -B-Crystallin** oder Alpha Crystallin B Chain bzw. P23 ist ein kleines Hitzeschockprotein, das eine Rolle im Proteinmetabolismus spielt. Es sind zwei Spots im neutralen bis leicht basischen Bereich vorhanden. Der stärkere der beiden Spots, GGE-B092, ist leicht erhöht (+), der kleinere und schwächere Spot GGE-B094 weist sogar eine deutliche Erhöhung (++) auf. Ihre Lage zueinander zeigt mit Markierungen in orange ● in Abb. 3.21.

**Cystatin C Precursor** nennt man auch Cystatin 3, welches als Proteinaseinhibitor am Proteinmetabolismus beteiligt ist. Die beiden Spots sind sehr schwach und haben ein recht kleines Molekulargewicht. Darüberhinaus befinden sie sich beinahe ganz am basischen Ende des Gels, sind also extrem basisch. Beide Spots (GGE-B109 und GGE-B110) sind deutlich erhöht und in Abb. 3.21 (++) rot ● gekennzeichnet.

**Synapsin-2** oder Synapsin II ist an der Signaltransduktion und Zellkommunikation beteiligt. Die zwei Spots sind deutlich (GGE-B013) (--) bzw. leicht (GGE-B015) (-) erniedrigt und befinden sich im neutralen bis leicht basischen Bereich des Gels nahe beieinander. Abb. 3.21 zeigt die Spots hellblau ● hervorgehoben.



### 3.7 Stadienübergreifend veränderte Spots

Neben den bereits besprochenen fraktions- oder organübergreifenden sowie aus mehreren Spots bestehenden Proteinen sind auch jene interessant, welche über mehrere Stadien hinweg eine konsistente Veränderung aufweisen. Dieser Abschnitt stellt einige davon vor.

#### 3.7.1 Milz

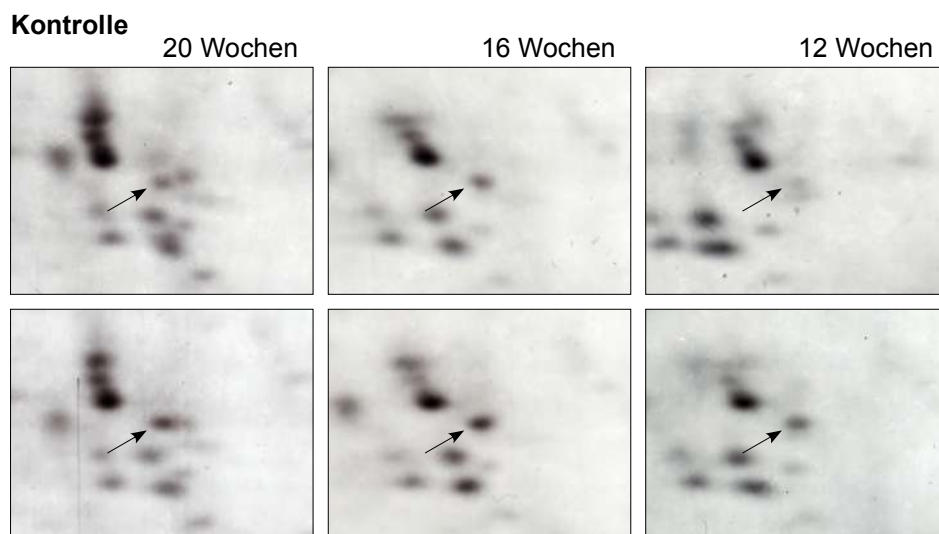
##### 3.7.1.1 Die Plasmatische Fraktion

Zunächst wird ein in allen drei untersuchten Stadien durchgängig veränderter Spot vorgestellt, dessen Identifizierung bislang jedoch nicht gelingen konnte.

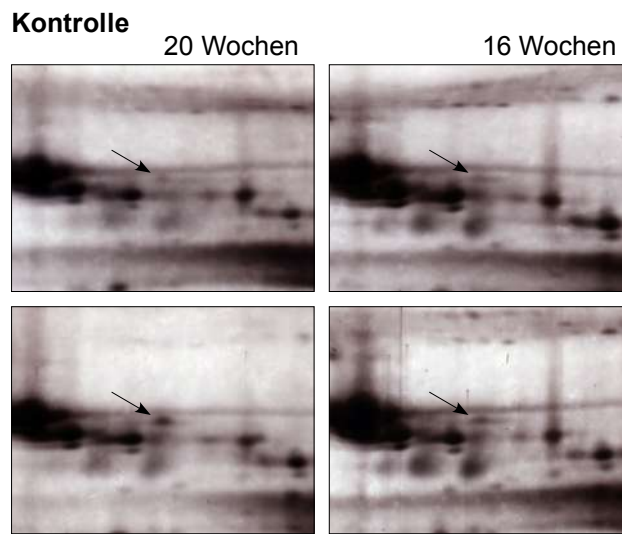
**Spot MIÜ-B35** zu identifizieren gelang bisher nicht, doch die durchgängig einheitliche Erhöhung der Spotintensität bis in das 12-Wochen-Stadium rechtfertigt eine Betrachtung des Spots. Abb. 3.22 stellt ausgewählte Probenpaare aller drei Stadien dar.

Weitere Spots sind lediglich in den Stadien 20 W und 16 W einheitlich verändert und werden nachfolgend vorgestellt.

**Spot MIÜ-A01** ist ebenfalls unidentifiziert. Er ist bereits 16 Wochen nach Infektion gegenüber der Kontrolle leicht erhöht und in Abb. 3.23 gezeigt.



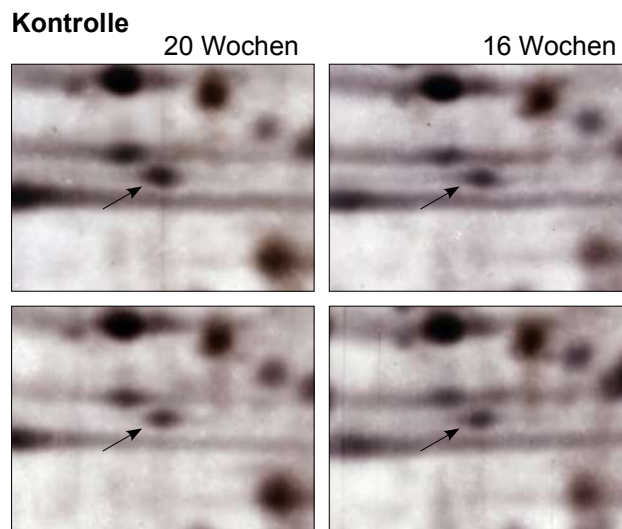
**Scrapie**  
**Abbildung 3.22:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Der unidentifizierte Spot MIÜ-B35 des Milz-Überstandes weist in allen drei Stadien eine deutliche Intensitätserhöhung gegenüber der Kontrolle auf.



**Scrapie**

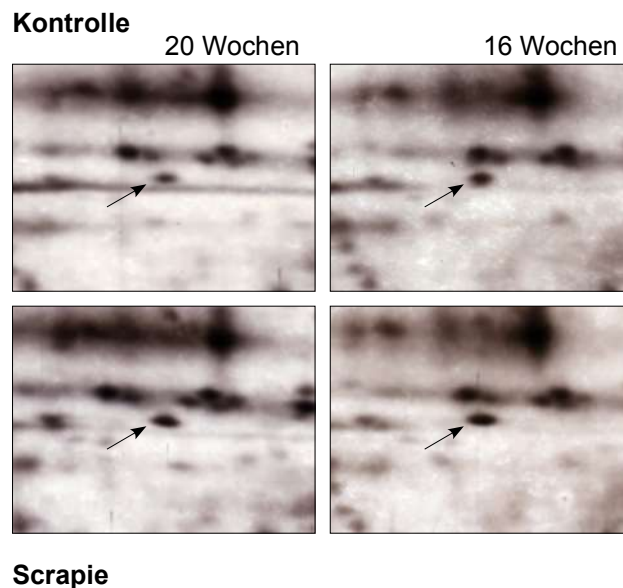
**Abbildung 3.23:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Der Spot MIÜ-A01 im Milz-Überstand ist sowohl 20 Wochen als auch bereits 16 Wochen nach Infektion stärker ausgeprägt als in der Kontrolle.

**14-3-3 Protein Eta** (Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein, Eta Polypeptide) ist bereits 16 Wochen nach der Infektion leicht erniedrigt. Es ist ein Adaptermolekül und an der Signaltransduktion und Zellkommunikation beteiligt. Der Spot MIÜ-A46 ist in Abb. 3.24 gezeigt.



**Scrapie**

**Abbildung 3.24:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Der Spot MIÜ-A46, identifiziert als 14-3-3 Protein Eta, ist in den beiden späten Stadien des Milz-Überstandes gegenüber der Kontrolle erniedrigt.



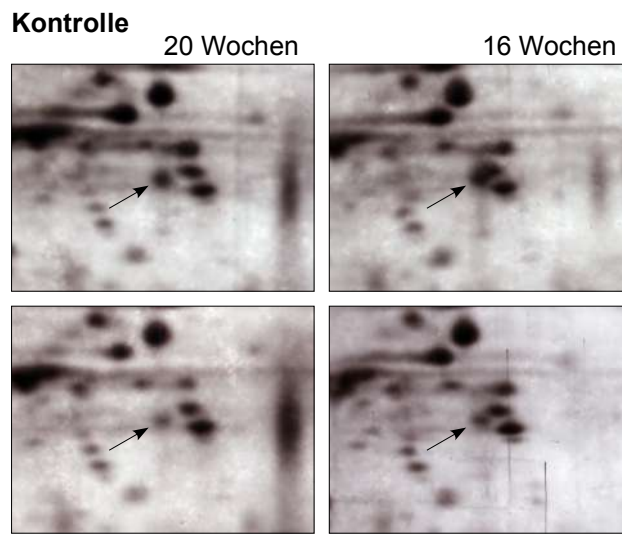
**Abbildung 3.25:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Gelsolin ist im Milz-Überstand in den beiden späten Stadien gegenüber der Kontrolle deutlich erhöht.

**Gelsolin** ist in Abb. 3.25 mit dem Spot MIÜ-B09 dargestellt. Das Protein wird bereits in Abschnitt 3.5.2 vorgestellt. Im Vergleich der beiden Stadien 20 W und 16 W ist die Spotintensität in der Kontrolle deutlich erhöht, jedoch erscheint der Intensitätsunterschied zwischen infiziertem Organ und der Kontrolle im 20-Wochen-Stadium noch deutlicher.

**Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K** besteht im Milz-Überstand aus mindestens zwei Spots. Davon ist jedoch nur der in Abb. 3.26 dargestellte Spot MIÜ-A07 auch im 16 W-Stadium verändert. Der Abschnitt 3.4.5 enthält auch das identifizierte Fragment (Spot MIÜ-A73), welches nur 20 Wochen nach Infektion eine Veränderung (Erhöhung) aufweist, sowie die Spots des Milz-Rückstandsextraktes und des Gehirns.

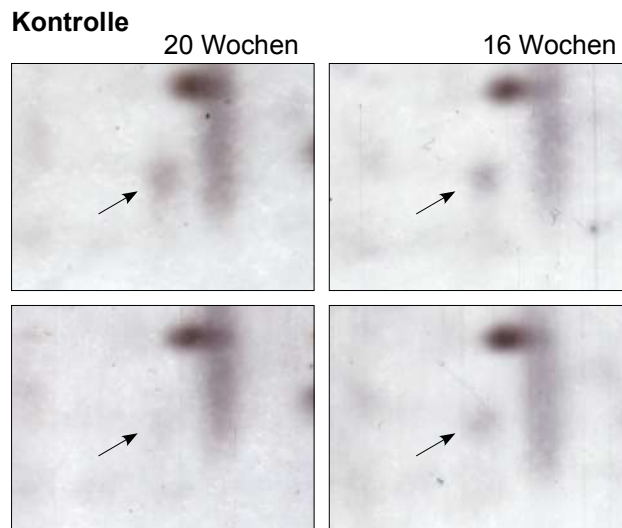
**Glia Maturation Factor Gamma** (GMF-Gamma) ist in Abb. 3.27 mit seinem Spot MIÜ-A76 dargestellt. Das Protein agiert als Wachstumsfaktor und beteiligt sich an der Signaltransduktion und Zellkommunikation. Es gehört zudem zu den aktinbindenden Proteinen. Bereits 16 Wochen nach der Infektion ist eine leichte Erniedrigung der Spotintensität festzustellen.

**Peroxiredoxin 2** (Spot MIÜ-A56, auch Thioredoxin Peroxidase 1, Thioredoxin-dependent Peroxide Reductase 1, Thiol-specific Antioxidant Protein oder TSA) zeigt Abb. 3.28. Es ist eine Erniedrigung in den Stadien 20 W und 16 W zu sehen. Das Protein hat als Peroxidase eine enzymatische Funktion in Metabolismus und Energiezyklen. Der zweite Peroxiredoxin-2-Spot (MIÜ-B31) ist erst nach 20 Wochen verändert (siehe Tab. B.1). Abb. 3.18 zeigt ihre Positionen.



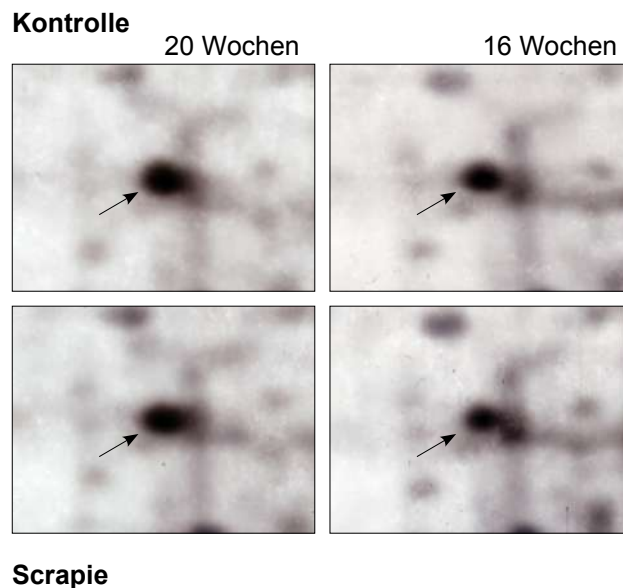
**Scrapie**

**Abbildung 3.26:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Das Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K ist in diesem gezeigten Spot MIÜ-A07 des Milz-Überstandes bereits nach 16 Wochen deutlich erniedrigt.



**Scrapie**

**Abbildung 3.27:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Der Glia Maturation Factor Gamma (GMF-Gamma) ist im Milz-Überstand 16 und 20 Wochen nach der Infektion zunehmend stärker erniedrigt.



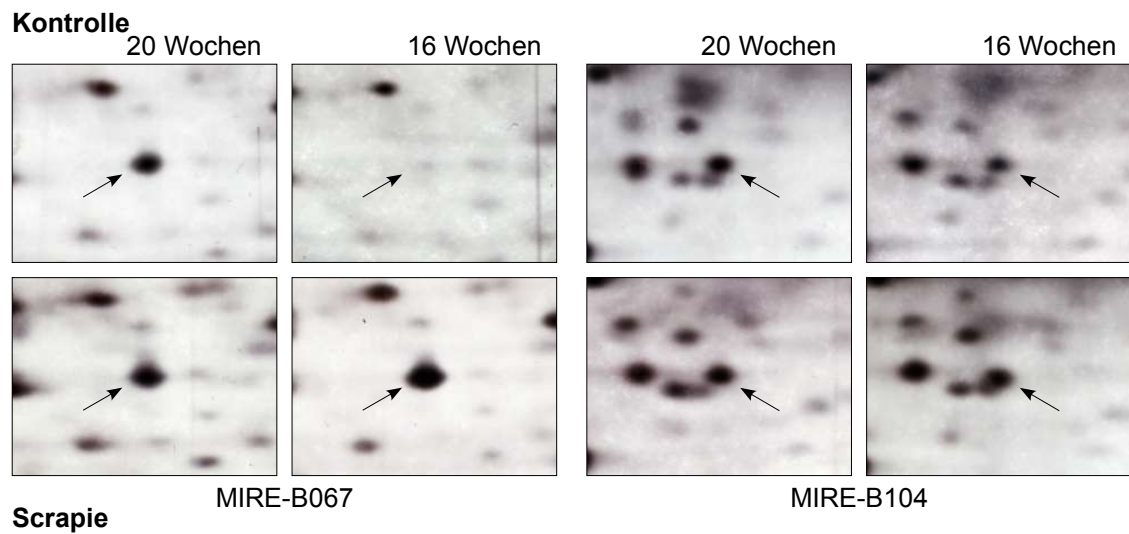
**Abbildung 3.28:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Peroxiredoxin 2 ist in einem der zwei gefundenen Spots im Milz-Überstand bereits 16 Wochen nach der Infektion deutlich erniedrigt.

### 3.7.1.2 Die membranassoziierte Fraktion

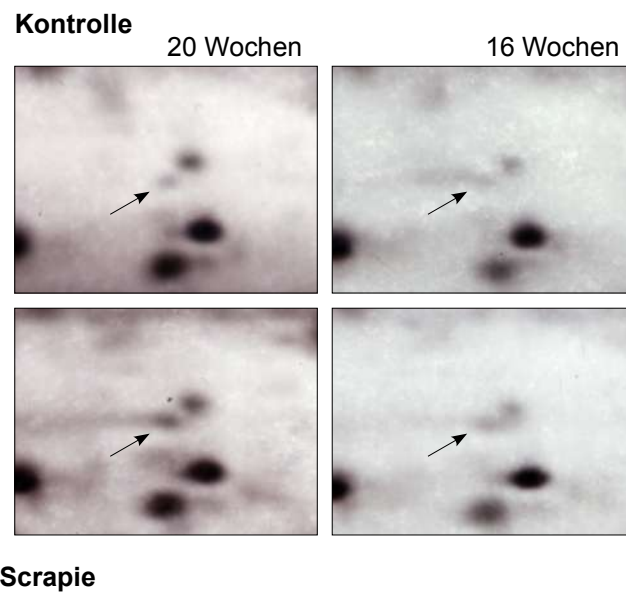
Von dieser Fraktion können nur Erkenntnisse aus den beiden späten Stadien gewonnen werden. Es werden folglich Proteine vorgestellt, welche neben der Veränderung im Stadium 20 W eine gleichgerichtete Veränderung im 16 W-Stadium aufweisen.

**Das Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 (HnrpA1)** wird in Abschnitt 3.5.4 bereits vorgestellt und die Positionen der Rückstandsextrakt-Spots zueinander in Abb. 3.19 verdeutlicht. In beiden späten Stadien gleichgerichtet verändert sind jedoch nur die Spots MIRE-B067 und MIRE-B104, welche Abb. 3.29 darstellt. Während der Spot MIRE-B067 im 20 W-Stadium nur deutlich erhöht ist, ist der Unterschied zur Kontrolle im 16 W-Stadium sogar sehr deutlich (der Kontrollspot ist beinahe nicht vorhanden und somit wesentlich schwächer als sein Gegenstück 20 Wochen nach der Infektion). Auch bei MIRE-B104 ist eine leichte Intensitätserhöhung des Kontrollspots mit zunehmendem Alter der Mäuse zu beobachten, doch die deutliche Erhöhung im 20 W-Stadium wird von einer leichten bis deutlichen Intensitätserhöhung im vorhergehenden Stadium 16 W nicht übertroffen (ein Beispiel für eine deutliche Erhöhung ist das Paar rechts in Abb. 3.29).

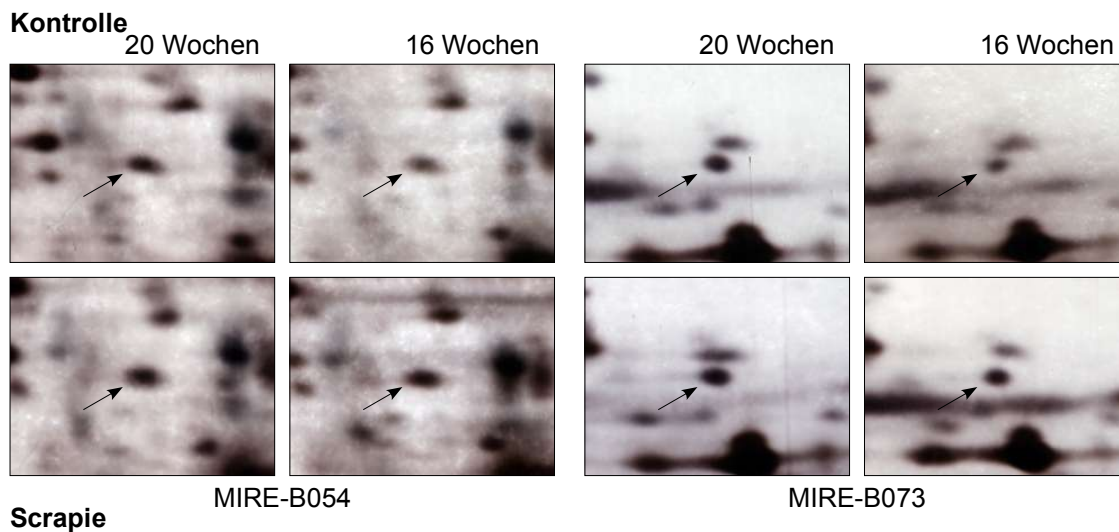
**Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2B1 (HnrpA2B1)** wird in Abschnitt 3.5.5 bereits vorgestellt und die Positionen der Rückstandsextrakt-Spots zueinander in Abb. 3.19 verdeutlicht. Nur Spot MIRE-B077, dargestellt in Abb. 3.30, weist bereits eine leichte Erhöhung nach 16 Wochen Infektionsdauer auf. Deutlich ist die Intensitätserhöhung des Spots nach 20 Wochen Infektion. Der Kontrollspot wird mit zunehmendem Alter der Mäuse intensiver.



**Abbildung 3.29:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Die Intensitätsänderung der Spots des Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 ist im Milz-Rückstands-extrakt durchgehend eine Erhöhung (vgl. Abschnitt 3.5.4).



**Abbildung 3.30:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Das Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2B1 (HnrpA2B1) weist nur einen veränderten Spot im Rückstandsextrakt in einem früheren Stadium auf. Insgesamt kann es in der Milz in allen drei Fraktionen in elf Spots nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.5.5)

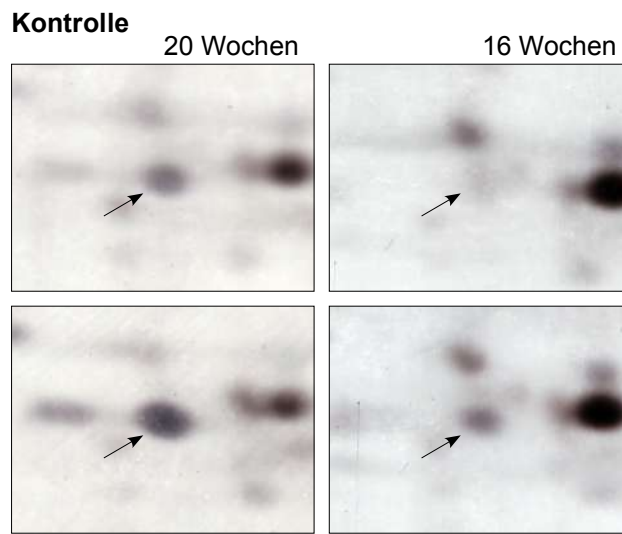


**Abbildung 3.31:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Zwei der drei Spots des Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein D zeigen im Milz-Rückstandsextrakt schon 16 Wochen nach der Infektion einheitlich eine Erhöhung.

**Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein D** wird auch AU-rich element RNA-binding protein 1, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 oder kurz hnRNP D0 genannt. Das Ribonucleoprotein ist mit seinen in beiden Rückstandsextrakt-Stadien deutlich erhöhten Spots MIRE-B054 und MIRE-B073 in Abb. 3.31 dargestellt. Ebenfalls gegenüber der Kontrolle deutlich stärker ausgeprägt ist im 20 W-Stadium ein dritter Spot, MIRE-B055. Das Protein wird auf Seite 55 vorgestellt. Abb. 3.19 zeigt die Position aller drei Spots zueinander.

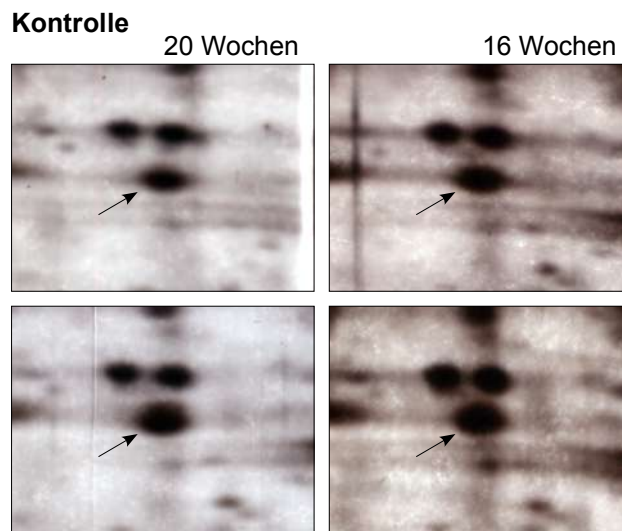
**Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K (HnrpK)** wird bereits in Abschnitt 3.4.5 vorgestellt. Der in Abb. 3.32 dargestellte Spot MIRE-A055 ist nur ein Fragment des Proteins, welches sich schon 16 Wochen nach der Infektion deutlich erhöht darstellt. Auch im Milz-Überstand findet man das HnrpK. Dort ist der die unfragmentierte Form repräsentierende Spot bis ins 16 W-Stadium verändert (siehe Abb. 3.26).

**Dihydrolipoamide S-Succinyltransferase** (genauer: Dihydrolipoamide S-Succinyltransferase (E2 Component of 2-oxo-Glutarate Complex)) ist als Acyltransferase enzymatisch aktiv und an Metabolismus und Energiezyklen beteiligt. Der Spot MIRE-A012 ist in Abb. 3.33 dargestellt. Er zeigt bereits 16 Wochen nach der Infektion eine überwiegend deutliche Erhöhung gegenüber der Kontrolle.



**Scrapie**

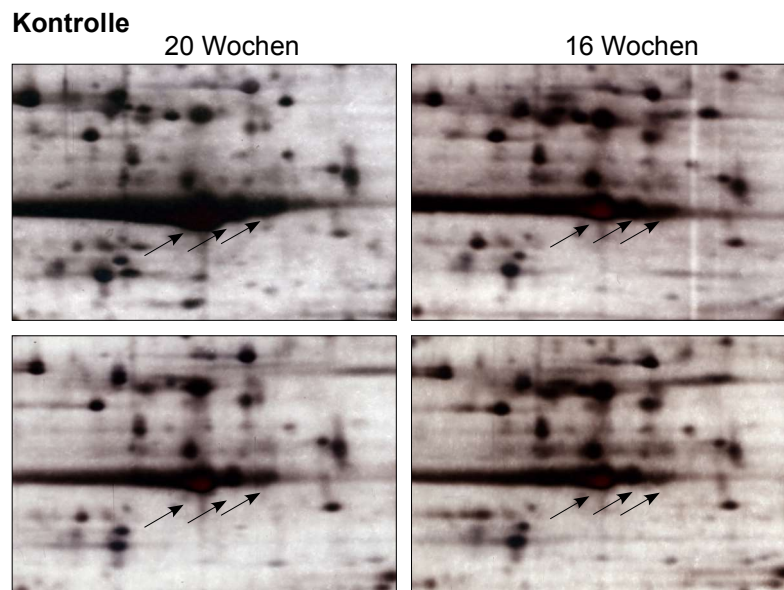
**Abbildung 3.32:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Dieser Spot des Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K (HnrpK) im Milz-Rückstandsextrakt ist nur ein Fragment des Proteins. Es ist bereits 16 Wochen nach der Infektion erhöht. Zudem ist seine Expression bei den älteren Mäusen deutlich angestiegen.



**Scrapie**

**Abbildung 3.33:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Dihydrolipoamide S-Succinyltransferase (E2 Component of 2-oxo-Glutarate Complex) ist im Milz-Rückstandsextrakt schon 16 Wochen nach Infektion zum Teil deutlich stärker ausgeprägt.



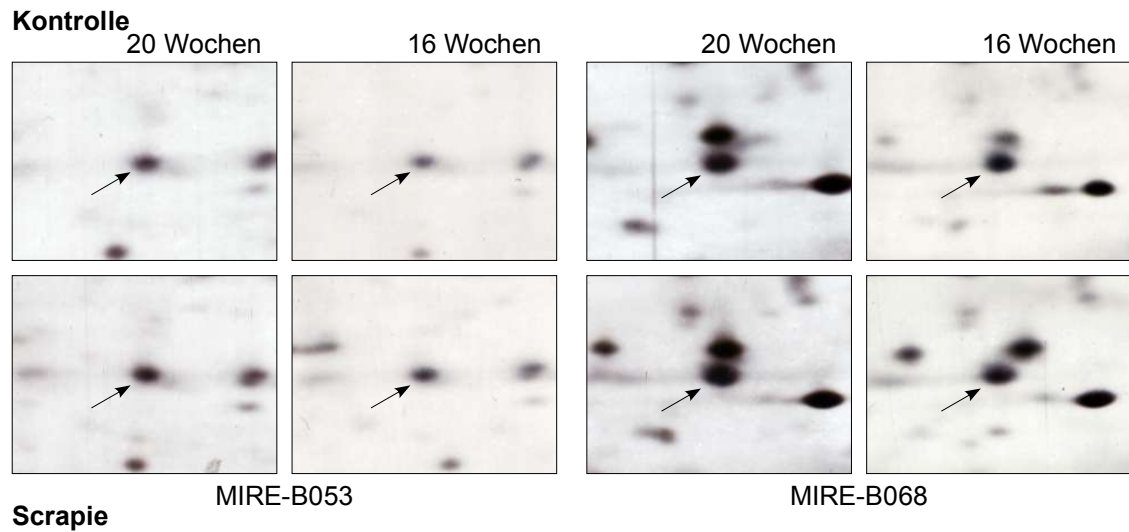


**Scrapie**  
**Abbildung 3.34:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Diese Dreierspotkette des Aktins (wahrscheinlich Beta-Aktin) im Milz-Rückstandsextrakt ist schon 16 Wochen nach der Infektion leicht bis deutlich erniedrigt.

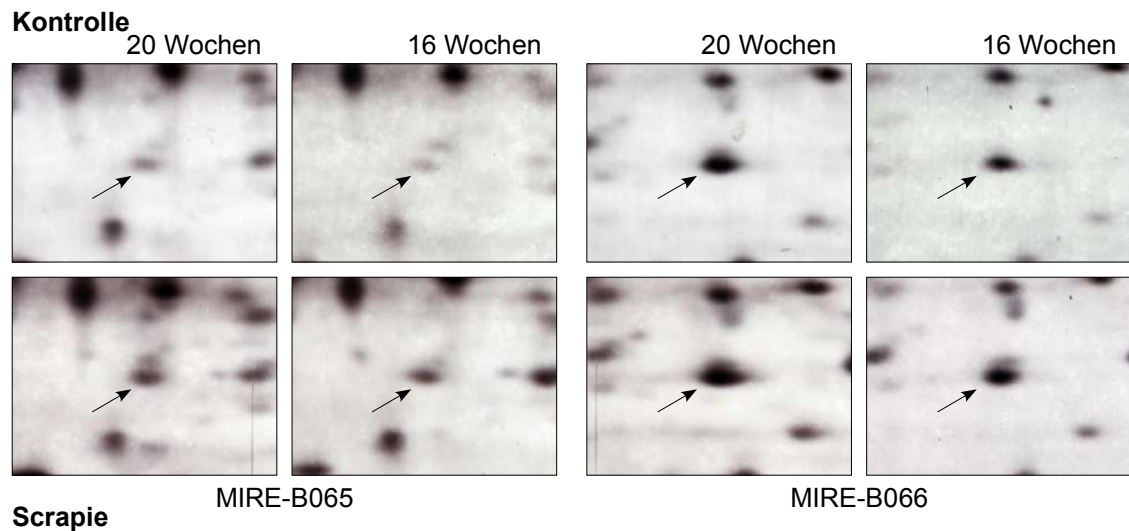
**Aktin** (wahrscheinlich Beta-Aktin) ist als ubiquitäres Strukturprotein des Zytoskeletts an Zellwachstum und/oder -erhalt beteiligt. Es wird auf auf Seite 54 und in Abb. 3.19 mit seinen Isospots vorgestellt. Abb. 3.34 zeigt die bereits im früheren 16-Wochen-Stadium zum Teil deutlich erniedrigten Spots MIRE-A020, MIRE-A021 und MIRE-A022.

**Caldesmon 1** besteht aus den in beiden Stadien leicht bis deutlich erhöhten Spots MIRE-B053 und MIRE-B068, dargestellt in Abb. 3.35. Das Protein ist ein Bindeprotein des Zytoskelettes und an Zellwachstum und/oder -erhalt beteiligt. Außerdem kann Caldesmon 1 noch aus den Spots MIRE-B010 und MIRE-B011 identifiziert werden, welche deutlich erniedrigt und nur im 20 W-Stadium verändert vorliegen. Siehe dazu auch Tab. B.2 im Anhang und Abb. 3.19 zur Verteilung der Spots zueinander auf dem Gel.

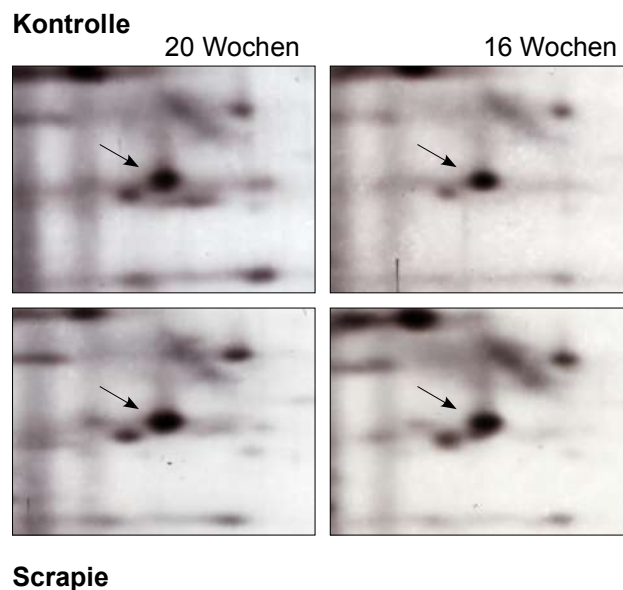
**ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R)** (auch Elav-like generic protein oder MelG) besteht aus den Spots MIRE-B065 und MIRE-B066, dargestellt in Abb. 3.36 (siehe auch Abb. 3.19). Bei beiden Spots liegt eine deutliche Erhöhung der Intensität gegenüber der Kontrolle vor. Zudem wird der Kontrollspot mit zunehmendem Alter der Mäuse größer, was besonders deutlich wird bei Spot MIRE-B066 (rechte Hälfte der Abb. 3.36). Das Protein bindet RNA und ist beteiligt an der Regulation von Nucleobasen-, Nucleosiden-, Nucleotiden- und Nucleinsäure-Metabolismen.



**Abbildung 3.35:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Caldesmon 1 ist im Milz-Rückstandsextrakt aus insgesamt vier Spots identifiziert worden. Neben dem am weitesten fortgeschrittenen Stadium sind aber nur die beiden dargestellten Spots auch im 16-Wochen-Stadium gegenüber der Kontrolle stärker ausgeprägt.



**Abbildung 3.36:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. ELAV-like 1 besteht aus zwei nachgewiesenen Spots im Milz-Rückstandsextrakt und ist durchgängig deutlich intensiver als die Kontrolle.



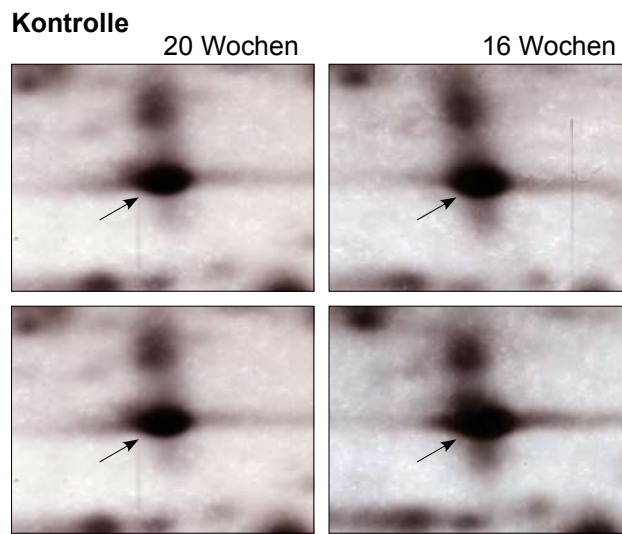
**Abbildung 3.37:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Polyadenylat-bindendes Protein 1 ist in den infizierten Organen beider Stadien des Milz-Rückstands-extraktes deutlich stärker ausgeprägt als in der Kontrolle.

**Polyadenylat-bindendes Protein 1** (auch Poly(A)-binding protein 1 oder PABP 1) ist aus dem Spot MIRE-B029 identifiziert worden. Das Protein beteiligt sich mit seinen RNA-bindenden Fähigkeiten an der Regulation von Nucleobasen-, Nucleosiden-, Nucleotiden- und Nucleinsäure-Metabolismen und ist dargestellt in Abb. 3.37. In beiden Stadien ist eine deutliche Zunahme der Spotintensität nachzuweisen.

**Proteasome Subunit Alpha Type 2** (Proteasome component C3, Macropain subunit C3, Multicatalytic endopeptidase complex subunit C3) ist ein relativ großer, kräftiger Spot (MIRE-B110), weshalb die leichte Erhöhung in beiden Stadien schwierig zu erkennen ist. Abb. 3.38 zeigt die Ausschnitte. Das Protein ist Teil des Ubiquitin-Proteasom-Systems und mit seiner ubiquitinspezifischen Protease-Aktivität in den Proteinmetabolismus eingebunden.

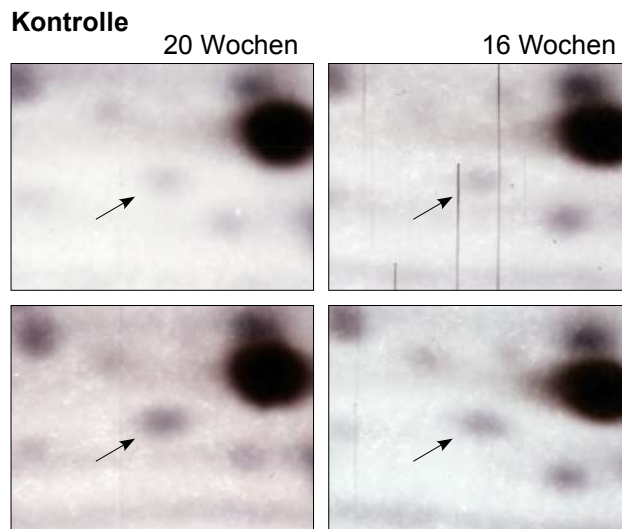
**Proteasome Subunit Alpha Type 3** (Proteasome component C8, Macropain subunit C8, Multicatalytic endopeptidase complex subunit C8, Proteasome subunit K) ist aus dem in der Kontrolle sehr schwachen Spot MIRE-B132 identifiziert worden. Eine deutliche (16 W) bis sehr deutliche (20 W) Erhöhung der Spotintensität ist zu beobachten und in Abb. 3.39 gezeigt. Das Protein tritt auch im Milz-Überstand auf, siehe dazu Abschnitt 3.5.1.

**Proteasome Subunit Alpha type 6** (Proteasome iota chain, Macropain iota chain, Multicatalytic endopeptidase complex iota chain) ist ein weiteres Protein des Proteasomsystems und zeigt in beiden Stadien eine deutliche Intensitätserhöhung. Der Spot MIRE-B130 ist zu sehen in Abb. 3.40.



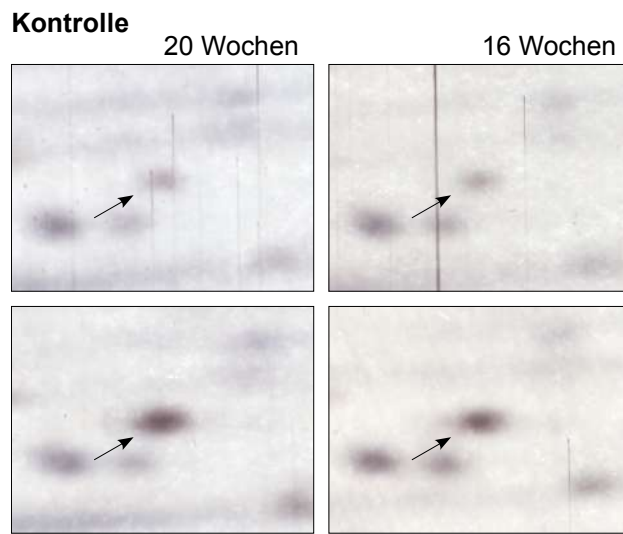
**Scrapie**

**Abbildung 3.38:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Die Intensitätserhöhung der Proteasome Subunit Alpha Type 2 im Milz-Rückstandsextrakt ist nur schwierig zu erkennen.



**Scrapie**

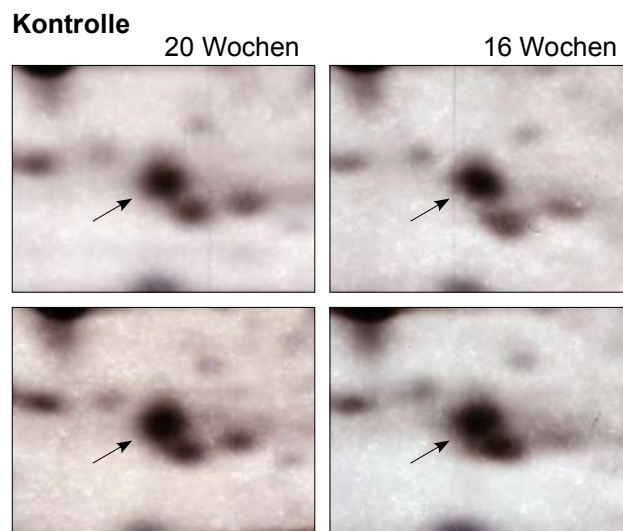
**Abbildung 3.39:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Im Milz-Rückstandsextrakt ist eine Intensitätserhöhung der Proteasome Subunit Alpha Type 3 zu sehen.



**Scrapie**

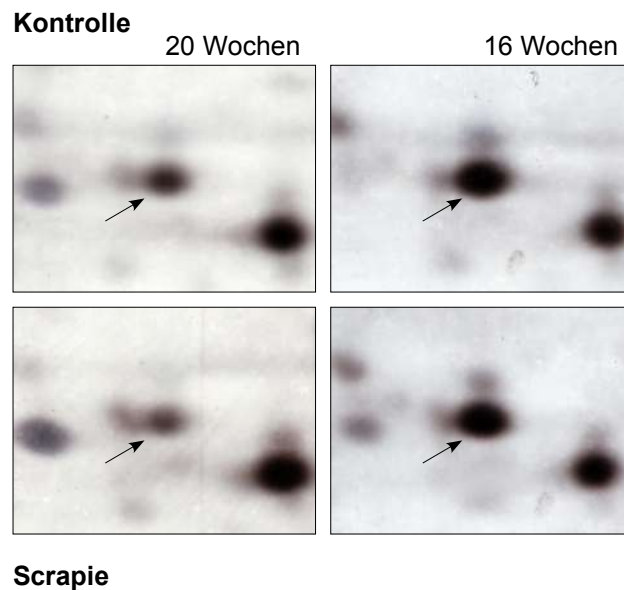
**Abbildung 3.40:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Die Proteasome Subunit Alpha type 6 erscheint im Milz-Rückstandsextrakt deutlich erhöht.

**Proteasome Subunit MC13** (Proteasome subunit beta type 8 precursor, Proteasome component C13, Macropain subunit C13, Multicatalytic endopeptidase complex subunit C13) ist ein weiteres Protein des Proteasoms. Auch der Spot MIRE-B116, dargestellt in Abb. 3.41, ist ein sehr großer, starker Spot, der deutlich erhöht ist nach 20 Wochen Infektionsdauer und leicht erhöht im 16-Wochen-Stadium.



**Scrapie**

**Abbildung 3.41:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Die Intensitätserhöhung der Proteasome Subunit MC13 im Milz-Rückstandsextrakt tritt schon 16 Wochen nach der Infektion auf.



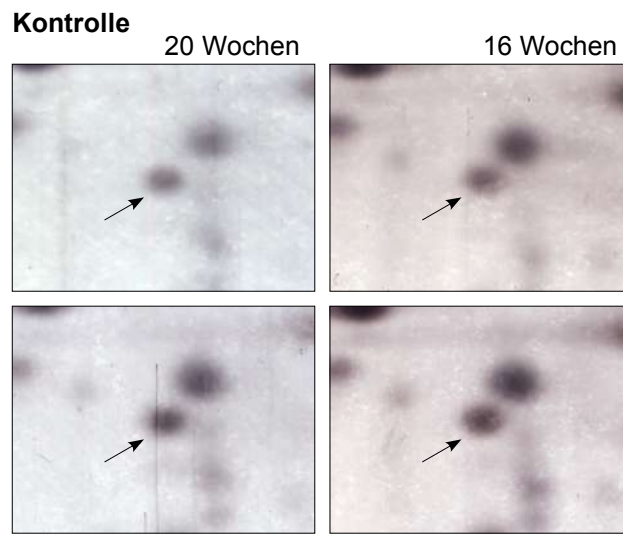
**Abbildung 3.42:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Nucleophosmin wird im 16-Wochen-Stadium stärker exprimiert als später nach 20 Wochen Infektionsdauer. Der Rückgang der Expression im Milz-Rückstandsextrakt erscheint im infizierten Tier deutlicher als in der Kontrolle.

**Nucleophosmin** (auch bezeichnet als Nucleolar phosphoprotein B23, Numatrin, Nucleolar protein NO38 bzw. NPM) ist als Chaperon am Proteinmetabolismus beteiligt. Seine Intensitätsänderung von Stadium zu Stadium ist auffällig groß: Die Expression des Proteins lässt bei den älteren Mäusen deutlich nach. Abb. 3.42 zeigt Spot MIRE-A056 und seine Intensitätsänderung.

**Stathmin** ist auch unter den Bezeichnungen Phosphoprotein p19, pp19, Oncoprotein 18, Op18, Leukemia-associated phosphoprotein p18, pp17, Prosofin, Metablastin, Pr22 protein und Leukemia-associated gene protein zu finden. Das Strukturprotein ist an Zellwachstum und/oder -erhalt beteiligt. Der in Abb. 3.43 dargestellte Spot MIRE-A059 ist in beiden gezeigten Stadien leicht erhöht.

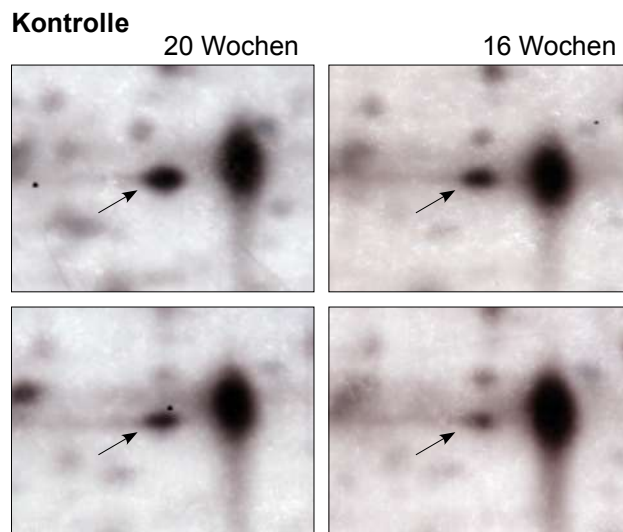
**Ribosomal Protein RS.40K** heißt auch 40S Ribosomal Protein SA, p40 oder 34/67 kDa Laminin Receptor. Das Protein ist Bestandteil der kleinen eukaryontischen 40 S-Ribosomenuntereinheit und involviert in Signaltransduktion und Zellkommunikation. Den im erkrankten Gewebe erniedrigten Spot zeigt Abb. 3.44.

**Nascent Polypeptide-associated Complex Alpha Polypeptide** (auch Alpha NAC/1.9.2. protein oder Alpha-NAC, non-muscle form) hat im Proteinmetabolismus als Chaperon seine Aufgabe.



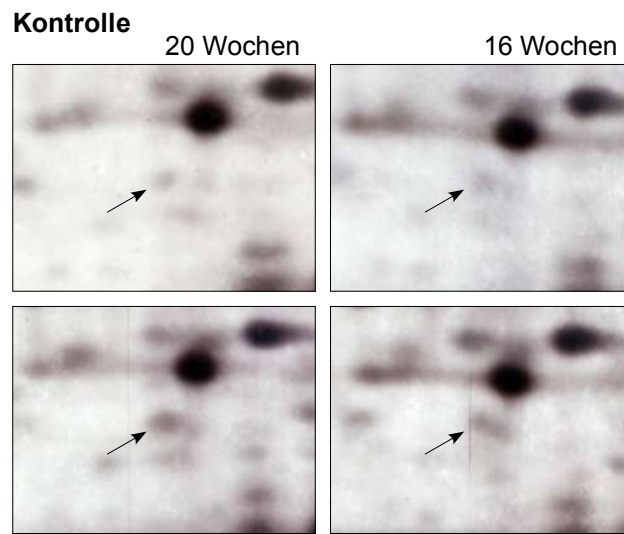
**Scrapie**

**Abbildung 3.43:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Stathmin ist in beiden Stadien des Milz-Rückstandsextraktes leicht erhöht.



**Scrapie**

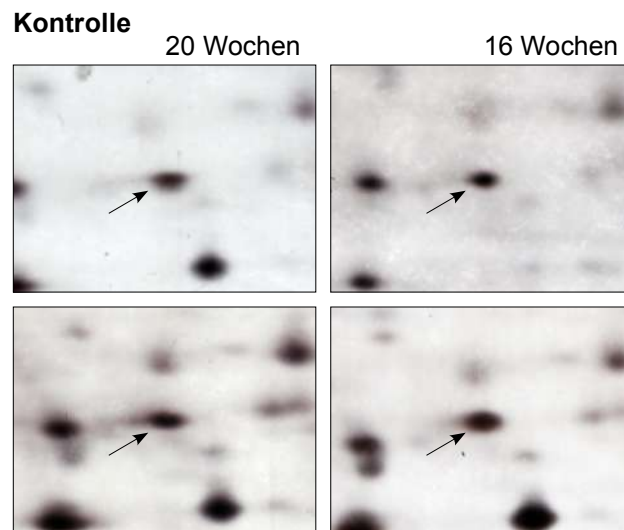
**Abbildung 3.44:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Ribosomal Protein RS.40K im Milz-Rückstandsextrakt ist bereits 16 Wochen nach Infektion gegenüber der Kontrolle erniedrigt. Die Erniedrigung innerhalb dieses frühen Stadiums ist sehr variabel zwischen den drei Laufpaaren, doch das obige 16-Wochen-Paar zeigt den Intensitätsunterschied recht gut.



**Scrapie**

**Abbildung 3.45:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Der gefundene Spot MIRE-A044 des Nascent Polypeptide-associated Complex Alpha Polypeptide ist in der Kontrolle sehr schwach ausgeprägt. Seine Intensität nimmt im erkrankten Gewebe des Milz-Rückstandsextraktes bereits 16 Wochen nach der Infektion zu.

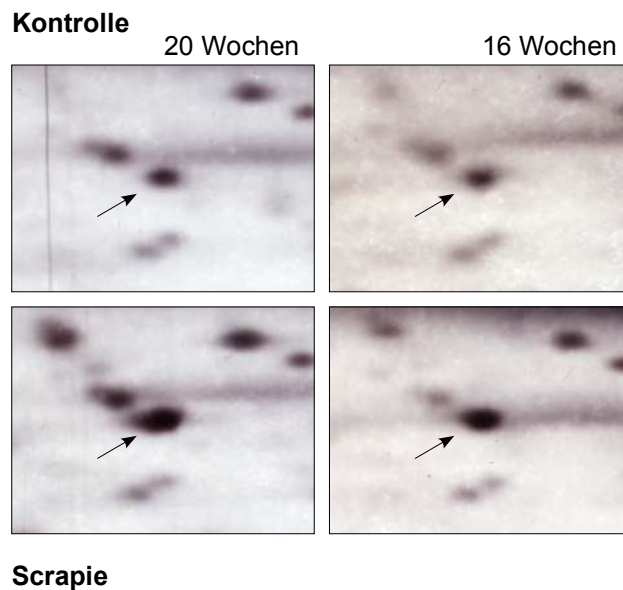
**Sideroflexin 3** kann mit Hilfe der *Human Protein Reference Database* keiner Klasse und Funktion zugeordnet werden. Der Spot MIRE-B062 ist in beiden Stadien leicht erhöht und in Abb. 3.46 dargestellt.



**Scrapie**

**Abbildung 3.46:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Sideroflexin 3 ist im Milz-Rückstandsextrakt in beiden Stadien leicht erhöht.





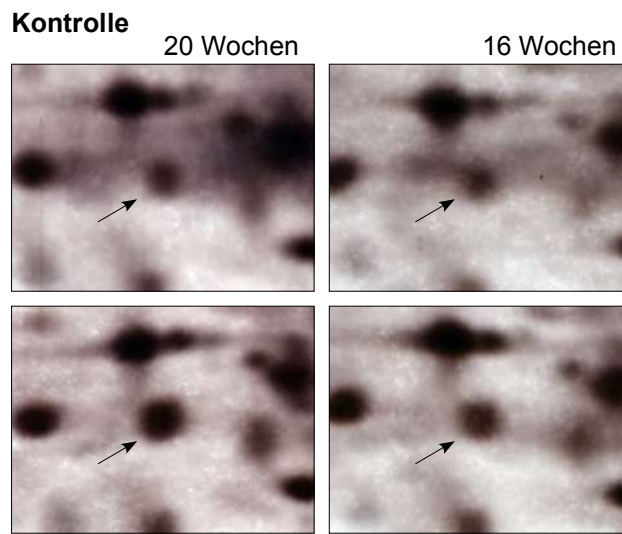
**Abbildung 3.47:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Im Rückstandsextrakt findet sich ein Fragment des Polypyrimidine Tract Binding Protein, welches in beiden Stadien deutlich erhöht ist.

**Polypyrimidine Tract Binding Protein** ist aus Spot MIRE-B107 identifiziert worden. Es handelt sich, geachtet der Position im Gel und aufgrund der Daten aus den massenspektrometrischen Analysen, vermutlich um ein Fragment. Abb. 3.47 zeigt die in beiden Stadien deutliche Erhöhung der Spotintensität.

**Chaperonin** wird in der Recherchedatenbank nicht näher spezifiziert. Spot MIRE-B092 ist 20 Wochen nach Infektion deutlich erhöht. Nach 16 Wochen ist erst eine leichte Intensitätszunahme erfolgt. Der Spot wird dargestellt in Abb. 3.48.

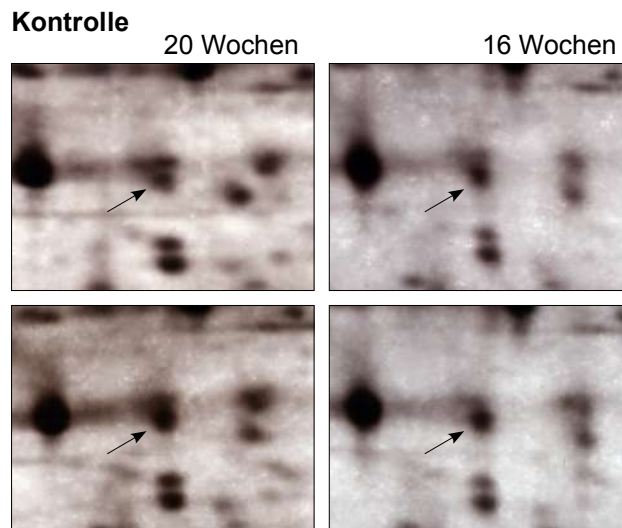
**Glutamate Dehydrogenase** hat als Enzym eine katalytische Funktion in Metabolismus und Energiezyklen. Spot MIRE-B031, dargestellt in Abb. 3.49, ist bereits 16 Wochen nach der Infektion deutlich erhöht.

**Fumarate Hydratase 1** (auch Fumarate hydratase, mitochondrial precursor, EF-3, Fumarase) ist ein Enzym und hat eine katalytische Funktion in Metabolismus und Energiezyklen. Der Spot MIRE-B043, dargestellt in Abb. 3.50, ist bereits nach 16 Wochen leicht erhöht, nach 20 Wochen dann deutlich erhöht.



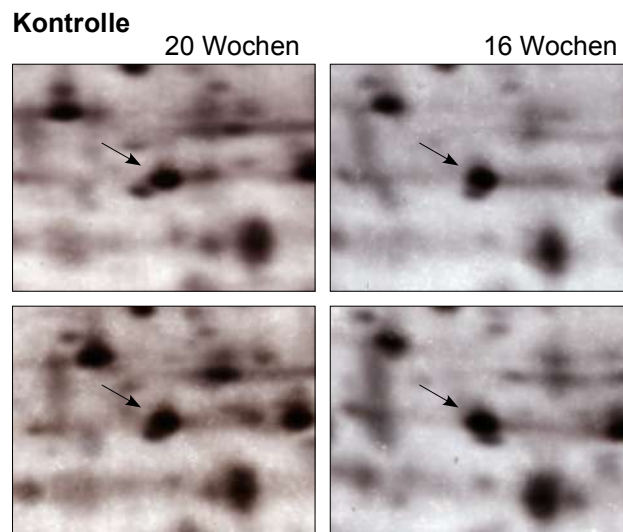
**Scrapie**

**Abbildung 3.48:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Chaperonin wird im Rückstandsextrakt der Milz gefunden und ist 16 Wochen nach der Infektion bereits leicht erhöht, vier Wochen später dann sogar deutlich.



**Scrapie**

**Abbildung 3.49:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Glutamate Dehydrogenase ist im Milz-Rückstandsextrakt schon 16 Wochen nach der Infektion deutlich erhöht.



**Abbildung 3.50:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Fumarate Hydratase 1 ist im Milz-Rückstandsextrakt schon nach 16 Wochen leicht stärker ausgeprägt. 20 Wochen nach der Infektion ist ein deutlich stärkerer Spot im Gel der infizierten Probe gegenüber der Kontrolle zu sehen.

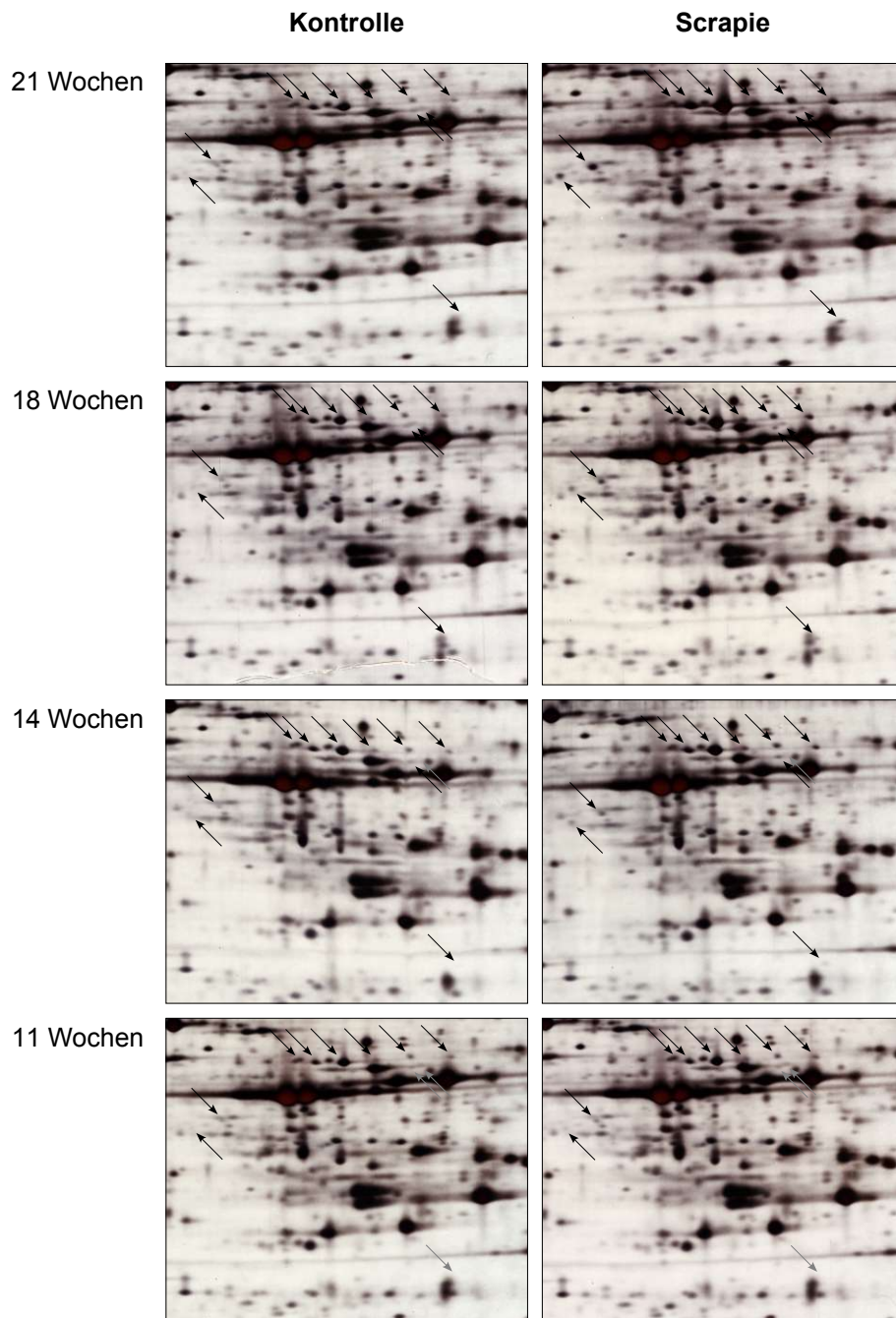
### 3.7.2 Gehirn

Die ersten gezeigten Spots sind durchgängig in allen vier untersuchten Stadien gleichgerichtet verändert.

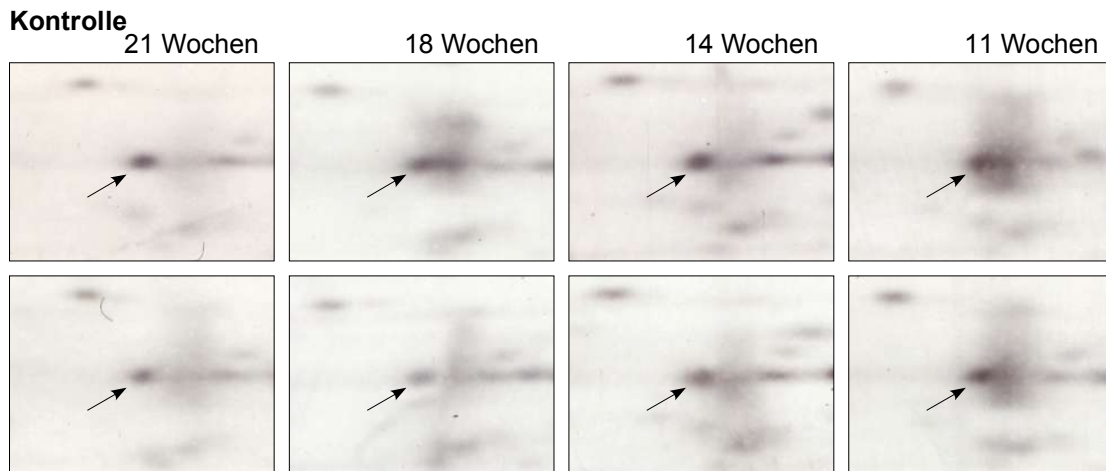
**GFAP** (Glial Fibrillary Acidic Protein) ist mit sehr vielen Spots vertreten. Die meisten davon sind durchgängig in allen vier Stadien erhöht (vgl. dazu auch Abschnitt 3.6.2 auf Seite 57 und Tab. B.4). GFAP ist als Strukturprotein für Zellwachstum und/oder -erhalt zuständig. Abb. 3.51 zeigt Ausschnitte je eines repräsentativen Probenpaares pro Stadium.

**Spot GGE-B079** ist nicht identifiziert, jedoch wegen seiner großen Konstanz in der Veränderung in Abb. 3.52 dargestellt. Ein Ausreißer bei 11 W wird ausnahmsweise ignoriert (Paar II<sup>2</sup> ist + statt –), alle übrigen Paare aller Stadien weisen eine leichte Erniedrigung des Scrapie-Spots gegenüber der Kontrolle auf (–).

Alle nachfolgend vorgestellten Spots weisen eine einheitliche, gleichgerichtete Veränderung in den drei letzten Stadien (21 W, 18 W und 14 W) auf.



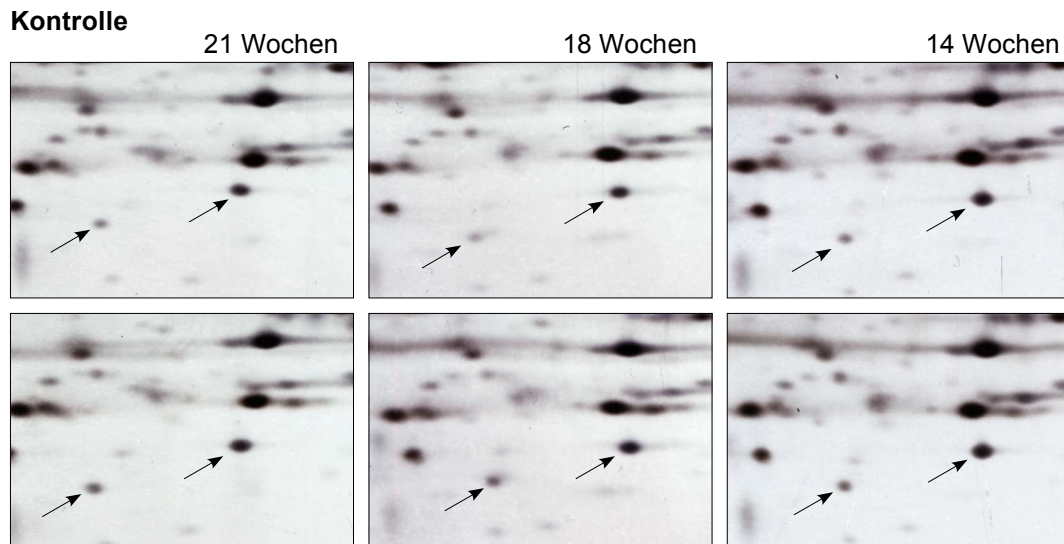
**Abbildung 3.51:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Das Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) liegt, wie der Name schon andeutet, auf der sauren Gelseite und ist mit vielen Spots vertreten. Die identifizierten Spots sind mit einem Pfeil gekennzeichnet, der grau wird, wenn der Spot in dem Stadium im Scrapie-Gewebe gegenüber der Kontrolle keine Veränderung aufweist.



**Scrapie**

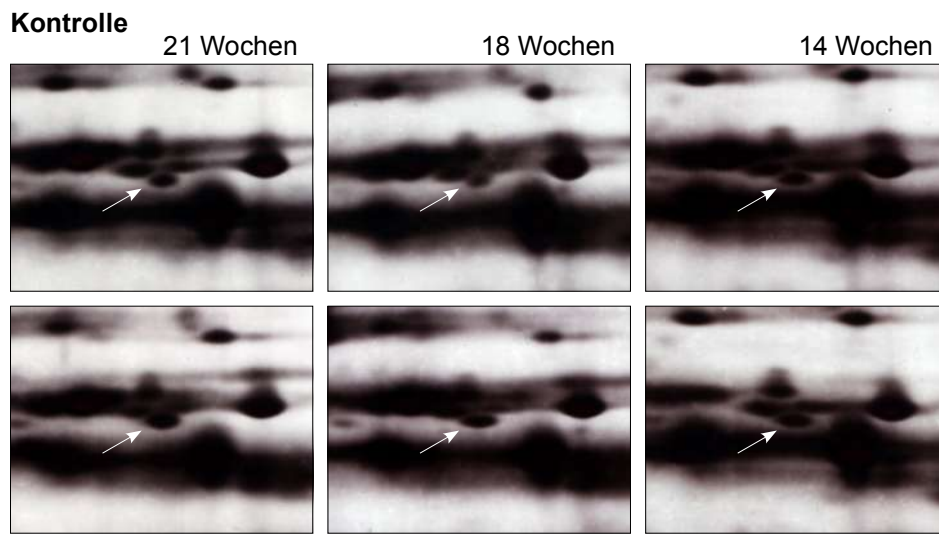
**Abbildung 3.52:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Spot GGE-B079 ist nicht identifiziert, aber im Gehirn in allen vier Stadien leicht erniedrigt.

$\alpha$ -B-Crystallin wird bereits auf Seite 58 vorgestellt, Abb. 3.21 zeigt die Position der beiden Spots im Gel. Im Falle des Spots GGE-B092, welcher ansonsten durchgehend leicht erhöht ist, wird im Stadium 18 W nach Infektion eine Ausnahme zugelassen (Paar IV<sup>7</sup> ist –), da  $\alpha$ -B-Crystallin im Zusammenhang mit Neurodegeneration bereits bekannt ist (siehe Abschnitt 4.1.1.3). Spot GGE-B094 ist nach 14 Wochen erst leicht erhöht, ab dem 18 W-Stadium weist er dann eine deutliche Intensitätserhöhung durch die Infektion auf. Abb. 3.53 zeigt die Spots GGE-B092 und GGE-B094 über drei Stadien.



**Scrapie**

**Abbildung 3.53:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse.  $\alpha$ -B-Crystallin besteht aus den erhöhten Spots GGE-B092 (rechts) und GGE-B094 (links).



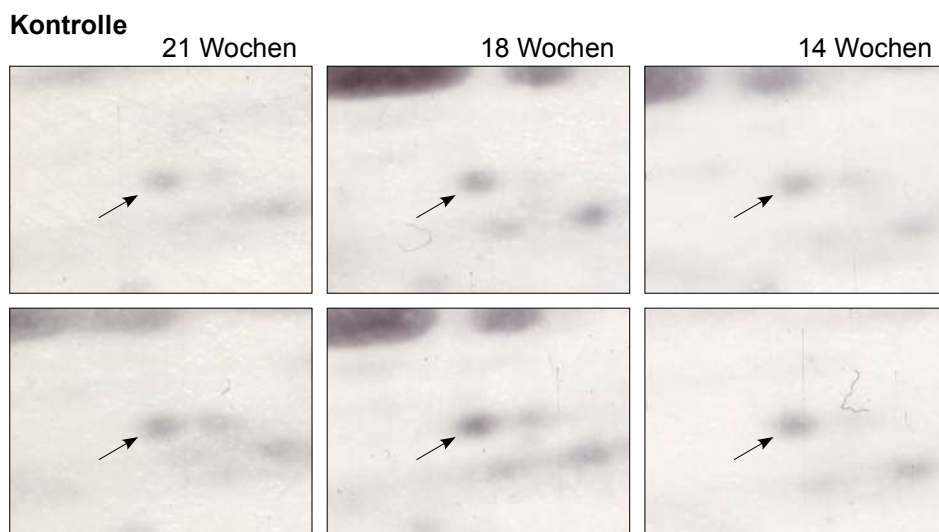
### Scrapie

**Abbildung 3.54:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Das Ubiquinol Cytochrome C Reductase Core Protein 2 ist Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette. Seine Intensitätserhöhung durch die Infektion ist schon 14 Wochen nach Inokulation zu beobachten.

**Ubiquinol Cytochrome C Reductase Core Protein 2** wird bereits in Abschnitt 3.4.4 vorgestellt. Eine leichte Intensitätserhöhung des Spots GGE-B055 ist nach 14 Wochen zu verzeichnen, in den beiden späten Stadien sieht man dann eine deutliche Zunahme der Spotintensität im erkrankten Gehirn. Abb. 3.54 stellt den Gehirnsput in den drei fraglichen Stadien dar.

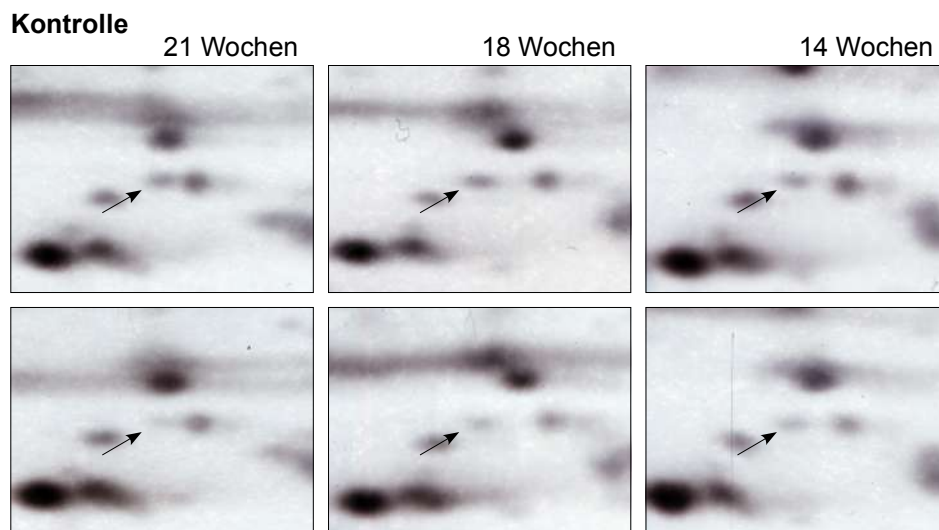
**Cystatin C Precursor** (oder Cystatin 3 bzw. Cystatin C) ist aus den zwei Spots GGE-B109 und GGE-B110 identifiziert worden. Das Protein wird auf Seite 58 vorgestellt, Abb. 3.21 zeigt die Lage beider Cystatin C-Spots zueinander. Abb. 3.55 stellt den nach 14 Wochen leicht, später deutlich erhöhten Spot GGE-B109 dar. Der zweite Spot GGE-B110 ist nur in den Stadien 21 W und 18 W eindeutig einheitlich erhöht und wird hier nicht gezeigt.

**Chain A, Crystal Structure Of Murine Arl3-Gdp** ist aus dem Spot GGE-B086 identifiziert. Abb. 3.56 zeigt den durchgehend leicht erniedrigten Spot.



**Scrapie**

**Abbildung 3.55:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Zwei Spots des Cystatin C Precursors sind identifiziert, doch nur der hier dargestellte Spot GGE-B109 ist schon nach 14 Wochen Infektionsdauer erhöht.



**Scrapie**

**Abbildung 3.56:** 2D-Gel-Ausschnitte repräsentativer Probenpaare scrapieinfizierter C57Bl/6-Mäuse. Chain A, Crystal Structure Of Murine Arl3-Gdp ist im Gehirn schon 14 Wochen nach der Infektion leicht erniedrigt.





## 4 Diskussion

Der vorliegenden Studie liegt ein Screening von Proteinexpressionsänderungen im scrapieinfizierten Mausmodell mithilfe proteomanalytischer Methoden zugrunde. In den untersuchten Organen Gehirn und Milz ist eine Vielzahl von Intensitätsänderungen mit der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese nachzuweisen. Die massenspektrometrische Identifikation der Proteinspots liefert sowohl im Zusammenhang mit Scrapie bereits bekannte Vertreter als auch bislang noch nicht mit Scrapie in Verbindung gebrachte Proteine.

Grundsätzlich weichen die Ergebnisse verschiedener Studien durchaus deutlich voneinander ab, da die jeweils verwendeten Versuchsansätze und -systeme – auch je nach Fragestellung – oft sehr differieren. Einige Arbeitsgruppen führen ihre Untersuchungen an Zellkulturen durch, während andere ein Tiermodell bevorzugen. Doch auch hier sind wiederum verschiedene Spezies (z. B. Maus und Hamster) zu unterscheiden, zum Teil auch verschiedene Züchtungen der Modellorganismen. Verschiedene Erregertypen (BSE und Scrapie) sowie innerhalb desselben Erregertyps unterschiedliche verwendete Stämme können wiederum sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Ergebnisse haben [18]. Die Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten macht Vergleiche schwierig. Dennoch können Ähnlichkeiten oder auch Unterschiede der gefundenen Proteinveränderungen in der Literatur Hinweise auf deren Bedeutsamkeit liefern. Studien belegen, wie unterschiedlich die Ergebnisse je nach verwendetem Scapiestamm ausfallen können [192] und wie vorsichtig man beim Vergleich mit Ergebnissen anderer Modellorganismen oder Zellkulturen sowie anderem Infektagens (sei es ein Scapiestamm, BSE oder CJK) sein sollte. Die vorliegende Arbeit unterscheidet sich von der Mehrheit der bisherigen Untersuchungen in ihrem Ansatzpunkt: systematische Proteomanalyse. Trotzdem kann auch diese Untersuchung nur das Spektrum der Ergebnisse erweitern und Ansätze für weiterführende Studien liefern.

### 4.1 Betrachtung einzelner Proteine

#### 4.1.1 Gehirn

Bei der vorliegenden Untersuchung der Proteinexpression des Gesamtgehirnextraktes im Scrapie-Mausmodell können in einzelnen Regionen viel stärker veränderte Proteinlevel leicht übersehen werden, da sie in dem so komplexen Organ Gehirn nicht in allen Arealen in gleicher Menge auftreten. Daher sollten unbedingt auch geringe Veränderungen in der Spotintensität berücksichtigt werden [167]. Auch in anderen Studien sind Expressionsveränderungen oft nur relativ gering [19].

Insgesamt sind im Vergleich zur Kontrolle deutlich mehr Proteine im infizierten Gewebe stärker ausgeprägt, als Herunterregulierungen auftreten. Dies deckt sich mit Befunden aus Genexpressionsstudien [19]. Eine Reihe der gefundenen Intensitätsänderungen lassen sich Proteinen zuordnen, welche man rasch funktionell einordnen kann. Dazu gehören beispielsweise Cystatin C und GFAP.

### 4.1.1.1 Cystatin C

Brown et al. [22] finden bei Untersuchungen zur Genexpression im Hippocampus scrapie-infizierter Mäuse das bis dahin noch nicht mit Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien in Zusammenhang gebrachte Cystatin C hochreguliert. Die Expressionsveränderung ist bereits vor der terminalen Erkrankung der Versuchstiere zu beobachten, sogar vor dem Auftreten erster klinischer Symptome.

In der vorliegenden Arbeit sind zwei Spots als Cystatin C (bzw. Cystatin-C-Precursor) identifiziert worden. Eine der beiden Isoformen ist bereits nach 14 Wochen stärker im infizierten Gehirn ausgeprägt als in der Kontrolle (Abb. 3.55). Dies deckt sich mit dem Befund in Browns Studie [22].

Auch wenn Cystatin C lange nicht im Zusammenhang mit TSE bekannt war, ist es doch bereits schon früher mit Ablagerungen in Gehirnen von Alzheimer-Patienten in Verbindung gebracht worden [52]. Darüber hinaus sind Genpolymorphismen dieses Proteins sogar als Risikofaktor für Alzheimer identifiziert worden [14, 66, 46].

Cystatin C ist ein Inhibitor lysosomaler Cystein-Proteasen, zu denen beispielsweise Cathepsine und Kaspasen zählen. Die Überexpression von Cystatin C sowohl bei Alzheimer als auch Scrapie könnte eine protektive Antwort der betroffenen Organismen auf eine exzessive Lysosomenaktivierung repräsentieren. In beiden Erkrankungen sind solche übermäßigen Lysosomenaktivierungen ein prominentes Merkmal, zu dessen Abmilderung eine Anhebung des Cystatin-C-Niveaus beitragen kann.

Auf der anderen Seite kann eine übermäßige Zunahme der Expression von Cystatin C zu einer Überkompensation der Lysosomenaktivierung führen. Kaspasen sind wesentlich an der Apoptose beteiligt, so dass ihre Inhibierung schwerwiegende Folgen für die Entwicklung oder Infektantwort des betroffenen Organismus haben kann. Auch Cathepsine spielen bei der Apoptose eine Rolle, vornehmlich sind sie aber am Abbau von überalterten Zellorganellen wie Mitochondrien beteiligt. Auch hier gilt, dass eine übermäßige Inhibition der Proteasetätigkeit negativen Einfluss auf die gesunde Entwicklung oder Heilung des betroffenen Organismus haben kann.

### 4.1.1.2 Saures Gliafaserprotein (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP)

Wohlbekannt im Zusammenhang mit Prioninfektionen und anderen neurodegenerativen Erkrankungen ist das saure Gliafaserprotein (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP) [55, 40, 49, 155], ein Strukturprotein, das eine Rolle in Zellwachstum und/oder -erhaltung spielt. Der Befund der vorliegenden Arbeit, dass dieses Protein bereits früh während der Infektion zumindest in einigen der vielen Spots hochreguliert vorliegt (siehe auch Abb. 3.51), deckt sich mit den Ergebnissen vieler Untersuchungen. Dies spricht für die angewandte Methode und kann als Validierung dieser angesehen werden.

### 4.1.1.3 $\alpha$ -B-Crystallin

Auch die Funktion von  $\alpha$ -B-Crystallin ist bekannt. Als Mitglied der Familie kleiner Hitzeschockproteine spielt es eine Rolle im Proteinmetabolismus. Es unterstützt die Proteinfaltung, Proteinrefaltung und Degradierung fehlgefalteter Polypeptide, verhindert Proteinaggregation, spielt eine Rolle in der Bildung von Aggresomen und begünstigt das Überleben von Zellen [134].

Im Scrapiemodell ist die  $\alpha$ -B-Crystallin-Intensität im Gegensatz zu jener in anderen Mausmodellen neurodegenerativer Erkrankungen (darunter Morbus Parkinson und Chorea Huntington) erhöht. Diese Erhöhung von  $\alpha$ -B-Crystallin geht einher mit der nur bei Scrapie vorhandenen Gliose, angezeigt durch die deutliche Erhöhung von GFAP [196]. Eine Erhöhung von  $\alpha$ -B-Crystallin-mRNA ist bereits in einem anderen Scrapie-Modell bekannt [62]. Dieses Hitzeschockprotein wirkt der Inklusionsbildung von GFAP in Astrozyten entgegen [112], was sein vermehrtes Auftreten parallel zur vorhandenen Gliose – der drastischen Vermehrung von Astrozyten – im scrapieinfizierten Modellorganismus erklären könnte. Im Gegensatz dazu kann die Erniedrigung der  $\alpha$ -B-Crystallin-Konzentration in Morbus Parkinson und Chorea Huntington möglicherweise verantwortlich sein für Zelltod und Aggregationsförderung [196]. Denkbar ist allerdings, dass die Gliose im scrapieerkrankten Gehirn eine Verminderung von  $\alpha$ -B-Crystallin in anderen Zelltypen maskiert, zumal selbst gesunde Astrozyten deutlich mehr dieses Proteins enthalten als Neuronen. So wird durch die Gliose das Verhältnis von Astrozyten zu Neuronen und damit auch der Gehalt an  $\alpha$ -B-Crystallin signifikant beeinflusst [196].

Die beiden nachweisbaren Proteinspots, die als  $\alpha$ -B-Crystallin identifiziert sind, weisen eine unterschiedliche Phosphorylierung auf [196]. Da allerdings beide Spots in allen untersuchten Modellen neurodegenerativer Erkrankungen jener Studie stets gleichgerichtet verändert sind, ist ein Eingriff in die Phosphorylierung als Folge der Erkrankung bzw. Infektion unwahrscheinlich. Die Phosphorylierung von  $\alpha$ -B-Crystallin vermindert seine Oligomerisierung und chaperonartige Aktivität [92].

### 4.1.1.4 Apolipoprotein E

Apolipoproteine, darunter das in der vorliegenden Studie im scrapieinfizierten Gehirn stärker ausgeprägte Apolipoprotein E, sind wichtige Komponenten im Lipidmetabolismus. Lipide spielen in vielen Bereichen und in unterschiedlichen Formen eine Rolle im Organismus, darunter auch als Hauptkomponente zellulärer Membranen. Das Apolipoprotein E wird bereits mit Scrapie in Verbindung gebracht [57], wo es speziell in Astrozyten hochreguliert ist. Dieser Anstieg an Apolipoprotein E könnte den Versuch der Astrozyten repräsentieren, Schäden innerhalb des Zentralnervensystems zu reparieren oder zu minimieren. Apolipoprotein E ist auch an neuronalen Membranen vorzufinden, was der dem Apolipoprotein E zugeschriebenen Lipid-Transportaufgabe zuzuschreiben ist.

Ein ausgeglichener Lipidmetabolismus ist angesichts der Bedeutung von Lipiden als Hauptkomponente aller zellulärer Membranen von essentieller Bedeutung für die Zelle. Seine Störung hat möglicherweise den Integritätsverlust der Zelle und ihren Tod zur Folge.

### 4.1.1.5 Annexin A5

Annexin A5 ist der Proteinklasse *Signaltransduktion, Zellkommunikation* zugeordnet und ist ein spezifischer Ligand für Phosphatidylserin. Phosphatidylserin wird von apoptotischen Zellen auf ihrer modifizierten Membran präsentiert, um eine rasche Erkennung und Aufnahme durch Phagozyten sicherzustellen. Die Erkennung von präsentiertem Phosphatidylserin verursacht die Freisetzung von immunsuppressiven Zytokinen, welche die Inflammation dämpfen und das Heranreifen antigenpräsentierender dendritischer Zellen

verhindern. Annexin A5 kann *in vivo* mit den immunsuppressiven Effekten apoptotischer Zellen interferieren und nachweislich die Immunogenität apoptotischer Zellen wiederherstellen [140]. Störungen im Prozess der Beseitigung sterbender Zellen kann unerwünschte Nebeneffekte haben, z. B. chronische Autoimmunität. Annexin A5 vermindert in obiger Studie die Aufnahme apoptotischer Zellen durch peritoneale Makrophagen.

Ein Expressionsanstieg von Annexin A5, wie er in dieser Arbeit in den letzten beiden Gehirnstadien zu sehen ist, verstärkt die Wiederherstellung der immunogenen Aktivität apoptotischer Zellen und dürfte eine vermehrte oder raschere Apoptose zur Folge haben.

### 4.1.2 Milz

Die Milz spielt – wie das gesamte lymphoretikuläre System – eine wichtige Rolle bei der peripheren Erregerausbreitung [101]. Allerdings mangelt es an einer Pathologie dieses Organs, so dass man offenlassen muss, welchen Bezug die Proteine zur Replikation des Scrapie-Erregers haben. Hier müssen weiterführende Untersuchungen und andere Ansätze Aufschluss über mögliche Zusammenhänge bringen. Einige interessante Anhaltspunkte liefern die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Änderungen in den Proteinleveln.

#### 4.1.2.1 Heterogene nukleäre Ribonukleoproteine

Die nukleinsäurebindende Eigenschaft des Prionproteins ist bereits bekannt [72], eine physiologische Funktion des Proteins im RNA-Transport oder beim Spleißen wird seit längerem vermutet. Mittlerweile hat eine Studie die Interaktion des PrP<sup>C</sup> mit einem am Nukleinsäuremetabolismus beteiligten Protein nachgewiesen [175]: Das Prionprotein interagiert mit dem Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2/B1 (hnRNP A2/B1), welches in der vorliegenden Arbeit in vielen Isospots der drei Milzfraktionen veränderte Intensitäten aufweist (siehe auch Abschnitt 3.5.5, Abb. 3.18, Abb. 3.19 und Abb. 3.20). Ebenso wie Martinez eine deutlich erhöhte Genexpression des hnRNP A2/B1 in Zellkulturen nachweist [131], die mit einem neurotoxischen Fragment des humanen Prionproteins behandelt wurden, ist im Mausmodell der vorliegenden Arbeit infolge der Prioninfektion eine überwiegende Erhöhung der Proteinlevel in allen drei Milzfraktionen festzustellen.

Insgesamt stellen verschiedene hnRNP-Varianten eine große Gruppe der veränderten Proteine. Die Eigenschaft des PrP<sup>C</sup>, an RNA zu binden und die infolge der Prioninfektion vielfach variablen Proteinlevel der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine lassen auf eine massive Beeinflussung des Nukleinsäuremetabolismus durch die Erkrankung schließen. Hier kann eine explizite Untersuchung der verschiedenen Typen heterogener nukleärer Ribonukleoproteine während des Krankheitsverlaufes Aufschluss geben. Die parallele Untersuchung von RNA- und Proteinleveln erscheint dabei besonders interessant.

Auch die Untersuchung früherer Infektionsstadien kann weitere Einblicke in die Expressionsveränderung des hnRNP A2/B1 bieten. Abb. 3.30 zeigt die große Änderung der Spot-Intensität zwischen dem am weitesten fortgeschrittenen Stadium und jenem unmittelbar davor: Einer der Spots ist im früheren Stadium in der Kontrolle beinahe nicht vorhanden, im infizierten Organ jedoch stärker ausgeprägt als sogar im späteren Stadium. Solche Unterschiede machen deutlich, wie ergiebig eine Zeitstudie sein kann und bietet eine gute Perspektive, die Untersuchung einmal vom frühen zum späten Stadium hin vorzunehmen.

#### 4.1.2.2 Proteasomuntereinheiten

Das Ausschalten von PrP<sup>C</sup> in einem Modell für Chorea Huntington führt zu einer Verminderung der Proteasomentätigkeit [120]. Auch in der vorliegenden Arbeit fallen einige mit Proteasomen assoziierte Proteine durch Intensitätsänderung auf, wahrscheinlich hervorgerufen durch den Entzug von PrP<sup>C</sup> im Verlauf der Erkrankung, welches zunehmend in die unlösliche Form PrP<sup>Sc</sup> übergeht. Während die Proteinspots der im Milz-Überstand gefundenen Proteasomuntereinheit und der Proteasom-Aktivator-Komplex-Untereinheit jeweils auf eine niedrigere Konzentration hinweisen, sind die Spots in Rückstandsextrakt und Rückstandssuspension stärker ausgeprägt. Diese Änderungen können auf eine Proteasomdysfunktion hindeuten, die möglicherweise durch ein Ungleichgewicht der beteiligten Untereinheiten hervorgerufen wird. Insbesondere die Erniedrigung einer Komponente des Proteasom-Aktivator-Komplexes deutet auf eine Störung der Zellkommunikation und explizit der Aktivierung der Proteasomentätigkeit hin.

Eine Folge gestörter Proteasomenfunktion ist, dass fehlerhafte und beschädigte Proteine nicht mehr zuverlässig und ausreichend abgebaut werden und ihrerseits weiterführende Schäden provozieren.

Die Beeinträchtigung des Proteasomsystems fördert auch die PrP-Akkumulation im Zytoplasma [125, 193]. Falls dies eine Sekundärfolge der Infektion ist, verschlimmert sie die Akkumulation bzw. Infektion möglicherweise noch zusätzlich. Im Falle eines Primäreffektes fördert die Beeinträchtigung des Proteasomsystems gegebenenfalls überhaupt erst die Infektion bzw. deren Ausbreitung.

#### 4.1.3 Elongation Factor 1 Alpha

Der Elongation Factor 1 Alpha (EF-1 $\alpha$ -1) ist in der vorliegenden Studie sowohl im Gehirn als auch in der Milz der infizierten Tiere hochreguliert. Im Gehirn lässt sich sogar bereits zum frühesten untersuchten Zeitpunkt eine deutliche Intensitätszunahme dieses Proteinspots gegenüber der Kontrolle feststellen. EF-1 $\alpha$ -1 ist innerhalb des Proteinmetabolismus an der Translationsregulation beteiligt. Seine Überexprimierung fällt besonders auf, da in der vorliegenden Studie die Intensitätserhöhungen in beiden untersuchten Organen deutlich überwiegen.

Der Befund unterstützt die These, dass aufgrund der Scrapie-Infektion eine globale Störung des Proteinmetabolismus vorliegt. Umso schwieriger ist es, die direkt durch die Infektion ausgelösten Veränderungen zu identifizieren und von den erst nachfolgend auftretenden Abnormalitäten zu unterscheiden.

## 4.2 Oxidativer Stress durch Prioninfektion

Oxidativer Stress birgt für eine Zelle und ein Gewebe immer auch die Gefahr größerer Schäden. Organismen sind daher stets bestrebt, sich mittels verschiedener Mechanismen und Enzyme vor schädlichen Oxidantien zu schützen. Untersuchungen an sporadischen Creutzfeldt-Jakob-Fällen zeigen eine vermehrte oxidative Stressantwort gegenüber altersangepassten Kontrollen [71]. Auch die vorliegende Arbeit liefert Hinweise auf Veränderungen bei der Stressantwort. Betroffen sind zum Beispiel die Peroxidasen Peroxiredoxin 1 und Peroxiredoxin 2 in der löslichen Fraktion der Milz und Peroxiredoxin 6 im Gehirn.

Ein Ungleichgewicht bzw. eine zu geringe Konzentration von auf bestimmte Oxidantientypen spezialisierten Peroxidasen und anderen oxidativen Stressantwortproteinen führt zu Schäden an Zellkomponenten und schließlich der ganzen Zelle bis hin zum Zelltod. Von oxidativem Stress wird bereits als einer gemeinsamen Eigenschaft der neurodegenerativen Erkrankungen Alzheimer und Morbus Parkinson [130] berichtet. Auch im Scrapie-Maus-Modell ist oxidativer Stress bekannt [194].

### 4.3 Zytoskelett-Proteine

Die umfassenden Ergebnisse von Chich et al. [42] beziehen sich zwar auf eine Kultur neuronaler Zellen, jedoch lassen einige Ergebnisse Vergleiche mit veränderten Proteinen im Mausmodell der vorliegenden Arbeit zu. So sind einige der betroffenen Proteine am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt. Diese fibrillären Strukturen sind für die Formgebung der tierischen Zelle essentiell. Insbesondere decken sich einige Proteinveränderungen mit jenen in der vorliegenden Arbeit gefundenen Vertretern.

Villin 2 (Synonym: Ezrin) bildet mit Radixin und Moesin gemeinsam einen Komplex, welcher der Verankerung der Aktinkomponenten des Zytoskeletts an der Plasmamembran dient. Alle drei Proteine weisen Intensitätsdifferenzen in der scrapieinfizierten Milz auf. Im Gehirn-Gesamtextrakt sind ebenfalls einige dem Zytoskelett zuzuordnende Proteine verändert, darunter Moesin, Tropomyosin und das Aktin-like Protein 3.

Darüber hinaus fallen weitere Proteine auf, die dem Zytoskelett zuzuordnen sind (siehe dazu die Proteinklasse *Zellwachstum und/oder -erhaltung* in Tab. 3.2, Tab. 3.4 und Tab. 3.8).

Eine Veränderung in der Zusammensetzung der Zytoskelettkomponenten kann die Beeinträchtigung oder den Verlust der strukturellen Integrität der Zelle und eines ganzen Gewebes zur Folge haben. Darüber hinaus dienen einige Zytoskelettkomponenten auch als Verankerungspunkte und Transportwege für Organellen. Eine Störung dieses Proteinnetzwerkes kann einen Eingriff in den Metabolismus der Zelle bedeuten. Infolgedessen können Unterversorgung von Zellkompartimenten, mangelnder Abbau von Schadstoffen und die Beeinträchtigung der zellulären Gesamtfunktion auftreten, die bis zum Zelltod reichen.

### 4.4 Eingriff in Zellkommunikation und Signaltransduktion

Sowohl im Gehirn als auch in der Milz finden sich zahlreiche Proteine verändert, die zur Proteinklasse *Signaltransduktion, Zellkommunikation* gehören. Darunter sind Proteine zur Zellzyklusregulation (z. B. Bcas2 im Milz-Rückstandsextrakt, siehe Tab. 3.4, Septin 7 im Gehirn, siehe Tab. 3.8) und Adaptermoleküle für die Signaltransduktion (z. B. 14-3-3 protein eta im Milz-Überstand, siehe Tab. 3.2, Toll-interacting protein im Gehirn). Auch Proteine, die an der für die Signaltransduktion wichtigen Kalziumbindung beteiligt sind, weisen veränderte Konzentrationen auf: Annexin A5 und Annexin A4 im Gehirn, Annexin A6 im Milz-Überstand und Annexin A2 im Milz-Rückstandsextrakt. Das Absinken der Konzentrationen von Synapsin 1 und Synapsin 2 im Gehirn scrapieinfizierter Mäuse bedeutet einen Eingriff in die Kontrolle der synaptischen Aktivität, an welcher die Synapsine beteiligt sind.

Es ist bereits bekannt, dass die Synapsenpathologie (sowohl prä- wie postsynaptisch) eine herausragende Abnormalität in der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit ist. Auch Synapsin 1 ist im Zusammenhang mit der Synapsenpathologie in CJK-Gehirnen als vermindert exprimiert bekannt [65].

## 4.5 Aussagekraft der veränderten Proteinlevel

Was sagen die veränderten Proteinlevel aus? Die Zelle als Grundeinheit des Lebendigen ist ein äußerst komplexes Gebilde, dessen verschiedenartige Bestandteile hochdynamisch und auf unterschiedlichen Ebenen miteinander interagieren. In der Proteomik liegt das Hauptaugenmerk auf den Proteinleveln und ihren Zusammenhängen.

Die Zelle besteht aus hochstrukturierten Netzwerken von Protein-Protein-Interaktionen. Diese Interaktionen finden zum einen zwischen den Proteinen innerhalb desselben Stoffwechselweges statt, zum anderen aber auch zwischen Proteinen unterschiedlicher Stoffwechselwege, so dass es letztlich zu einer Verknüpfung und Interaktion mehrerer solcher metabolischer Wege kommt. Diese können hochkomplex sein und sich in unterschiedlichen Dimensionen mit Beteiligung verschieden zahlreicher Metabolismuswege abspielen. Steuernde Regulationsmechanismen greifen nicht nur innerhalb eines Stoffwechselweges, sondern durchaus auch übergreifend.

Insgesamt lässt sich also das Proteom als die Gesamtheit vieler Protein-Netzwerke ansehen, mit deren Aufrechterhaltung und Regulierung die Zelle vermutlich ständig konfrontiert ist. So lässt sich erklären, dass im Verlaufe einer Erkrankung auftretende Änderungen der Menge eines Proteins nicht zwingend von der Erkrankung selbst hervorgerufen werden. Vielmehr können diese Änderungen der Proteinintensität und -zusammensetzung Seiteneffekte dieser Regulationsmechanismen darstellen, welche im Zuge des vermuteten Bestrebens einer jeden Zelle auftreten, das ihr typische, physiologische Verhältnis der Proteinzusammensetzung beständig auszubalancieren.

Allein anhand des Auftretens von Mengenänderungen bestimmter Proteine im Zuge einer Erkrankung – in dieser Studie der Scrapie-Infektion im Mausmodell – kann also noch keine klare Aussage darüber getroffen werden, ob es sich jeweils um eine direkte Folge der Erkrankung handelt (Primäreffekt), oder ob diese Veränderung aufgrund weiterer, möglicherweise bislang nicht nachgewiesener Mechanismen im Organismus hervorgerufen wird (Sekundäreffekt). So verursacht beispielsweise die Fehlfaltung des Huntingtins bei Chorea Huntington, dass diese durch Chaperone behoben wird, welche dann jedoch an anderer Stelle fehlen und zu mangelnder Chaperonaktivität bei anderen Proteinfaltungsprozessen führt. Auf diesem Wege beeinflusst das Huntingtin indirekt weitere Stoffwechselwege, welche ihrerseits zur Pathogenese der Erkrankung beitragen [7]. So *kann* eine besonders früh im Krankheitsverlauf auftretende Veränderung ein Hinweis darauf sein, dass es sich hierbei eventuell um einen Primäreffekt handelt. Auf diese Proteinveränderungen besonderes Augenmerk zu richten, erscheint sinnvoll.

Ein Großteil der differentiellen Expression im klinischen Stadium der Prioninfektion repräsentiert schwere Veränderungen, welche möglicherweise eher einen Indikator einer generalisierten Antwort (auf den schlechten Allgemeinzustand der kranken Tiere) darstellen als dass sie eine echte Rolle in der Prionpathogenese spielen. In späten Stadien ist

es daher in jedem Falle schwierig, zwischen generalisierter Erkrankung und einer direkt auf die Prioninfektion bezogenen Antwort zu unterscheiden. Daher sind insbesondere die früh im präklinischen Stadium auftretenden Unterschiede von Interesse.

## 4.6 Zweidimensionale Gel-Elektrophorese – Grenzen und Möglichkeiten

### 4.6.1 Grenzen

Schwer lösliche Proteine (z. B. stark hydrophobe Membranproteine), sehr niedrige Konzentrationen sowie sehr kleine und sehr große Proteine werden mit der in dieser Studie angewandten Methode nicht hinreichend erfasst. Für diese speziellen Gruppen von Proteinen empfiehlt es sich, auf andere Techniken zurückzugreifen.

Auch der Zeitfaktor bei dieser Methode ist nicht unerheblich, insbesondere die Auswertung der erhaltenen Gele mit Hunderten und Tausenden von Proteinspots ist aufwendig.

### 4.6.2 Möglichkeiten

Mittels Zoomgelen (beispielsweise mit IPG-Streifen für enge pH-Bereiche und Gelgradienten für bestimmte Massen) können einzelne Molekulargewichts- und pI-Bereiche gezielt untersucht und in diesen Ausschnitt gehörende Proteine weiter aufgetrennt werden. So können im Gesamtgel möglicherweise nicht klar voneinander getrennte Spots verschiedener Proteine separiert und untersucht werden.

Die fortschreitende Entwicklung bringt weitere Techniken hervor, mit deren Hilfe auch bisher nicht oder nur schlecht erfassbare Proteine nun sichtbar gemacht werden können. Unter Zuhilfenahme einer solchen neuen Technik, die die Limitierung der verwendeten Methoden in Teilbereichen aufhebt und ergänzt, können weitere Erkenntnisse gewonnen werden. So gibt es nun eine Möglichkeit, schwer lösliche sowie Membranproteine elektrophoretisch und massenspektrometrisch zu erfassen [15].

Mit der 2-DE ist es möglich, Isoformen von Proteinen in Form mehrerer Spots auf einem Gel oder bei Gelen verschiedener Fraktionen desselben Organs zu finden, deren möglicherweise unterschiedlich ausgeprägte differentielle Expression auf eine Beteiligung posttranslativaler Mechanismen an deren Ausprägung hindeuten.

### 4.6.3 Vergleich mit anderen Methoden

Die mit Hilfe der 2-DE gefundenen Proteinveränderungen sind, wie die vorliegende Arbeit zeigt, sehr zahlreich und bieten sich an, in weiteren Untersuchungen mittels anderer Methoden einer Quantifizierung unterzogen zu werden. Neue Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der Massenspektrometrie bieten hier gute Ansätze. Konnten die gefundenen Unterschiede bislang massenspektrometrisch nur qualitativ bewertet werden, so kann man sie heute mittels neuester massenspektrometrischer Techniken auch quantifizieren [143, 5, 189, 84]: Mit dem sogenannten »Isotope-Coded Protein Labeling« (ICPL) sowie dem »Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture« (SILAC). Zum Einsatz kommen dabei Isotope, welche die analysierten Peptide im Massenspektrum aufgrund



ihrer durch die Markierung leicht veränderten Masse leicht versetzt erscheinen lassen. Der Einsatz unterschiedlicher Isotope erlaubt es, die zu vergleichenden Proben nach der Isotopenmarkierung sehr früh zu vereinen und dann als eine Probe weiter zu behandeln. Neben dem Vorteil der Reduktion versuchsbedingter Schwankungen auf ein Minimum können die Peakhöhen der analysierten Proteine und Peptide verglichen und zur Quantifizierung der Proteinintensitätsänderung herangezogen werden.

## 4.7 Ausblick

Auch wenn eine einzelne Proteinexpressionsänderung für sich genommen nach bisherigen Erkenntnissen kein spezifischer Hinweis für die Scrapie-Infektion zu sein vermag, so kann doch eine Gruppe von Proteinen mit ihren individuellen Veränderungen – gemeinsam als Set – möglicherweise spezifische Markerfunktion haben. Auf jeden Fall bieten die Ergebnisse Anhaltspunkte für weitere, spezifische Analysen einzelner Proteine oder einer Gruppe von Proteinen und deren Bedeutung für die Infektion und den Krankheitsverlauf.

### 4.7.1 Genauere Betrachtung einzelner Proteine

Die vorliegende Arbeit deutet auf eine Reihe interessanter Proteine im Zusammenhang mit der Scrapie-Infektion hin. Besonders attraktive Kandidaten sollten eingehender in diesem Mausmodell und auch mittels anderer Ansätze untersucht werden. Eventuelle Isoformen, die in dieser Studie nicht aufgefallen sind, können so möglicherweise erkannt und bewertet werden.

Besonders interessant für genauere Betrachtungen scheinen die heterogenen nukleären Ribonukleoproteine zu sein, welche insbesondere in der Milz im Zuge der Scrapie-Infektion vielfach in ihrer Expression verändert sind (siehe Abschnitt 4.1.2.1). Insbesondere die Interaktion des PrP<sup>C</sup> mit einem Vertreter dieser Gruppe von Proteinen [175] macht sie für die Untersuchung vor allem präklinischer und dort sehr kurz nach der Erreger-Applikation liegender Zeitpunkte interessant.

Die Störung des Proteasomsystems durch Dysregulation verschiedener Proteasomuntereinheiten in der Milz (Abschnitt 4.1.2.2) näher zu untersuchen, könnte Hinweise auf direkte Auswirkungen der PrP<sup>Sc</sup>-Akkumulation auf das Abbausystem fehlerhafter und alter Proteine geben und möglicherweise Aufschluss über Primär- und Sekundäreffekte in diesem Zusammenhang liefern.

Der Eingriff in Zellkommunikation und Signaltransduktion betrifft sowohl das Gehirn als auch die Milz des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mausmodells (Abschnitt 4.4). Ein solcher Eingriff hat das Potential, systemische Auswirkungen auf den gesamten Organismus zu haben, wofür auch der schlechte Allgemeinzustand der Tiere gegen Ende der Infektion im terminalen Stadium spricht. Sowohl die in dieser Arbeit verändert exprimiert gefundenen Proteine als auch weitere, nicht gefundene Proteine aus der Klasse der Zellkommunikation und Signaltransduktion scheinen vielversprechend zu sein, um weitere detaillierte Einblicke in die Krankheitsprogression und die Zusammenhänge zwischen den Veränderungen und den auftretenden Symptomen zu erhalten.

Insgesamt sollten auch in der vorliegenden Arbeit nicht explizit verändert gefundene Proteine untersucht werden, die aber nahe verwandt sind mit diesen oder funktionelle

Ähnlichkeiten aufweisen. Vielfach vermögen Zellen gewisse Funktionen zu kompensieren, wenn sie beeinträchtigt werden oder ausfallen, so dass die alleinige Expressionsänderung eines Proteins noch nichts über die Änderung der Gesamtfunktion aussagt.

### 4.7.2 Identifizierung weiterer Proteinspots

In in dieser Screeningstudie werden relativ strenge Kriterien angelegt, damit ein Spot überhaupt weiter untersucht wird, daher ist es wahrscheinlich, dass eine Reihe interessanter Proteine noch nicht erfasst werden konnte. Dazu mögen sowohl bereits bekannte Proteine zählen, die als Marker- oder Kontrollproteine der Erkrankung dienen können, als auch im Zusammenhang mit einer Prioninfektion noch unbekannte Proteine. So ist bislang nur ein Teil der differentiell veränderten Proteinspots überhaupt mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert. Das nächstliegende Interesse wäre also sicherlich, die noch nicht eindeutig identifizierten und als Gemische oder Doppelspots vermerkten Kandidaten weiteren massenspektrometrischen Analysen zu unterziehen. Danach sollten die aufgrund der strengen Kriterien in dieser Arbeit nicht weiterverfolgten Spots massenspektrometrisch analysiert werden, um möglicherweise weitere Isoformen von bereits identifizierten Proteinen und auch neue Kandidaten für weitere Untersuchungen zu erkennen. Des Weiteren wäre eine computergestützte Analyse der Intensitätsänderungen wünschenswert.

### 4.7.3 Analyse der frühen Stadien

Die Untersuchung vom terminalen bzw. letzten entnommenen Stadium ausgehend nach vorne unter ausschließlicher Beachtung der im spätesten Stadium gefundenen Unterschiede ist nur ein möglicher Weg und beinhaltet den Verlust jener differentiell exprimierten Spots, die in früheren Infektionsphasen vorhanden sind und im Verlauf der Erkrankung zu schwach werden, um Beachtung zu erhalten oder gar gänzlich verschwinden (siehe auch Brown 2005 [21]). Eine von den bisherigen Ergebnissen unabhängige Auswertung der bereits vorhandenen Gele im Hinblick auf diese möglicherweise nur früh zu findenden Intensitätsänderungen (oder auch Positionsvarianten) ist ein weiterer interessanter Aspekt, den zu verfolgen lohnenswert erscheint. Auf diese Weise könnte auch ein Überblick darüber gewonnen werden, ob und inwiefern sich die Gesamtzahl der veränderten Proteinspots zwischen den Stadien unterscheidet.

Betrachtet man zudem die Veränderungen sehr kurz nach der Infektion im Vergleich zu Mock-Kontrollen (mit nicht-infektiösem Material beimpfte Kontrolltiere), könnte auch die Frage nach primären und nachgeordneten Effekten weiterverfolgt werden.

### 4.7.4 Vergleich mit anderen Modellen

Eine vergleichende Untersuchung verschiedener Erregerstämme kann möglicherweise weiteren Aufschluss bezüglich spezifischer oder globaler Proteinleveländerungen während der Infektion geben.

#### 4.7.5 Auffinden von Proteinen geringerer Konzentration

Eine Gewebesubfraktionierung vor der Proteinextraktion durchzuführen, kann einen weiteren Erkenntnisgewinn bringen. Gerade in einem so heterogen ausgeprägten Organ wie dem Gehirn mit seinen vielen unterschiedlichen Arealen herrscht eine starke Zelldifferenzierung und damit eine sehr variable Ausprägung der Proteinzusammensetzung. So werden einige Proteine möglicherweise in nur wenigen Zelltypen oder Hirnarealen exprimiert. Bei der Untersuchung des gesamten Organes besteht für diese Proteine die Gefahr, dass ihr Gehalt unter die Nachweisgrenze sinkt und Veränderungen in ihrer Expression daher nicht nachvollzogen werden können. Auch im Hinblick auf die auf einige Hirnregionen beschränkte oder in einigen Teilen besonders ausgeprägte Veränderung des Gewebes infolge der Prioninfektion kann eine Subfraktionierung weitere Einblicke in das Geschehen der betroffenen Bereiche bieten, so zum Beispiel beim  $\alpha$ -B-Crystallin (siehe Abschnitt 4.1.1.3).

#### 4.7.6 Einfluss des Prion-Proteins: Knockout-Mäuse

Ebenfalls interessante Einblicke vermag eine Untersuchung von PrP-Knockout-Mäusen mittels der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese zu liefern. Solche Tiere werden bereits seit einiger Zeit in Studien zur Prionausbreitung eingesetzt [36, 37, 185, 190, 183]. Ein Vergleich der durch den Verlust des zellulären Prion-Proteins in ihrer differentiellen Expression veränderten Spots und Proteine mit denen in dieser Studie und eventuellen weiterführenden Untersuchungen gefundenen Kandidaten könnte wichtige Erkenntnisse bringen, welche Proteine durch den Entzug von PrP<sup>C</sup> in ihrer Expression beeinträchtigt werden und welche Veränderungen erst durch die Anwesenheit von PrP<sup>Sc</sup>, Neurodegeneration und Proteinaggregation hervorgerufen werden.

#### 4.7.7 Gewebe ohne nachweisbaren Erreger

Sowohl in der Milz als Teil des lymphoretikulären Systems, das maßgeblich an der Erregerausbreitung beteiligt ist, als auch im Gehirn ist PrP<sup>Sc</sup> nachweisbar. Eine Untersuchung von Gewebe ohne nachweisbares PrP<sup>Sc</sup> vermag möglicherweise interessante Ergebnisse zu liefern. So zeigte Zabel [195] eine starke Erniedrigung der Expression der Major Urinary Proteins (MUPs) in der Leber eines Mausmodells für Chorea Huntington, was eine Einflussnahme der Erkrankung auf Organe außerhalb des direkt durch die Krankheit betroffenen Gewebes Gehirn demonstriert. Auch für eine Prion-Erkrankung ist ein Eingriff in den Proteinhaushalt abseits der Gewebe des Infektionsweges denkbar. Eine Untersuchung der Proteinlevel solcher Gewebe bietet interessante Perspektiven.

Die Abgrenzung der Erkrankungen und Subformen (z. B. durch verschiedene Erregerstämme bei Scrapie und BSE) voneinander bleibt ohne direkten Erregernachweis und zu Lebzeiten der Infizierten wohl weiterhin schwierig. Auch die vorliegende Arbeit liefert keine eindeutige Markerkombination von Proteinen, die insbesondere auch außerhalb des ZNS vorkommen und damit vor Eintreten des Todes zugänglich wären. Wohl aber bieten die Ergebnisse der vorliegenden Studie Anhaltspunkte und Grundlagen für weitere Forschungen, welche möglicherweise zu einer nutzbaren Markerkombination zum (spezifischen) Infektionsnachweis führen können.



## 5 Zusammenfassung

Die als Rinderseuche BSE bekannte Bovine Spongiforme Enzephalopathie zählt zu einer Gruppe neurodegenerativer Krankheiten, den Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE). Dazu gehört auch die schon lange bei Schafen und Ziegen bekannte Traberkrankheit, auch Scrapie genannt. Mit diesen von Stanley Prusiner einer neuartigen Klasse zugeordneten Erregern – Prionen – infizierte Mäuse dienen als Modellorganismen für vielfältige Studien.

In dieser Arbeit werden mit dem Scapiestamm 139A infizierte C57Bl/6-Mäuse mit den bisher noch wenig in der Erforschung der Prionerkrankungen eingesetzten Methoden der Proteomforschung analysiert. Die sensitive Extraktion der in Milz und Gehirn enthaltenen Proteine und die sich daran anschließende hoch auflösende zweidimensionale Gel-Elektrophorese erlaubt die Auftrennung mehrerer Tausend Proteinspots auf einem Gel. Der Vergleich der aus infizierten Tieren gewonnenen Proben mit denen altersangepasster Mock-Kontrolltiere ergibt eine große Zahl meist hochexprimierter Proteinspots.

Eine massenspektrometrische Analyse bestätigt einige bereits im Zusammenhang mit TSE bekannte Proteine, wie z. B. das saure Gliafaserprotein (GFAP) im Gehirn. Es werden aber auch Proteine identifiziert, die im Zusammenhang mit Scrapie oder TSE im Allgemeinen nicht in Verbindung gebracht werden, z. B.  $\alpha$ -B-Crystallin. Darüber hinaus erkennt man die Beeinträchtigung ganzer Gruppen von Proteinen, wie z. B. den heterogenen nukleären Ribonukleoproteinen in der Milz. Auch die bereits im Zusammenhang mit TSE bekannten Anzeichen für oxidativen Stress bestätigen einige Proteinveränderungen der vorliegenden Studie. Störungen im Haushalt der Zytoskelett-Proteine und ein Eingriff in Zellkommunikation und Signaltransduktion werden ebenfalls von einer Gruppe verändert exprimierter Proteine nahegelegt.

Die veränderte Expression nicht nur weniger Proteine, sondern ganzer Gruppen zum Teil miteinander interagierender Proteine (z. B. bei den Zytoskelett-Proteinen) legt den Schluss nahe, dass im Zuge der Scrapie-Infektion ganze Stoffwechselwege beeinträchtigt werden. Da diese allerdings keine in sich geschlossenen Systeme sind, sondern ihrerseits mit weiteren metabolischen Wegen kooperieren und korrespondieren, haben Änderungen in einem Bereich der Zelle Auswirkungen auf ganz andere Bereiche des Zellstoffwechsels.

Die Analyse mehrerer Zeitpunkte erlaubt eine Einordnung der durch die Infektion hervorgerufenen Proteinveränderungen in Bezug auf das infektiöse Agens. Dazu bietet die zweidimensionale Gel-Elektrophorese zusammen mit ihren angrenzenden Methoden eine gute Basis für weitere Untersuchungen. Gemeinsam mit Alternativmethoden stehen gute Mittel zur Verfügung, um Scrapie- und ganz allgemein Prioninfektionen eingehend zu untersuchen und interessante neue Erkenntnisse zu gewinnen.

Nach wie vor sind TSE noch nicht hinreichend verstanden. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zusätzliche Informationen über den Krankheitsverlauf und involvierte Mechanismen zu erhalten. Die Erkenntnisse dieser Screeningstudie zu Proteinveränderungen können als Anhaltspunkte für gezielte Forschungsansätze dienen, um die Störung der umfangreichen Proteinnetzwerke zu verstehen, welche die Prioninfektion auslöst.



## 6 Summary

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) belong to a group of neurodegenerative disorders which includes the well known bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle. Another representative is the long known Scrapie in sheep and goats. Stanley Prusiner postulated a new class of pathogenic agents, called prions, and mice inoculated with these infectious agents are used as model organisms in various studies.

The aim of this work is to investigate spleen and brain of C57Bl/6 mice, infected with scrapie strand 139A, utilising proteomics approaches not yet frequently used in prion research. Sensitive extraction of tissue proteins, followed by high resolution two-dimensional gel-electrophoresis (2-DE) is suitable to separate thousands of protein spots in a single gel. Comparison of samples from infected mice against age-matched mock-controls leads to the detection of many mostly overexpressed protein spots.

Mass spectrometric analysis confirms some already known proteins connected to TSE, for example the glial fibrillary acidic protein in brain (GFAP). However, some proteins (such as  $\alpha$ -B-Crystallin) were identified which are not yet associated with scrapie or with TSE in general. Furthermore an impairment of whole protein groups can be seen, as heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in the spleen. Signs of oxidative stress, already known to be associated with TSE, are further confirmed in this study by changes in concentration of some of the related proteins. The upset of cytoskeletal proteins as well as proteins involved in cell communication and signal transduction is suggested by some altered protein expressions.

Altered expression of not just a few proteins, but whole groups of partially interacting proteins (such as cytoskeletal proteins) leads to the conclusion of interference of whole metabolic pathways caused by the scrapie infection. These pathways are not closed systems, but cooperate and correspond with other pathways, thus leading to changes in other parts of the cell and its metabolism.

Analysis of several points in time allows a subsumption of the caused protein changes in relation to the infectious agent. 2-DE and related methods form a good basis for further investigations. This, combined with alternative methods, forms a useful tool in investigating scrapie, as well as prion infections in general, and gaining interesting new insight.

There is still plenty to discover concerning transmissible spongiform encephalopathy, for the diseases are yet not completely understood. Further investigations are needed to obtain additional information concerning disease progress and involved mechanisms. The findings of this screening study relating to protein changes can be used as starting point of specific research to understand the interference of extensive protein networks causing prion infection.





## Literaturverzeichnis

- [1] A. Aguzzi, M. Glatzel, F. Montrasio, M. Prinz, and F. L. Heppner. Interventional strategies against prion diseases. *Nat Rev Neurosci*, 2(10):745–9, October 2001.
- [2] A. Aguzzi and F. L. Heppner. Pathogenesis of prion diseases: a progress report. *Cell Death Differ*, 7(10):889–902, October 2000.
- [3] A. Alban, S. O. David, L. Bjorkesten, C. Andersson, E. Sloge, S. Lewis, and I. Currie. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*, 3(1):36–44, January 2003.
- [4] E. Baldauf, M. Beekes, and H. Diringer. Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol*, 78 ( Pt 5):1187–97, May 1997.
- [5] Marcus Bantscheff, Markus Schirle, Gavain Sweetman, Jens Rick, and Bernhard Kuster. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem*, 389(4):1017–1031, Oct 2007.
- [6] K. Basler, B. Oesch, M. Scott, D. Westaway, M. Walchli, D. F. Groth, M. P. McKinley, S. B. Prusiner, and C. Weissmann. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, 46(3):417–28, Aug 1 1986.
- [7] G. P. Bates. BIOMEDICINE: One Misfolded Protein Allows Others to Sneak By. *Science*, 311(5766):1385–6, 2006.
- [8] M. Beekes, E. Baldauf, S. Cassens, H. Diringer, P. Keyes, A. C. Scott, G. A. Wells, P. Brown, C. J. Gibbs, Jr, and D. C. Gajdusek. Western blot mapping of disease-specific amyloid in various animal species and humans with transmissible spongiform encephalopathies using a high-yield purification method. *J Gen Virol*, 76 ( Pt 10):2567–76, October 1995.
- [9] M. Beekes, E. Baldauf, and H. Diringer. Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol*, 77 ( Pt 8):1925–34, August 1996.
- [10] M. Beekes and P. A. McBride. Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett*, 278(3):181–4, Jan 14 2000.
- [11] M. Beekes, P. A. McBride, and E. Baldauf. Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol*, 79 ( Pt 3):601–7, March 1998.

- [12] R. J. Benfante, R. D. Traub, K. A. Lim, J. Hooks, C. J. Gibbs, Jr, and D. C. Gajdusek. Immunological reactions in kuru. Attempts to demonstrate serological relationships between kuru and other known infectious agents. *Am J Trop Med Hyg*, 23(3):476–88, May 1974.
- [13] R. A. Bessen, D. A. Kocisko, G. J. Raymond, S. Nandan, P. T. Lansbury, and B. Caughey. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature*, 375(6533):698–700, Jun 22 1995.
- [14] K. Beyer, J. I. Lao, M. Gómez, N. Riutort, P. Latorre, J. L. Mate, and A. Ariza. Alzheimer’s disease and the cystatin C gene polymorphism: an association study. *Neurosci Lett*, 315(1-2):17–20, Nov 23 2001.
- [15] A. Bierczynska-Krzysik, S. U. Kang, J. Silberring, and G. Lubec. Mass spectrometrical identification of brain proteins including highly insoluble and transmembrane proteins. *Neurochem Int*, 49(3):245–55, August 2006.
- [16] T. Blättler, S. Brandner, A. J. Raeber, M. A. Klein, T. Voigtländer, C. Weissmann, and A. Aguzzi. PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature*, 389(6646):69–73, Sep 4 1997.
- [17] N. Bons, N. Mestre-Frances, P. Belli, F. Cathala, D. C. Gajdusek, and P. Brown. Natural and experimental oral infection of nonhuman primates by bovine spongiform encephalopathy agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7):4046–51, Mar 30 1999.
- [18] S. Booth, C. Bowman, R. Baumgartner, B. Dolenko, G. Sorensen, C. Robertson, M. Coulthart, C. Phillipson, and R. Somorjai. Molecular classification of scrapie strains in mice using gene expression profiling. *Biochem Biophys Res Commun*, 325(4):1339–45, Dec 24 2004.
- [19] S. Booth, C. Bowman, R. Baumgartner, G. Sorensen, C. Robertson, M. Coulthart, C. Phillipson, and R. L. Somorjai. Identification of central nervous system genes involved in the host response to the scrapie agent during preclinical and clinical infection. *J Gen Virol*, 85(Pt 11):3459–71, November 2004.
- [20] S. Brandner, S. Isenmann, A. Raeber, M. Fischer, A. Sailer, Y. Kobayashi, S. Marino, C. Weissmann, and A. Aguzzi. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature*, 379(6563):339–43, Jan 25 1996.
- [21] A. R. Brown, S. Rebus, C. S. McKimmie, K. Robertson, A. Williams, and J. K. Fazakerley. Gene expression profiling of the preclinical scrapie-infected hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun*, 334(1):86–95, Aug 19 2005.
- [22] A. R. Brown, J. Webb, S. Rebus, A. Williams, and J. K. Fazakerley. Identification of up-regulated genes by array analysis in scrapie-infected mouse brains. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 30(5):555–67, October 2004.
- [23] D. R. Brown. Prion protein peptide neurotoxicity can be mediated by astrocytes. *J Neurochem*, 73(3):1105–13, September 1999.

- [24] D. R. Brown, J. W. Herms, B. Schmidt, and H. A. Kretzschmar. PrP and beta-amyloid fragments activate different neurotoxic mechanisms in cultured mouse cells. *Eur J Neurosci*, 9(6):1162–9, June 1997.
- [25] D. R. Brown, B. Schmidt, and H. A. Kretzschmar. A neurotoxic prion protein fragment enhances proliferation of microglia but not astrocytes in culture. *Glia*, 18(1):59–67, September 1996.
- [26] D. R. Brown, B. Schmidt, and H. A. Kretzschmar. A prion protein fragment primes type 1 astrocytes to proliferation signals from microglia. *Neurobiol Dis*, 4(6):410–22, April 1998.
- [27] D. R. Brown, B. S. Wong, F. Hafiz, C. Clive, S. J. Haswell, and I. M. Jones. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J*, 344 Pt 1:1–5, Nov 15 1999.
- [28] K. L. Brown, K. Stewart, D. L. Ritchie, N. A. Mabbott, A. Williams, H. Fraser, W. I. Morrison, and M. E. Bruce. Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat Med*, 5(11):1308–12, November 1999.
- [29] P. Brown. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Aust N Z J Med*, 20(5):633–5, October 1990.
- [30] P. Brown, P. P. Liberski, A. Wolff, and D. C. Gajdusek. Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360 degrees C: practical and theoretical implications. *J Infect Dis*, 161(3):467–72, March 1990.
- [31] P. Brown, M. Preece, J. P. Brandel, T. Sato, L. McShane, I. Zerr, A. Fletcher, R. G. Will, M. Pocchiari, N. R. Cashman, J. H. d'Aignaux, L. Cervenáková, J. Fradkin, L. B. Schonberger, and S. J. Collins. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. *Neurology*, 55(8):1075–81, Oct 24 2000.
- [32] P. Brown, R. G. Rohwer, and D. C. Gajdusek. Newer data on the inactivation of scrapie virus or Creutzfeldt-Jakob disease virus in brain tissue. *J Infect Dis*, 153(6):1145–8, June 1986.
- [33] M. Bruce, A. Chree, I. McConnell, J. Foster, G. Pearson, and H. Fraser. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 343(1306):405–11, Mar 29 1994.
- [34] M. E. Bruce and H. Fraser. Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 172:125–38, 1991.
- [35] M. E. Bruce, R. G. Will, J. W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttie, L. McCardle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, S. Cousens, H. Fraser, and C. J. Bostock. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 389(6650):498–501, Oct 2 1997.

- [36] H. Büeler, A. Aguzzi, A. Sailer, R. A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet, and C. Weissmann. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, 73(7):1339–47, Jul 2 1993.
- [37] H. Büeler, M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H. P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet, and C. Weissmann. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, 356(6370):577–582, Apr 1992.
- [38] H. Büeler, A. Raeber, A. Sailer, M. Fischer, A. Aguzzi, and C. Weissmann. High prion and PrPSc levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med*, 1(1):19–30, November 1994.
- [39] D. Burger and G. R. Hartsough. Encephalopathy of mink. II. Experimental and natural transmission. *J Infect Dis*, 115(4):393–399, Oct 1965.
- [40] I. L. Campbell, M. Eddleston, P. Kemper, M. B. Oldstone, and M. V. Hobbs. 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(4):2383–7, April 1994.
- [41] N. R. Cashman, R. Loertscher, J. Nalbantoglu, I. Shaw, R. J. Kascsak, D. C. Bolton, and P. E. Bendheim. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell*, 61(1):185–92, Apr 6 1990.
- [42] J. F. Chich, B. Schaeffer, A. P. Bouin, F. Mouthon, V. Labas, C. Larramendy, J. P. Deslys, and J. Grosclaude. Prion infection-impaired functional blocks identified by proteomics enlighten the targets and the curing pathways of an anti-prion drug. *Biochim Biophys Acta*, 1774(1):154–67, January 2007.
- [43] S. I. Choi, W. K. Ju, E. K. Choi, J. Kim, H. Z. Lea, R. I. Carp, H. M. Wisniewski, and Y. S. Kim. Mitochondrial dysfunction induced by oxidative stress in the brains of hamsters infected with the 263 K scrapie agent. *Acta Neuropathol (Berl)*, 96(3):279–86, September 1998.
- [44] J. Collinge, K. C. Sidle, J. Meads, J. Ironside, and A. F. Hill. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, 383(6602):685–90, Oct 24 1996.
- [45] S. C. Collis and R. H. Kimberlin. Further studies on changes in immunoglobulin G in the sera and CSF of Herdwick sheep with natural and experimental scrapie. *J Comp Pathol*, 93(2):331–8, April 1983.
- [46] F. C. Crawford, M. J. Freeman, J. A. Schinka, L. I. Abdullah, M. Gold, R. Hartman, K. Krivian, M. D. Morris, D. Richards, R. Duara, R. Anand, and M. J. Mullan. A polymorphism in the cystatin C gene is a novel risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology*, 55(6):763–8, Sep 26 2000.
- [47] H. G. Creutzfeld. Über eine eigenartige herdformige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Neurol Psychiatr*, 57:1–18, 1920.

- [48] R. C. Cutlip, J. M. Miller, R. E. Race, A. L. Jenny, J. B. Katz, H. D. Lehmkuhl, B. M. DeBey, and M. M. Robinson. Intracerebral transmission of scrapie to cattle. *J Infect Dis*, 169(4):814–20, April 1994.
- [49] F. Dandoy-Dron, F. Guillo, L. Benboudjema, J. P. Deslys, C. Lasmézas, D. Dormont, M. G. Tovey, and M. Dron. Gene expression in scrapie. Cloning of a new scrapie-responsive gene and the identification of increased levels of seven other mRNA transcripts. *J Biol Chem*, 273(13):7691–7, Mar 27 1998.
- [50] S. J. DeArmond, W. C. Mobley, D. L. DeMott, R. A. Barry, J. H. Beckstead, and S. B. Prusiner. Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection. *Neurology*, 37(8):1271–80, August 1987.
- [51] S. J. DeArmond, S. L. Yang, A. Lee, R. Bowler, A. Taraboulos, D. Groth, and S. B. Prusiner. Three scrapie prion isolates exhibit different accumulation patterns of the prion protein scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(14):6449–53, Jul 15 1993.
- [52] A. Deng, M. C. Irizarry, R. M. Nitsch, J. H. Growdon, and G. W. Rebeck. Elevation of cystatin C in susceptible neurons in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 159(3):1061–8, September 2001.
- [53] A. G. Dickinson. Host-pathogen interactions in scrapie. *Genetics*, 79 Suppl:387–95, June 1975.
- [54] A. G. Dickinson and G. W. Outram. Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Found Symp*, 135:63–83, 1988.
- [55] J. Diedrich, S. Wietgreffe, M. Zupancic, K. Staskus, E. Retzel, A. T. Haase, and R. Race. The molecular pathogenesis of astrogliosis in scrapie and Alzheimer's disease. *Microb Pathog*, 2(6):435–42, June 1987.
- [56] J. F. Diedrich, P. E. Bendheim, Y. S. Kim, R. I. Carp, and A. T. Haase. Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(2):375–9, Jan 15 1991.
- [57] J. F. Diedrich, H. Minnigan, R. I. Carp, J. N. Whitaker, R. Race, W. Frey II, and A. T. Haase. Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J Virol*, 65(9):4759–68, September 1991.
- [58] H. Diringer. Durchbrechen von Speziesbarrieren mit unkonventionellen Viren. *Bundesgesundheitsblatt*, 33:435–440, 1990.
- [59] H. Diringer. Virus-induced amyloidoses. *Behring Inst Mitt*, (89):146–52., July 1991.
- [60] H. Diringer, M. Beekes, M. Özel, D. Simon, I. Queck, F. Cardone, M. Pocchiari, and J. W. Ironside. Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size. *Intervirology*, 40(4):238–46, 1997.

- [61] N. S. Doherty, B. H. Littman, K. Reilly, A. C. Swindell, J. M. Buss, and N. L. Anderson. Analysis of changes in acute-phase plasma proteins in an acute inflammatory response and in rheumatoid arthritis using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 19(2):355–63, February 1998.
- [62] J. R. Duguid, R. G. Rohwer, and B. Seed. Isolation of cDNAs of scrapie-modulated RNAs by subtractive hybridization of a cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(15):5738–42, August 1988.
- [63] C. M. Eklund, R. C. Kennedy, and W. J. Hadlow. Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse. *J Infect Dis*, 117(1):15–22, February 1967.
- [64] D. W. Fairbairn, K. G. Carnahan, R. N. Thwaites, R. V. Grigsby, G. R. Holyoak, and K. L. O'Neill. Detection of apoptosis induced DNA cleavage in scrapie-infected sheep brain. *FEMS Microbiol Lett*, 115(2-3):341–6, Jan 15 1994.
- [65] I. Ferrer, R. Rivera, R. Blanco, and E. Martí. Expression of proteins linked to exocytosis and neurotransmission in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Dis*, 6(2):92–100, April 1999.
- [66] U. Finckh, H. von der Kammer, J. Velden, T. Michel, B. Andresen, A. Deng, J. Zhang, T. Müller-Thomsen, K. Zuchowski, G. Menzer, U. Mann, A. Papassotiropoulos, R. Heun, J. Zurdel, F. Holst, L. Benussi, G. Stoppe, J. Reiss, A. R. Miserez, H. B. Staehelin, G. W. Rebeck, B. T. Hyman, G. Binetti, C. Hock, J. H. Growdon, and R. M. Nitsch. Genetic association of a cystatin C gene polymorphism with late-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 57(11):1579–83, November 2000.
- [67] G. Forloni, R. Del Bo, N. Angeretti, R. Chiesa, S. Smioldo, R. Doni, E. Ghibaudi, M. Salmona, M. Porro, L. Verga, and et al. A neurotoxic prion protein fragment induces rat astroglial proliferation and hypertrophy. *Eur J Neurosci*, 6(9):1415–22, Sep 1 1994.
- [68] H. Fraser, K. L. Brown, K. Stewart, I. McConnell, P. McBride, and A. Williams. Replication of scrapie in spleens of SCID mice follows reconstitution with wild-type mouse bone marrow. *J Gen Virol*, 77 ( Pt 8):1935–40, August 1996.
- [69] H. Fraser and A. G. Dickinson. Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen. *Nature*, 226(244):462–3, May 2 1970.
- [70] H. Fraser and A. G. Dickinson. Studies of the lymphoreticular system in the pathogenesis of scrapie: the role of spleen and thymus. *J Comp Pathol*, 88(4):563–73, October 1978.
- [71] M. Freixes, A. Rodríguez, E. Dalfó, and I. Ferrer. Oxidation, glycooxidation, lipoxidation, nitration, and responses to oxidative stress in the cerebral cortex in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Aging*, 27(12):1807–15, December 2006.
- [72] C. Gabus, S. Auxilien, C. Péchoux, D. Dormont, W. Swietnicki, M. Morillas, W. Surowicz, P. Nandi, and J. L. Darlix. The prion protein has DNA strand transfer

- properties similar to retroviral nucleocapsid protein. *J Mol Biol*, 307(4):1011–21, Apr 6 2001.
- [73] D. C. Gajdusek and V. Zigas. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med*, 257(20):974–8, Nov 14 1957.
- [74] J. Gerstmann, E. Sträussler, and I. Scheinker. Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems und zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z. Neurol.*, 154:736–762, 1936.
- [75] Patrick Giavalisco. *Proteomanalyse von Pflanzen*. PhD thesis, Fachbereich Biologie Chemie Pharmazie, Freie Universität Berlin, 2003.
- [76] C. J. Gibbs, Jr, D. C. Gajdusek, and R. Latarjet. Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(12):6268–70, December 1978.
- [77] A. Giese, D. R. Brown, M. H. Groschup, C. Feldmann, I. Haist, and H. A. Kretzschmar. Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol*, 8(3):449–57, July 1998.
- [78] A. Giese, M. H. Groschup, B. Hess, and H. A. Kretzschmar. Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol*, 5(3):213–21, July 1995.
- [79] R. Glockshuber. Die biophysikalische Charakterisierung des zellulären Prion-Proteins PrPC. In B. Hörnlimann, D. Riesner, and H. Kretzschmar, editors, *Prionen und Prionkrankheiten*, pages 61–8. De Gruyter, Berlin, 2001.
- [80] W. Goldmann, N. Hunter, G. Smith, J. Foster, and J. Hope. PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J Gen Virol*, 75 ( Pt 5):989–95, May 1994.
- [81] M. B. Graeber, W. J. Streit, and G. W. Kreutzberg. Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J Neurosci Res*, 21(1):18–24, September 1988.
- [82] K. U. Grathwohl, M. Horiuchi, N. Ishiguro, and M. Shinagawa. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of PrP<sup>Sc</sup> in crude tissue extracts from scrapie-affected mice. *J Virol Methods*, 64(2):205–16, March 1997.
- [83] J. S. Griffith. Self-replication and scrapie. *Nature*, 215(105):1043–4, Sep 2 1967.
- [84] Matthias Gstaiger and Ruedi Aebersold. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nat Rev Genet*, 10(9):617–627, Sep 2009.
- [85] E. Hansson and L. Rönnbäck. Glial neuronal signaling in the central nervous system. *FASEB J*, 17(3):341–8, March 2003.

- [86] G. R. Hartsough and D. Burger. Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis*, 115(4):387–392, Oct 1965.
- [87] H. Heukeshoven and R. Dernick. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6:103–112, 1985.
- [88] A. F. Hill, M. Antoniou, and J. Collinge. Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J Gen Virol*, 80 ( Pt 1):11–4, January 1999.
- [89] A. F. Hill, M. Desbruslais, S. Joiner, K. C. Sidle, I. Gowland, J. Collinge, L. J. Doey, and P. Lantos. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 389(6650):448–50, 526, Oct 2 1997.
- [90] A. F. Hill, S. Joiner, J. Linehan, M. Desbruslais, P. L. Lantos, and J. Collinge. Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(18):10248–53, Aug 29 2000.
- [91] Z. Huang, S. B. Prusiner, and F. E. Cohen. Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Fold Des*, 1(1):13–9, 1996.
- [92] H. Ito, K. Kamei, I. Iwamoto, Y. Inaguma, D. Nohara, and K. Kato. Phosphorylation-induced change of the oligomerization state of alpha B-crystallin. *J Biol Chem*, 276(7):5346–52, Feb 16 2001.
- [93] A. M. Jakob. Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (Spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Dtsch. Z. Nervenheilklinik*, 70:132–146, 1921.
- [94] M. Jeffrey, J. R. Fraser, W. G. Halliday, N. Fowler, C. M. Goodsir, and D. A. Brown. Early unsuspected neuron and axon terminal loss in scrapie-infected mice revealed by morphometry and immunocytochemistry. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 21(1):41–9, February 1995.
- [95] M. Jeffrey, C. M. Goodsir, M. E. Bruce, P. A. McBride, J. R. Scott, and W. G. Halliday. Infection specific prion protein (PrP) accumulates on neuronal plasmalemma in scrapie infected mice. *Neurosci Lett*, 147(1):106–9, Nov 23 1992.
- [96] M. Jeffrey, S. Martin, J. Barr, A. Chong, and J. R. Fraser. Onset of accumulation of PrP<sup>res</sup> in murine ME7 scrapie in relation to pathological and PrP immunohistochemical changes. *J Comp Pathol*, 124(1):20–8, January 2001.
- [97] W. K. Ju, K. J. Park, E. K. Choi, J. Kim, R. I. Carp, H. M. Wisniewski, and Y. S. Kim. Expression of inducible nitric oxide synthase in the brains of scrapie-infected mice. *J Neurovirol*, 4(4):445–50, August 1998.
- [98] P. R. Jungblut and R. Seifert. Analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis of differentiation-dependent alterations in cytosolic protein pattern of HL-60 leukemic cells. *J Biochem Biophys Methods*, 21(1):47–58, June 1990.



- [99] R. J. Kascsak, R. Rubenstein, P. A. Merz, R. I. Carp, N. K. Robakis, H. M. Wisniewski, and H. Diringer. Immunological comparison of scrapie-associated fibrils isolated from animals infected with four different scrapie strains. *J Virol*, 59(3):676–83, September 1986.
- [100] R. H. Kimberlin and C. Walker. Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. *J Gen Virol*, 34(2):295–304, February 1977.
- [101] R. H. Kimberlin and C. A. Walker. The role of the spleen in the neuroinvasion of scrapie in mice. *Virus Res*, 12(3):201–11, March 1989.
- [102] R. H. Kimberlin, C. A. Walker, G. C. Millson, D. M. Taylor, P. A. Robertson, A. H. Tomlinson, and A. G. Dickinson. Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrapie agent. Guidelines for Creutzfeldt-Jakob and related agents. *J Neurol Sci*, 59(3):355–69, June 1983.
- [103] R. H. Kimberlin and J. W. Wilesmith. Bovine spongiform encephalopathy. Epidemiology, low dose exposure and risks. *Ann N Y Acad Sci*, 724:210–20, Jun 6 1994.
- [104] D. T. Kingsbury, K. C. Kasper, D. P. Stites, J. D. Watson, R. N. Hogan, and S. B. Prusiner. Genetic control of scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *J Immunol*, 131(1):491–6, July 1983.
- [105] T. Kitamoto, T. Muramoto, S. Mohri, K. Doh-Ura, and J. Tateishi. Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol*, 65(11):6292–5, November 1991.
- [106] T. Kitamoto, R. W. Shin, K. Doh-ura, N. Tomokane, M. Miyazono, T. Muramoto, and J. Tateishi. Abnormal isoform of prion proteins accumulates in the synaptic structures of the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol*, 140(6):1285–94, June 1992.
- [107] M. A. Klein, R. Frigg, E. Flechsig, A. J. Raeber, U. Kalinke, H. Bluethmann, F. Bootz, M. Suter, R. M. Zinkernagel, and A. Aguzzi. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature*, 390(6661):687–90, Dec 18-25 1997.
- [108] M. A. Klein, P. S. Kaeser, P. Schwarz, H. Weyd, I. Xenarios, R. M. Zinkernagel, M. C. Carroll, J. S. Verbeek, M. Botto, M. J. Walport, H. Molina, U. Kalinke, H. Acha-Orbea, and A. Aguzzi. Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat Med*, 7(4):488–92, April 2001.
- [109] J. Klose. Fractionated extraction of total tissue proteins from mouse and human for 2-D electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 112:67–85, 1999.
- [110] J. Klose. Large-gel 2-D electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 112:147–72, 1999.
- [111] J. Klose and U. Kobalz. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*, 16(6):1034–59, June 1995.

- [112] Y. Koyama and J. E. Goldman. Formation of GFAP cytoplasmic inclusions in astrocytes and their disaggregation by alphaB-crystallin. *Am J Pathol*, 154(5):1563–72, May 1999.
- [113] H. A. Kretzschmar, S. B. Prusiner, L. E. Stowring, and S. J. DeArmond. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol*, 122(1):1–5, January 1986.
- [114] G. W. Kreutzberg. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19(8):312–8, August 1996.
- [115] T. Kuczius, I. Haist, and M. H. Groschup. Molecular analysis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie strain variation. *J Infect Dis*, 178(3):693–9, September 1998.
- [116] C. Kurschner and J. I. Morgan. The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res Mol Brain Res*, 30(1):165–8, May 1995.
- [117] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–5, Aug 15 1970.
- [118] C. I. Lasmézas, J. P. Deslys, R. Demaimay, K. T. Adjou, F. Lamoury, D. Dormont, O. Robain, J. Ironside, and J. J. Hauw. BSE transmission to macaques. *Nature*, 381(6585):743–4, Jun 27 1996.
- [119] C. I. Lasmézas, J. P. Deslys, O. Robain, A. Jaegly, V. Beringue, J. M. Peyrin, J. G. Fournier, J. J. Hauw, J. Rossier, and D. Dormont. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*, 275(5298):402–5, Jan 17 1997.
- [120] K. J. Lee, A. Panzera, D. Rogawski, L. E. Greene, and E. Eisenberg. Cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) protects neuronal cells from the effect of huntingtin aggregation. *J Cell Sci*, 120(Pt 15):2663–71, Aug 1 2007.
- [121] M. M. Leggett, J. Dukes, and H. M. Pirie. A spongiform encephalopathy in a cat. *Vet Rec*, 127(24):586–588, Dec 1990.
- [122] H. Lewicki, A. Tishon, D. Homann, H. Mazarguil, F. Laval, V. C. Asensio, I. L. Campbell, S. DeArmond, B. Coon, C. Teng, J. E. Gairin, and M. B. Oldstone. T cells infiltrate the brain in murine and human transmissible spongiform encephalopathies. *J Virol*, 77(6):3799–808, March 2003.
- [123] P. P. Liberski. Astrocytic reaction in experimental scrapie in hamsters. *J Comp Pathol*, 97(1):73–8, January 1987.
- [124] S. Luhn, M. Berth, M. Hecker, and J. Bernhardt. Using standard positions and image fusion to create proteome maps from collections of two-dimensional gel electrophoresis images. *Proteomics*, 3(7):1117–27, July 2003.

- [125] J. Ma and S. Lindquist. Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(26):14955–60, Dec 18 2001.
- [126] N. A. Mabbott, M. E. Bruce, M. Botto, M. J. Walport, and M. B. Pepys. Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nat Med*, 7(4):485–7, April 2001.
- [127] N. A. Mabbott, A. Williams, C. F. Farquhar, M. Pasparakis, G. Kollias, and M. E. Bruce. Tumor necrosis factor alpha-deficient, but not interleukin-6-deficient, mice resist peripheral infection with scrapie. *J Virol*, 74(7):3338–44, April 2000.
- [128] V. Manetto, R. Medori, P. Cortelli, P. Montagna, P. Tinuper, A. Baruzzi, G. Rancurel, J. J. Hauw, J. J. Vanderhaeghen, and P. Mailleux and. Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of five new cases. *Neurology*, 42(2):312–9, February 1992.
- [129] L. Manuelidis, T. Sklaviadis, A. Akowitz, and W. Fritch. Viral particles are required for infection in neurodegenerative Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(11):5124–8, May 23 1995.
- [130] S. F. Martin, I. Burón, J. C. Espinosa, J. Castilla, J. M. Villalba, and J. M. Torres. Coenzyme Q and protein/lipid oxidation in a BSE-infected transgenic mouse model. *Free Radic Biol Med*, 42(11):1723–9, Jun 1 2007.
- [131] T. Martínez and A. Pascual. Identification of genes differentially expressed in SH-SY5Y neuroblastoma cells exposed to the prion peptide 106-126. *Eur J Neurosci*, 26(1):51–9, July 2007.
- [132] P. A. McBride, P. Eikelenboom, G. Kraal, H. Fraser, and M. E. Bruce. PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice. *J Pathol*, 168(4):413–8, December 1992.
- [133] J. P. McGowan. Scrapie in sheep. *Scottish J. Agric.*, 5:365–375, 1922.
- [134] A. B. Meriin and M. Y. Sherman. Role of molecular chaperones in neurodegenerative disorders. *Int J Hyperthermia*, 21(5):403–19, August 2005.
- [135] R. K. Meyer, M. P. McKinley, K. A. Bowman, M. B. Braunfeld, R. A. Barry, and S. B. Prusiner. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(8):2310–4, April 1986.
- [136] Michael W Miller and Elizabeth S Williams. Prion disease: horizontal prion transmission in mule deer. *Nature*, 425(6953):35–36, Sep 2003.
- [137] T. Miura, A. Hori-i, H. Mototani, and H. Takeuchi. Raman spectroscopic study on the copper(II) binding mode of prion octapeptide and its pH dependence. *Biochemistry*, 38(35):11560–9, Aug 31 1999.

- [138] F. Montrasio, R. Frigg, M. Glatzel, M. A. Klein, F. Mackay, A. Aguzzi, and C. Weissmann. Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science*, 288(5469):1257–9, May 19 2000.
- [139] M. Moser, R. J. Colello, U. Pott, and B. Oesch. Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron*, 14(3):509–17, March 1995.
- [140] L. E. Munoz, S. Franz, F. Pausch, B. Fürnrohr, A. Sheriff, B. Vogt, P. M. Kern, W. Baum, C. Stach, D. von Laer, B. Brachvogel, E. Poschl, M. Herrmann, and U. S. Gaipl. The influence on the immunomodulatory effects of dying and dead cells of Annexin V. *J Leukoc Biol*, 81(1):6–14, January 2007.
- [141] J. Nguyen, M. A. Baldwin, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. Prion protein peptides induce alpha-helix to beta-sheet conformational transitions. *Biochemistry*, 34(13):4186–92, Apr 4 1995.
- [142] B. Oesch, D. Westaway, M. Walchli, M. P. McKinley, S. B. Kent, R. Aebersold, R. A. Barry, P. Tempst, D. B. Teplow, and L. E. Hood and. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 40(4):735–46, April 1985.
- [143] Shao-En Ong and Matthias Mann. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol*, 1(5):252–262, Oct 2005.
- [144] K. M. Pan, M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(23):10962–6, Dec 1 1993.
- [145] S. K. Park, S. I. Choi, J. K. Jin, E. K. Choi, J. I. Kim, R. I. Carp, and Y. S. Kim. Differential expression of Bax and Bcl-2 in the brains of hamsters infected with 263K scrapie agent. *Neuroreport*, 11(8):1677–82, Jun 5 2000.
- [146] I. H. Pattison, M. N. Hoare, J. N. Jebbett, and W. A. Watson. Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Vet Rec*, 90(17):465–8, Apr 22 1972.
- [147] I. H. Pattison, M. N. Hoare, J. N. Jebbett, and W. A. Watson. Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Br Vet J*, 130(4):lxv–lxvii, Jul-Aug 1974.
- [148] M. Prinz, G. Huber, A. J. Macpherson, F. L. Heppner, M. Glatzel, H. P. Eugster, N. Wagner, and A. Aguzzi. Oral prion infection requires normal numbers of Peyer’s patches but not of enteric lymphocytes. *Am J Pathol*, 162(4):1103–11, April 2003.
- [149] M. Prinz, F. Montrasio, M. A. Klein, P. Schwarz, J. Priller, B. Odermatt, K. Pfeffer, and A. Aguzzi. Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(2):919–24, Jan 22 2002.
- [150] S. B. Prusiner. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216(4542):136–44, Apr 9 1982.

- [151] S. B. Prusiner. Molecular biology of prion diseases. *Science*, 252(5012):1515–22, Jun 14 1991.
- [152] S. B. Prusiner. Prion diseases and the BSE crisis. *Science*, 278(5336):245–51, Oct 10 1997.
- [153] S. B. Prusiner, D. F. Groth, M. P. McKinley, S. P. Cochran, K. A. Bowman, and K. C. Kasper. Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(7):4606–10, July 1981.
- [154] R. Riek, S. Hornemann, G. Wider, R. Glockshuber, and K. Wüthrich. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett*, 413(2):282–8, Aug 18 1997.
- [155] C. Riemer, I. Queck, D. Simon, R. Kurth, and M. Baier. Identification of upregulated genes in scrapie-infected brain tissue. *J Virol*, 74(21):10245–8, November 2000.
- [156] C. A. Rogers, P. Gasque, S. J. Piddlesden, N. Okada, V. M. Holers, and B. P. Morgan. Expression and function of membrane regulators of complement on rat astrocytes in culture. *Immunology*, 88(1):153–61, May 1996.
- [157] R. G. Rohwer. Virus like sensitivity of the scrapie agent to heat inactivation. *Science*, 223(4636):600–2, Feb 10 1984.
- [158] R. G. Rohwer. The scrapie agent: "a virus by any other name". *Curr Top Microbiol Immunol*, 172:195–232, 1991.
- [159] R. Rubenstein, P. A. Merz, R. J. Kascsak, C. L. Scalici, M. C. Papini, R. I. Carp, and R. H. Kimberlin. Scrapie-infected spleens: analysis of infectivity, scrapie-associated fibrils, and protease-resistant proteins. *J Infect Dis*, 164(1):29–35, July 1991.
- [160] J. Safar, P. P. Roller, D. C. Gajdusek, and C. J. Gibbs, Jr. Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem*, 268(27):20276–84, Sep 25 1993.
- [161] J. Safar, P. P. Roller, D. C. Gajdusek, and C. J. Gibbs, Jr. Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Protein Sci*, 2(12):2206–16, December 1993.
- [162] J. Safar, H. Wille, V. Itri, D. Groth, H. Serban, M. Torchia, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med*, 4(10):1157–65, October 1998.
- [163] A. Sailer, H. Büeler, M. Fischer, A. Aguzzi, and C. Weissmann. No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell*, 77(7):967–8, Jul 1 1994.
- [164] S. Sakaguchi, S. Katamine, K. Shigematsu, A. Nakatani, R. Moriuchi, N. Nishida, K. Kurokawa, R. Nakaoka, H. Sato, K. Jishage, J. Kuno, T. Noda, and T. Miyamoto. 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(12):7586–92, December 1995.

- [165] W. J. Schulz-Schaeffer. BSE und variante CJK: Von den Schwierigkeiten, ein neues Krankheitsprinzip zu etablieren. *Dtsch Med Wochenschr*, 127(7):344–6, Feb 15 2002.
- [166] D. Serban, A. Taraboulos, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins. *Neurology*, 40(1):110–7, January 1990.
- [167] P. J. Skinner, H. Abbassi, B. Chesebro, R. E. Race, C. Reilly, and A. T. Haase. Gene expression alterations in brains of mice infected with three strains of scrapie. *BMC Genomics*, 7:114, 2006.
- [168] Z. Smilansky. Automatic registration for images of two-dimensional protein gels. *Electrophoresis*, 22(9):1616–26, May 2001.
- [169] R. A. Somerville, A. Chong, O. U. Mulqueen, C. R. Birkett, S. C. Wood, and J. Hope. Biochemical typing of scrapie strains. *Nature*, 386(6625):564, Apr 10 1997.
- [170] R. A. Somerville, R. C. Oberthür, U. Havekost, F. MacDonald, D. M. Taylor, and A. G. Dickinson. Characterization of thermodynamic diversity between transmissible spongiform encephalopathy agent strains and its theoretical implications. *J Biol Chem*, 277(13):11084–9, Mar 29 2002.
- [171] C. Soto and G. P. Saborío. Prions: disease propagation and disease therapy by conformational transmission. *Trends Mol Med*, 7(3):109–14, March 2001.
- [172] J. Stöckel, J. Safar, A. C. Wallace, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry*, 37(20):7185–93, May 19 1998.
- [173] W. J. Streit. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, 40(2):133–9, November 2002.
- [174] W. J. Streit, M. B. Graeber, and G. W. Kreutzberg. Functional plasticity of microglia: a review. *Glia*, 1(5):301–7, 1988.
- [175] A. Strom, S. Diecke, G. Hunsmann, and A. W. Stuke. Identification of prion protein binding proteins by combined use of far-Western immunoblotting, two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 6(1):26–34, January 2006.
- [176] J. Tateishi, M. Koga, Y. Sato, and R. Mori. Properties of the transmissible agent derived from chronic spongiform encephalopathy. *Ann Neurol*, 7(4):390–1, April 1980.
- [177] D. M. Taylor and M. F. Diprose. The response of the 22A strain of scrapie agent to microwave irradiation compared with boiling. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 22(3):256–8, June 1996.
- [178] D. M. Taylor, I. McConnell, and K. Fernie. The effect of dry heat on the ME7 strain of mouse-passaged scrapie agent. *J Gen Virol*, 77 ( Pt 12):3161–4, December 1996.

- [179] E. M. Ullian, S. K. Sapperstein, K. S. Christopherson, and B. A. Barres. Control of synapse number by glia. *Science*, 291(5504):657–61, Jan 26 2001.
- [180] J. H. Viles, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, D. B. Goodin, P. E. Wright, and H. J. Dyson. Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5):2042–7, Mar 2 1999.
- [181] W. Walz. Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Prog Neurobiol*, 33(4):309–33, 1989.
- [182] C. Weissmann. A 'unified theory' of prion propagation. *Nature*, 352(6337):679–83, Aug 22 1991.
- [183] C. Weissmann and E. Flechsig. PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Br Med Bull*, 66:43–60, 2003.
- [184] G. A. Wells, A. C. Scott, C. T. Johnson, R. F. Gunning, R. D. Hancock, M. Jeffrey, M. Dawson, and R. Bradley. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*, 121(18):419–20, Oct 31 1987.
- [185] A. R. White, S. J. Collins, F. Maher, M. F. Jobling, L. R. Stewart, J. M. Thyer, K. Beyreuther, C. L. Masters, and R. Cappai. Prion protein-deficient neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen peroxide toxicity. *Am J Pathol*, 155(5):1723–30, November 1999.
- [186] A. Williams, P. J. Lucassen, D. Ritchie, and M. Bruce. PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Exp Neurol*, 144(2):433–8, April 1997.
- [187] A. E. Williams, L. J. Lawson, V. H. Perry, and H. Fraser. Characterization of the microglial response in murine scrapie. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 20(1):47–55, February 1994.
- [188] A. E. Williams, A. M. van Dam, W. K. Man-A-Hing, F. Berkenbosch, P. Eikelenboom, and H. Fraser. Cytokines, prostaglandins and lipocortin-1 are present in the brains of scrapie-infected mice. *Brain Res*, 654(2):200–6, Aug 22 1994.
- [189] Matthias Wilm. Quantitative proteomics in biological research. *Proteomics*, 9(20):4590–4605, Oct 2009.
- [190] B. S. Wong, T. Liu, R. Li, T. Pan, R. B. Petersen, M. A. Smith, P. Gambetti, G. Perry, J. C. Manson, D. R. Brown, and M. S. Sy. Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. *J Neurochem*, 76(2):565–72, January 2001.
- [191] F. Wopfner, G. Weidenhöfer, R. Schneider, A. von Brunn, S. Gilch, T. F. Schwarz, T. Werner, and H. M. Schätzl. Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol*, 289(5):1163–78, Jun 25 1999.

- [192] X. Ye, A. C. Scallet, R. J. Kascsak, and R. I. Carp. Astrocytosis and amyloid deposition in scrapie-infected hamsters. *Brain Res*, 809(2):277–87, Nov 2 1998.
- [193] Y. Yedidia, L. Horonchik, S. Tzaban, A. Yanai, and A. Taraboulos. Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *EMBO J*, 20(19):5383–91, Oct 1 2001.
- [194] S. W. Yun, M. Gerlach, P. Riederer, and M. A. Klein. Oxidative stress in the brain at early preclinical stages of mouse scrapie. *Exp Neurol*, 201(1):90–8, September 2006.
- [195] C. Zabel, D. C. Chamrad, J. Priller, B. Woodman, H. E. Meyer, G. P. Bates, and J. Klose. Alterations in the mouse and human proteome caused by Huntington’s disease. *Mol Cell Proteomics*, 1(5):366–75, May 2002.
- [196] C. Zabel, D. Sagi, A. M. Kaindl, N. Steireif, Y. Kläre, L. Mao, H. Peters, M. A. Wacker, R. Kleene, and J. Klose. Comparative proteomics in neurodegenerative and non-neurodegenerative diseases suggest nodal point proteins in regulatory networking. *J Proteome Res*, 5(8):1948–58, August 2006.



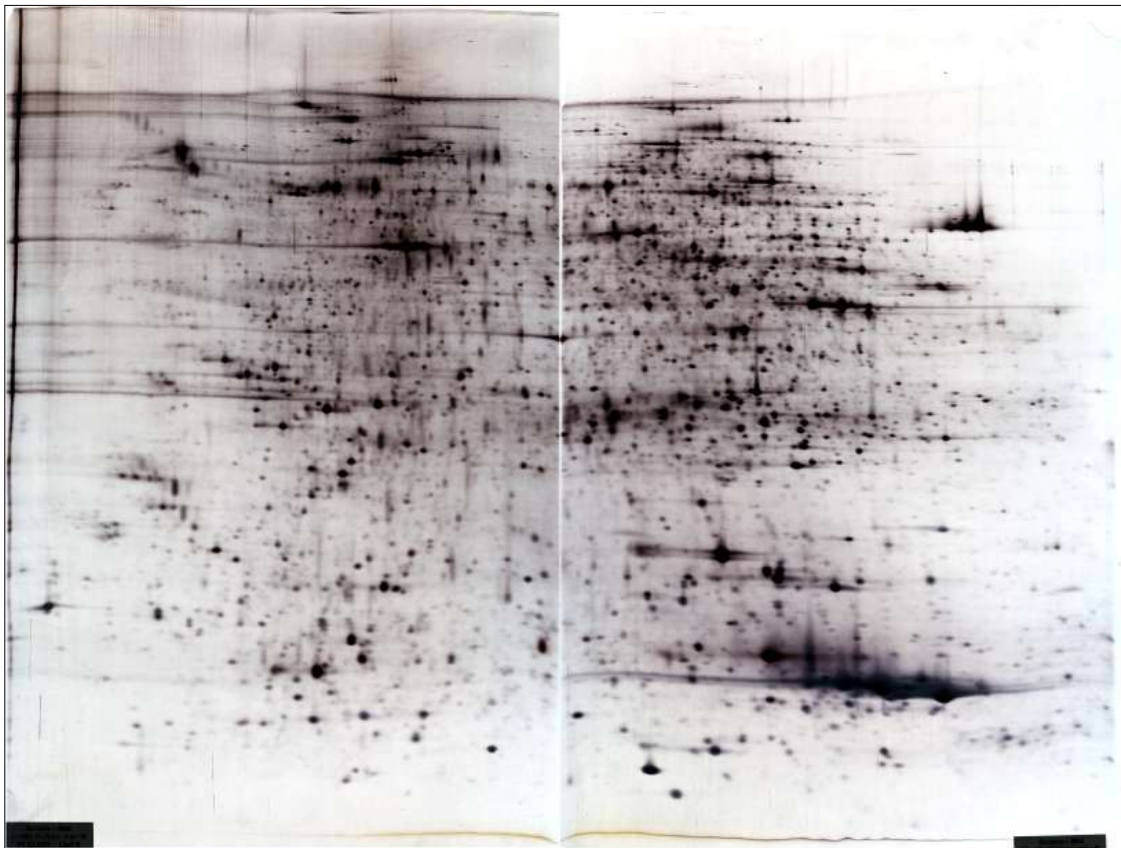
# Anhang



## A Standardgele

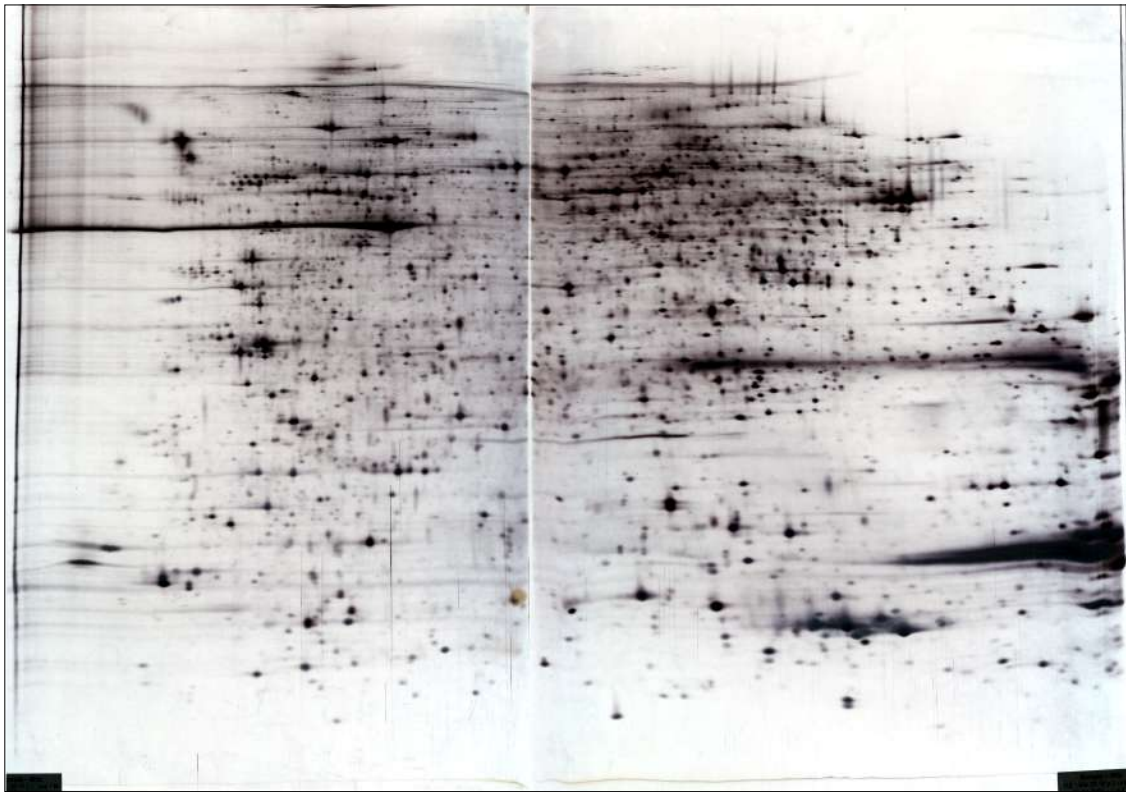
Stellvertretend für alle Gele einer Organfraktion sind im Folgenden die Standardgele als Repräsentanten der untersuchten Fraktionen/Organe gezeigt.

### A.1 Milz-Überstand



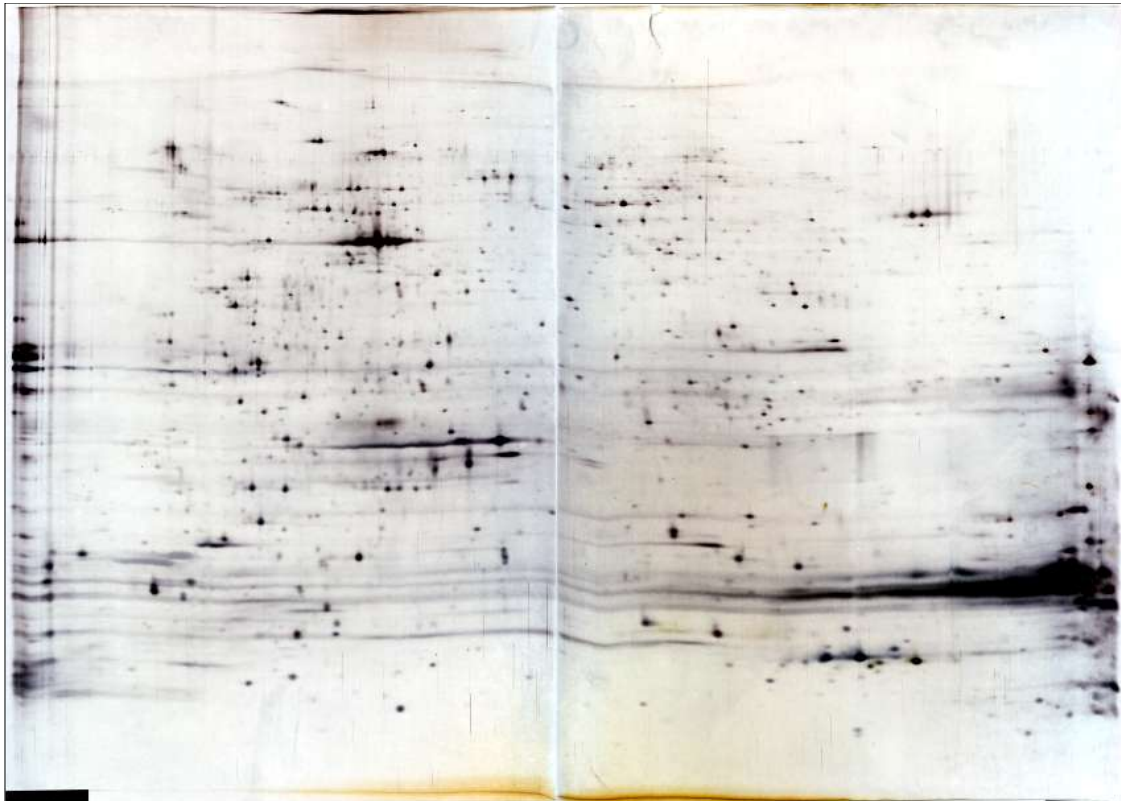
**Abbildung A.1:** Ein repräsentatives 2D-Gelmuster der Plasmatischen Fraktion (Überstand Ü) der Milz 20 Wochen nach oraler Infektion der weiblichen C57BL/6-Mäuse.

## A.2 Milz-Rückstandsextrakt



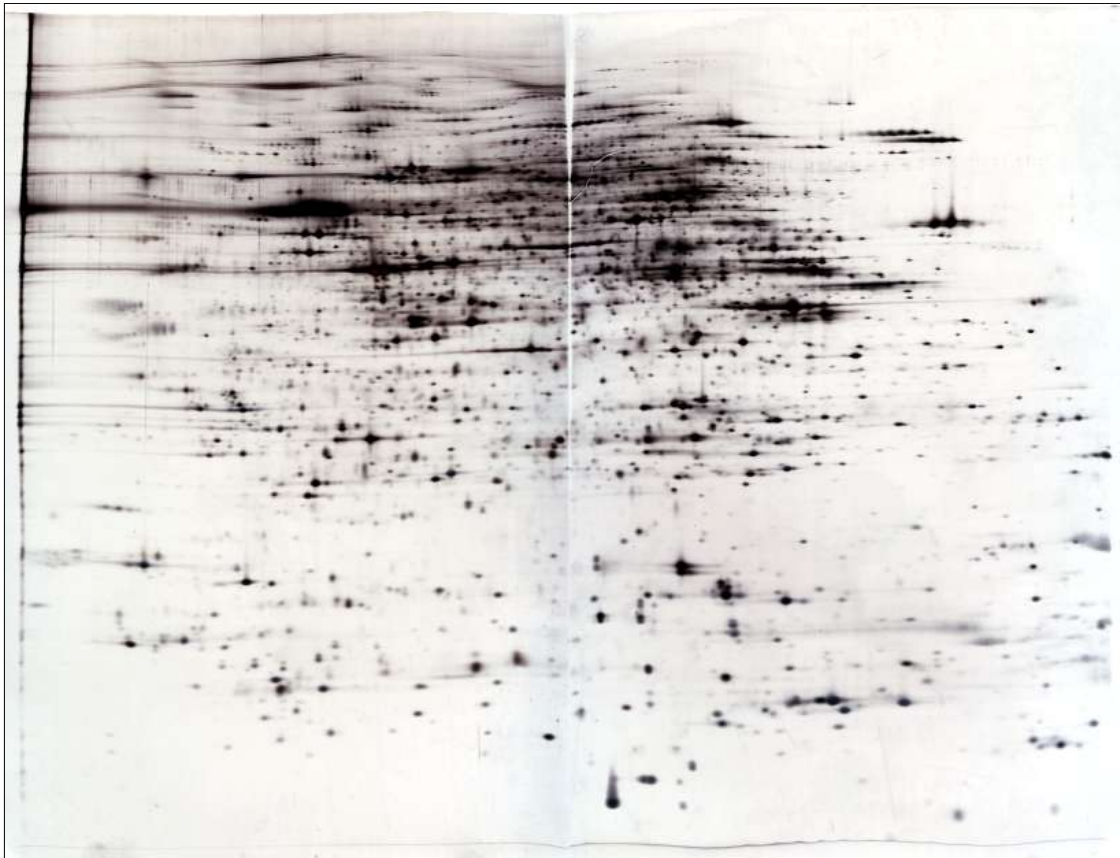
**Abbildung A.2:** Ein repräsentatives 2D-Gelmuster der Membran-assoziierten Fraktion (Rückstandsextrakt RE) der Milz 20 Wochen nach oraler Infektion der weiblichen C57BL/6-Mäuse.

### A.3 Milz-Rückstandssuspension



**Abbildung A.3:** Ein repräsentatives 2D-Gelmuster der Kernfraktion (Rückstandssuspension RS) der Milz 20 Wochen nach oraler Infektion der weiblichen C57BL/6-Mäuse.

## A.4 Gehirn-Gesamtextrakt



**Abbildung A.4:** Ein repräsentatives 2D-Gelmuster des Gehirn-Gesamtextraktes im terminalen Stadium (21 Wochen) nach intrazerebraler Infektion der weiblichen C57BL/6-Mäuse.

## B Tabellen der veränderten Spots

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Vielzahl an Spots durch die Scrapie-Infektion verändert wird. Viele davon sind identifiziert worden. Da eine eingehende Diskussion aller gefundenen Proteine jedoch weit über den Rahmen dieser Arbeit hinausginge, werden nur einige Proteine und Proteingruppen diskutiert. Die übrigen Ergebnisse sollen jedoch Interessierten für weitere Untersuchungen zugänglich sein und werden daher nachfolgend aufgelistet. Bislang unberücksichtigte Gemische und unsichere Identifizierungen sind ebenfalls enthalten.

### B.1 Differentielle Spots Milz-Überstand

**Tabelle B.1:** Veränderte Spots des Milz-Überstandes in allen untersuchten Stadien und Identifizierungen, sortiert nach den durchnummerierten Spots. Erläuterung der Symbole: A und B in der Spalte SPOT stehen für Spots der sauren (*acidic*) bzw. basischen Seite, numeriert; die Spaltentitel NW bezeichnen das Krankheitsstadium in Wochen; -, --, --- bezeichnen leicht, deutlich bzw. sehr deutlich schwächere/kleinere Spots, +, ++, +++ hingegen leicht, deutlich bzw. sehr deutlich stärkere/größere Spots im erkrankten Gewebe gegenüber der Kontrolle; / bedeutet, dass keine (einheitliche) Veränderung innerhalb des Stadiums vorliegt oder der Spot nicht eindeutig zugeordnet werden kann.

SPOT	20 W	16 W	12 W	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)
A01	++	+	/	Gemisch: <a href="#">gi 6680187</a> hematopoietic cell specific Lyn substrate 1 [Mus musculus] und <a href="#">gi 6755863</a> Tumor rejection antigen gp96; tumor rejection antigen (gp96) 1 [Mus musculus]
A06	--	(-)	-	<a href="#">gi 113963</a> Annexin A6 (Annexin VI) (Lipocortin VI) (P68) (P70) (Protein III) (Chromobindin 20) (67 kDa calelectrin) (Calphobindin-II) (CPB-II)
A07	--	--	/	<a href="#">gi 13384620</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K [Mus musculus]
A17	--	/	/	<a href="#">gi 6754910</a> nuclear distribution gene C homolog [Mus musculus]
A19	+	/	+	<a href="#">gi 31982275</a> heat shock protein 4; heat shock 70 kDa protein 4; heat shock protein, 110 kDa [Mus musculus]
A21	--	/	-	<a href="#">gi 8394460</a> tropomodulin 3; ubiquitous tropomodulin [Mus musculus]
A22	-	-	/	
A24	--	/	/	<a href="#">gi 6678097</a> serine (or cysteine) proteinase inhibitor, calde B, member 6a; serine protease inhibitor 3; serine ...
A25	--	/	/	<a href="#">gi 6678097</a> serine (or cysteine) proteinase inhibitor, calde B, member 6a; serine protease inhibitor 3; serine ...
A33	++	--	/	<a href="#">gi 1288430</a> Nucleolin (Protein C23)
A34	++	-	++	
A39	--	/	/	
A40	--	/	-	<a href="#">gi 1698572</a> Proteasome activator PA28 beta subunit
A41	++	/	/	
A43	--	/	-	<a href="#">gi 3914438</a> Proteasome subunit alpha type 3 (Proteasome component C8) (Macropain subunit C8) (Multycatalytic ...)

Fortsetzung nächste Seite

ANHANG B TABELLEN DER VERÄNDERTEN SPOTS

*Fortsetzung von Tab. B.1: Differentielle Spots Milz-Überstand*

SPOT	20 W	16 W	12 W	PROTEINIDENTITÄT (NCBI NR)
A46	--	(-)	/	<a href="#">gi 6756037</a> tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide; 14-3-3 eta
A54	--	/	/	<a href="#">gi 3953617</a> SET [Mus musculus]
A55	+	/	+	<a href="#">gi 5803076</a> chromobox homolog 1 (HP1 beta homolog Drosophila); heterochromatin protein p25 beta; ...
A56	--	--	/	<a href="#">gi 2499469</a> Peroxiredoxin 2 (Thioredoxin peroxidase 1) (Thioredoxin dependent peroxide reductase 1) ...
A57	--	-	/	Gemisch: <a href="#">gi 21411447</a> Crk protein [Mus musculus] und <a href="#">gi 7657031</a> 5',3'-nucleotidase, cytosolic; 5'(3')-deoxyribonucleotidase; 5' nucleotidase, deoxy (pyriminidine), ...
A60	--	/	/	<a href="#">gi 31560222</a> apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD [Mus musculus]
A62	++	--	/	<a href="#">gi 6754976</a> Peroxiredoxin 1; proliferation-associated gene A; osteoblast specific factor 3; macrophage 23 Kd ...
A73	++	/	/	<a href="#">gi 26389256</a> unnamed protein product [Mus musculus] (Fragment von A07!)
A76	--	-	/	<a href="#">gi 11993950</a> glia maturation factor, gamma [Mus musculus]
A85	++	/	/	<a href="#">gi 52120</a> unnamed protein product [Mus musculus] (Fragment oder Isoform von <a href="#">gi 52140</a> immunglobulin kappa light chain [Mus musculus])
A88	+	/	+	
B01	++	/	/	<a href="#">gi 33859482</a> eukaryotic translation elongation factor 2 [Mus musculus]
B02	++	/	+	<a href="#">gi 33859482</a> eukaryotic translation elongation factor 2 [Mus musculus]
B07	++	/	/	<a href="#">gi 32363497</a> Ezrin (p81) (Cytovillin) (Villin 2)
B08	++	/	/	<a href="#">gi 6677699</a> radixin [Mus musculus]
B09	+(+)	++	/	<a href="#">gi 18606238</a> Gelsolin [Mus musculus]
B12	++	/	/	<a href="#">gi 119531</a> Protein disulfide isomerase A4 precursor (Protein Erp-72) (Erp72)
B14	++	/	/	
B15	++	--	/	<a href="#">gi 462608</a> Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)
B16	++	/	/	<a href="#">gi 13277819</a> Stress-induced phosphoprotein 1 [Mus musculus]
B18	++	-	/	<a href="#">gi 4097668</a> SH2 phosphatase 1 [Mus musculus]
B20	++	+	/	Gemisch: <a href="#">gi 119531</a> Protein disulfide isomerase A4 precursor (Protein Erp-72) (Erp72) und <a href="#">gi 6679687</a> glucose regulated protein; endoplasmic reticulum protein; glucose regulated protein, 58 kDa; ...
B24	++	/	/	<a href="#">gi 7304885</a> Annexin A11; annexin XI [Mus musculus]
B31	++	/	/	<a href="#">gi 2499469</a> Peroxiredoxin 2 (Thioredoxin peroxidase 1) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase 1) (Thiol-...
B32	++	/	/	<a href="#">gi 26333597</a> unnamed protein product [Mus musculus] (laut BLASTsearch 100% <a href="#">gi 227256</a> talin)
B35	++	++	++	
B37	++	/	/	
B47	++	/	+	<a href="#">gi 12832236</a> unnamed protein product [Mus musculus] – laut BLAST 99% Übereinstimmung mit <a href="#">gi 1070515</a> carbonate dehydratase (EC 4.2.1.1) II – mouse
B49	++	/	/	<a href="#">gi 21071091</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 [Mus musculus]

*Fortsetzung nächste Seite*



## B.2 Differentielle Spots Milz-Rückstandsextrakt

Fortsetzung von Tab. B.1: Differentielle Spots Milz-Überstand

SPOT	20 W	16 W	12 W	PROTEINIDENTITÄT (NCBI NR)
B50	++	/	/	<a href="#">gi 4504445</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform a; nuclear ribonucleoprotein particle A1 protein
B51	++	/	/	<a href="#">gi 23266713</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1/B0 [Mus musculus]
B52	++	/	/	
B56	++	/	/	<a href="#">gi 321246</a> Smooth muscle protein SM22 homolog – mouse (= <a href="#">gi 6755714</a> transgelin; SM-22 alpha [Mus musculus])
B65	++	/	/	<a href="#">gi 12805429</a> Park7 protein [Mus musculus]
B68	++	/	/	<a href="#">gi 6679805</a> FK506 binding protein 2; FK506 binding protein 2 (13 kDa) [Mus musculus]
B73	++	/	/	

## B.2 Differentielle Spots Milz-Rückstandsextrakt

**Tabelle B.2:** Veränderte Spots des Milz-Rückstandsextraktes in allen untersuchten Stadien und Identifizierungen, sortiert nach den durchnummerierten Spots. Erläuterung der Symbole: In Klammern gesetzte Intensitätsänderungen stehen für schwierig zu bewertende Veränderungen; n/a heißt nicht ausgewertet (Stadium nicht verwertbar), die übrigen Symbole sind Tab. B.1 zu entnehmen.

SPOT	20 W	16 W	12 W	PROTEINIDENTITÄT (NCBI NR)
A002	--	/	n/a	<a href="#">gi 20912071</a> similar to data source: SPTR, source key: O75300, evidence: ISS homolog to ES/130 putative [Mus musculus]
A003	--	/	n/a	<a href="#">gi 6753658</a> dynein, cytoplasmic, intermediate chain 2 [Mus musculus]
A008	--	-	n/a	Gemisch: oberer Spot <a href="#">gi 13242237</a> heat shock protein 8; Heat shock cognate protein 70; heat shock 70kD protein 8 [Rattus norvegicus] – unterer Spot <a href="#">gi 17865719</a> Lamin B1
A009	--	/	n/a	<a href="#">gi 6754556</a> lamin B1 [Mus musculus]
A010	--	/	n/a	<a href="#">gi 31982755</a> vimentin [Mus musculus]
A011	--	/	n/a	<a href="#">gi 31982755</a> vimentin [Mus musculus]
A012	++	+(+)	n/a	<a href="#">gi 21313536</a> dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex) [Mus musculus]
A013	--	/	n/a	Doppelspot: <a href="#">gi 31982755</a> vimentin [Mus musculus] und <a href="#">gi 23272966</a> Atp5b protein [Mus musculus]
A014	--	/	n/a	Doppelspot uneinheitlich
A015	-(-)	/	n/a	<a href="#">gi 31980648</a> ATP synthase, H+ transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit; ATP synthase, H+ transporting ...
A020	---	--	n/a	<a href="#">gi 49868</a> put. beta-actin (aa 27-375) [Mus musculus] (zweimal erster gi-Hit; aber viele andere Actinformen in nahem Massenbereich → irgendein Actin)
A021	---	-(-)	n/a	<a href="#">gi 49868</a> put. beta-actin (aa 27-375) [Mus musculus] (zweimal erster gi-Hit; aber viele andere Actinformen in nahem Massenbereich → irgendein Actin)
A022	--	-	n/a	<a href="#">gi 49868</a> put. beta-actin (aa 27-375) [Mus musculus] (einmal erster gi-Hit, einmal vierter bei <i>insgesamt unsicherer Identifizierung</i> ; aber viele andere Actinformen in nahem Massenbereich bzw. als 1.-3. Hit → irgendein Actin)
A026	--	/	n/a	<a href="#">gi 6671672</a> capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2; capping protein alpha 2 [Mus musculus]

Fortsetzung nächste Seite

ANHANG B TABELLEN DER VERÄNDERTEN SPOTS

Fortsetzung von Tab. B.2: Differentielle Spots Milz-Rückstandsextrakt

SPOT	20 W	16 W	12 W	PROTEINIDENTITÄT (NCBI NR)
A027	--	/	n/a	<a href="#">gi 26349519</a> unnamed protein product [Mus musculus] (laut BLAST nahezu identisch (66% statt 67% Sequenzabdeckung) mit <a href="#">gi 51593758</a> Eif3s1 protein [Mus musculus])
A031	--	/	n/a	<a href="#">gi 31543752</a> GS32 protein [Mus musculus]
A032	--	-(-)	n/a	<a href="#">gi 91035</a> ribosomal protein RS.40K – mouse
A034	--	/	n/a	<a href="#">gi 18655521</a> Chain L, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of The Mouse Anti- Human Fas Antibody Hfe7a
A035	++	/	n/a	<a href="#">gi 18655521</a> Chain L, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of The Mouse Anti- Human Fas Antibody Hfe7a
A036	--	/	n/a	<a href="#">gi 18655521</a> Chain L, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of The Mouse Anti- Human Fas Antibody Hfe7a
A037	--	/	n/a	<a href="#">gi 6679299</a> prohibitin [Mus musculus]
A040	--	/	n/a	<a href="#">gi 49868</a> put. beta-actin (aa 27-375) [Mus musculus] (viele andere Actinformen in nahem Massenbereich als frühere Hits, aber sehr uneinheitlich → irgendein Actin)
A041	++	--	n/a	Gemisch: <a href="#">gi 26351857</a> unnamed protein product [Mus musculus] (Fragment von <a href="#">gi 33667042</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein [Mus musculus]) und <a href="#">gi 33563236</a> Rho, GDP dissociation inhibitor (GDI) beta [Mus musculus]
A042	--	/	n/a	<a href="#">gi 13386090</a> breast carcinoma amplified sequence 2 [Mus musculus]
A044	++	+	n/a	<a href="#">gi 20867687</a> nascent polypeptide-associated complex alpha polypeptide [Mus musculus] (Fragment?)
A045	--	/	n/a	<a href="#">gi 26345182</a> unnamed protein product [Mus musculus] (laut BLASTsearch vermutlich <a href="#">gi 6753096</a> apolipoprotein A-I [Mus musculus])
A050	--	/	n/a	<a href="#">gi 809561</a> gamma actin [Mus musculus]
A051	--	/	n/a	<a href="#">gi 6680860</a> chromobox homolog 3 (Drosophila HP1 gamma); heterochromatin protein 1 gamma [Mus musculus]
A052	--	/	n/a	<a href="#">gi 6680860</a> chromobox homolog 3 (Drosophila HP1 gamma); heterochromatin protein 1 gamma [Mus musculus]
A055	++	++	n/a	<a href="#">gi 26389256</a> unnamed protein product [Mus musculus] (Fragment von <a href="#">gi 13384620</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K [Mus musculus])
A056	--	-	n/a	<a href="#">gi 6679108</a> nucleophosmin 1; nucleolar protein NO38 [Mus musculus]
A059	+	+	n/a	<a href="#">gi 14625464</a> stathmin [Mus musculus]
A069	--(-)	/	n/a	
A073	++	(-)	n/a	<a href="#">gi 7106439</a> tubulin, beta 5 [Mus musculus]
A074	--	/	n/a	
A076	++	/	n/a	<a href="#">gi 18606238</a> Gelsolin [Mus musculus]
B002	--	/	n/a	<a href="#">gi 26352950</a> unnamed protein product [Mus musculus] (identisch mit <a href="#">gi 9790067</a> staphylococcal nuclease domain containing 1; p100 co-activator [Mus musculus] und <a href="#">gi 6009521</a> p100 co-activator [Mus musculus] ( <i>unsicher!</i> ))
B003	--	/	n/a	<a href="#">gi 37514837</a> Snd1-pending protein [Mus musculus]
B004	--	/	n/a	
B005	++	(+)	n/a	<a href="#">gi 10442545</a> PTB-associated splicing factor [Mus musculus]
B007	--	/	n/a	
B008	--	/	n/a	<a href="#">gi 32363497</a> Ezrin (p81) (Cytovillin) (Villin 2)
B010	--	/	n/a	<a href="#">gi 21704156</a> caldesmon 1 [Mus musculus]
B011	--	/	n/a	<a href="#">gi 21704156</a> caldesmon 1 [Mus musculus]

Fortsetzung nächste Seite

## B.2 Differentielle Spots Milz-Rückstandsextrakt

Fortsetzung von Tab. B.2: Differentielle Spots Milz-Rückstandsextrakt

SPOT	20 W	16 W	12 W	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)
B014	++	/	n/a	<a href="#">gi 6576815</a> SYNCRIP [Mus musculus]
B016	--	+	n/a	<a href="#">gi 21313308</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M [Mus musculus]
B018	-(-)	/	n/a	
B019	--	/	n/a	
B020	--	/	n/a	<a href="#">gi 418112</a> DNA topoisomerase I
B021	--	/	n/a	
B023	--	/	n/a	Gemisch: <a href="#">gi 20806109</a> ADP-ribosyltransferase (NAD <sup>+</sup> ; poly (ADP-ribose) polymerase) 1 [Mus musculus] und <a href="#">gi 14329713</a> Tpr [Mus musculus] (N-Gel) bzw. <a href="#">gi 6754732</a> myeloperoxidase [Mus musculus] (S-Gel)
B024	--	/	n/a	<a href="#">gi 2832298</a> pleiotropic regulator 1 [Mus musculus]
B025	--	/	n/a	<a href="#">gi 38571767</a> Ddx5 protein [Mus musculus]
B027	--	++	n/a	
B028	--	++	n/a	Gemisch: <a href="#">gi 6681157</a> DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5; D-E-A-D (aspartate-glutamate-alanine-aspartate) box polypeptide 5; DEAD (aspartate-glutamate-alanine-aspartate) box ... und <a href="#">gi 7305407</a> prolactin-like protein I; PLP I; prolactin-like protein J [Mus musculus]
B029	++	++	n/a	<a href="#">gi 129535</a> Polyadenylate-binding protein 1 (Poly(A)-binding protein 1) (PABP 1)
B030	--	++	n/a	<a href="#">gi 6679515</a> polypyrimidine tract binding protein 1; hnRNP I [Mus musculus] ( <i>unsicher!</i> )
B031	++	++	n/a	<a href="#">gi 6680027</a> glutamate dehydrogenase [Mus musculus]
B033	++	/	n/a	<a href="#">gi 24659630</a> Tcerg1 protein [Mus musculus]
B035	--	/	n/a	<a href="#">gi 6753738</a> eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene X-linked [Mus musculus]
B039	++	-	n/a	evt. Gemisch: <a href="#">gi 128843</a> Nucleolin (Protein C23) und <a href="#">gi 4322419</a> vasidolator-stimulated phosphoprotein [Mus musculus]
B043	++	+	n/a	<a href="#">gi 33859554</a> fumarate hydratase 1 [Mus musculus]
B047	+(+)	/	n/a	
B048	++	/	n/a	<a href="#">gi 6680618</a> acetyl-Coenzym A dehydrogenase, medium chain [Mus musculus]
B050	--	(-)	n/a	<a href="#">gi 26352474</a> unnamed protein product [Mus musculus] (= <a href="#">gi 6755224</a> twinfilin-like protein; protein tyrosine kinase 9 related protein; A6 related protein; PTK9 protein)
B052	+	(+)	n/a	<a href="#">gi 6680345</a> isocitrate dehydrogenase 3 (NAD <sup>+</sup> ), gamma [Mus musculus]
B053	+	+	n/a	<a href="#">gi 21704156</a> caldesmon 1 [Mus musculus]
B054	++	++	n/a	<a href="#">gi 29145079</a> Hnrpd protein [Mus musculus]
B055	++	/	n/a	<a href="#">gi 29145079</a> Hnrpd protein [Mus musculus]
B057	--	/	n/a	<a href="#">gi 6996913</a> annexin A2; calpactin I heavy chain; annexin II; lipocortin II; chromobindin 8; 33-kDa calcimedlin; ...
B059	++	/	n/a	<a href="#">gi 13278382</a> Eef1a1 protein [Mus musculus]
B061	++	/	n/a	Gemisch: <a href="#">gi 16716499</a> sideroflexin 3 [Mus musculus] und <a href="#">gi 6755809</a> talin [Mus musculus]
B062	+	+	n/a	<a href="#">gi 16716499</a> sideroflexin 3 [Mus musculus]
B064	--	/	n/a	
B065	++	++	n/a	<a href="#">gi 31542602</a> ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R); HU-antigen A [Mus musculus]

Fortsetzung nächste Seite

ANHANG B TABELLEN DER VERÄNDERTEN SPOTS

*Fortsetzung von Tab. B.2: Differentielle Spots Milz-Rückstandsextrakt*

SPOT	20 W	16 W	12 W	PROTEINIDENTITÄT (NCBI NR)
B066	++	++	n/a	<a href="#">gi 31542602</a> ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R); HU-antigen A [Mus musculus]
B067	++	+++	n/a	<a href="#">gi 4504445</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform a; nuclear ribonucleoprotein particle A1 protein; ...
B068	+	++	n/a	<a href="#">gi 21704156</a> caldesmon 1 [Mus musculus]
B069	--	/	n/a	
B070	--	/	n/a	<a href="#">gi 23956266</a> DnaJ homolog, subfamily C, member 9 [Mus musculus]
B073	++	+	n/a	<a href="#">gi 6671602</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D; AU-rich element RNA-binding protein 1 [Mus musculus]
B077	++	+	n/a	<a href="#">gi 21071091</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 2 [Mus musculus]
B079	++	++	n/a	evt. Gemisch: <a href="#">gi 10800150</a> splicing factor 3a, subunit 2; spliceosomal protein gene 62; splicing factor 3a, subunit 2, 66kD [Mus musculus] und <a href="#">gi 6755372</a> ribosomal protein S3 [Mus musculus]
B081	++	/	n/a	
B082	++	/	n/a	<a href="#">gi 31982373</a> fibrillarin [Mus musculus]
B085	++	/	n/a	<a href="#">gi 31559916</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform b [Mus musculus]
B090	++	/	n/a	<a href="#">gi 31982373</a> fibrillarin [Mus musculus]
B092	++	+	n/a	<a href="#">gi 460317</a> chaperonin
B093	++	+	n/a	Mehrfachgemisch?
B098	++	/	n/a	<a href="#">gi 23266713</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1/B0 [Mus musculus]
B100	++	/	n/a	<a href="#">gi 20806109</a> ADP-ribosyltransferase (NAD+; poly (ADP-ribose) polymerase) 1 [Mus musculus]
B104	++	+(+)	n/a	<a href="#">gi 4504445</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform a; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B2 protein; nuclear ribonucleoprotein particle A1 protein; helix-destabilizing protein; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein core protein A1; single-strand DNA-binding protein UP1; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1B protein [Homo sapiens]
B105	++	/	n/a	<a href="#">gi 23266713</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1/B0 [Mus musculus]
B106	++	/	n/a	
B107	++	++	n/a	<a href="#">gi 19911240</a> polypyrimidine tract binding protein [Mus musculus] (geachtet der Position im Gel und aufgrund der ESI- und MALDI-Daten liegt vermutlich ein Fragment hiervon (unwahrscheinlicher eine Isoform) vor)
B108	++	/	n/a	<a href="#">gi 31559916</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform b; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 [Mus musculus]
B109	+(+)	/	n/a	<a href="#">gi 32880197</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 2 [Mus musculus]
B110	+	+	n/a	<a href="#">gi 6679497</a> proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 2 [Mus musculus]
B111	++	/	n/a	<a href="#">gi 4504445</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform a; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B2 protein; nuclear ribonucleoprotein particle A1 protein; helix-destabilizing protein; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein core protein A1; single-strand DNA-binding protein UP1; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1B protein [Homo sapiens]
B112	++	/	n/a	

*Fortsetzung nächste Seite*

### B.3 Differentielle Spots Milz-Rückstandssuspension

Fortsetzung von Tab. B.2: Differentielle Spots Milz-Rückstandsextrakt

SPOT	20 W	16 W	12 W	PROTEINIDENTITÄT (NCBI NR)
B114	++	/	n/a	
B115	++	/	n/a	<a href="#">gi 23266713</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1/B0 [Mus musculus]
B116	++	(+)	n/a	<a href="#">gi 673450</a> proteasome subunit MC13 [Mus musculus]
B117	++	/	n/a	
B119	+	+	n/a	<a href="#">gi 21312175</a> malignant T cell amplified sequence 1 [Mus musculus]
B122	++	/	n/a	
B130	++	++	n/a	<a href="#">gi 6755198</a> proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 6 [Mus musculus]
B131	++	/	n/a	<a href="#">gi 90626</a> histone H4 (clone 53) – mouse
B132	+(+)	+	n/a	<a href="#">gi 3914438</a> Proteasome subunit alpha type 3 (Proteasome component C8) (Macropain subunit C8) (Multicatalytic endopeptidase complex subunit C8) (Proteasome subunit K)
B137	++	/	n/a	<a href="#">gi 31981458</a> glutaredoxin 1 (thioltransferase); glutaredoxin (thioltransferase) [Mus musculus]

### B.3 Differentielle Spots Milz-Rückstandssuspension

**Tabelle B.3:** Veränderte Spots der Milz-Rückstandssuspension in allen untersuchten Stadien und Identifizierungen, sortiert nach den durchnummerierten Spots. Erläuterung der Symbole: In Klammern gesetzte Intensitätsänderungen stehen für schwierig zu bewertende Veränderungen; n/a heißt nicht ausgewertet (Stadium nicht verwertbar), die übrigen Symbole sind Tab. B.1 zu entnehmen.

SPOT	20 W	16 W	12 W	PROTEINIDENTITÄT (NCBI NR)
A01	++	n/a	n/a	
A02	--	n/a	n/a	<a href="#">gi 18606238</a> Gelsolin [Mus musculus]
A09	--	n/a	n/a	<a href="#">gi 7305565</a> t-complex protein 1 [Mus musculus]
A15	++	n/a	n/a	
A19	++	n/a	n/a	
A23	+(+)	n/a	n/a	<a href="#">gi 7305417</a> proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 10; proteasome (prosome, macropain) subunit ...
A25	++	n/a	n/a	<a href="#">gi 6753324</a> chaperonin subunit 6a (zeta); chaperonin containing TCP-1 [Mus musculus]
A34	++	n/a	n/a	<a href="#">gi 6753914</a> ferritin light chain 1 [Mus musculus]
A40	++	n/a	n/a	
A51	+(+)	n/a	n/a	<a href="#">gi 6753178</a> barrier to autointegration factor 1; breakpoint cluster region protein 1 [Mus musculus]
B03	--	n/a	n/a	<a href="#">gi 13543181</a> Hnrpm protein [Mus musculus] ( <i>sehr unsicher!</i> )
B04	--	n/a	n/a	
B05	-(-)	n/a	n/a	<a href="#">gi 27370092</a> Tu translation elongation factor, mitochondrial [Mus musculus]
B06	--	n/a	n/a	<a href="#">gi 22267442</a> ubiquinol cytochrome c reductase core protein 2; RIKubiquinol cytochrome c reductase core protein 2 [Mus musculus]
B07	--	n/a	n/a	<a href="#">gi 21450129</a> acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 precursor [Mus musculus] ( <i>sehr unsicher!</i> )
B10	--	n/a	n/a	<a href="#">gi 31559916</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform b; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 [Mus musculus]

Fortsetzung nächste Seite

## ANHANG B TABELLEN DER VERÄNDERTEN SPOTS

*Fortsetzung von Tab. B.3: Differentielle Spots Milz-Rückstandssuspension*

SPOT	20 W	16 W	12 W	PROTEINIDENTITÄT (NCBI NR)
B11	--	n/a	n/a	<a href="#">gi 7949053</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 1 [Mus musculus]
B12	--	n/a	n/a	<a href="#">gi 7949053</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 1 [Mus musculus]
B21	++	n/a	n/a	<a href="#">gi 7949053</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 1 [Mus musculus]
B22	++	n/a	n/a	
B26	++	n/a	n/a	<a href="#">gi 7949053</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 1 [Mus musculus]
B28	++	n/a	n/a	<a href="#">gi 32130449</a> 60S ribosomal protein L12

## B.4 Differentielle Spots Gehirn-Gesamtextrakt

**Tabelle B.4:** Veränderte Spots des Gehirn-Gesamtextraktes in allen untersuchten Stadien und Identifizierungen, sortiert nach den durchnummerierten Spots. Erläuterung der Symbole: hochgesetzte Zahlen<sup>n</sup> der Kopfzeilen bezeichnen ein spezifisches (numeriertes) Probenpaar; in Klammern gesetzte Intensitätsänderungen und ? stehen für schwierig zu bewertende Veränderungen; die übrigen Symbole sind bereits in Tab. B.1 beschrieben.

SPOT	21 W	18 W <sup>6</sup>	18 W <sup>7</sup>	18 W <sup>8</sup>	14 W <sup>1</sup>	14 W <sup>3</sup>	14 W <sup>4</sup>	11 W <sup>1</sup>	11 W <sup>2</sup>	11 W <sup>5</sup>	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)
A001	++	++	++	+	+	-	/	++	/	?	
A004	+++	++	++	++	+	/	+++	/	/	?	
A008	--	-	-	-	/	/	/	/	/	/	<a href="#">gi 40254361</a> osmotic stress protein; osmotic stress protein 94 kDa [Mus musculus]
A009	--(-)	-	--	--	/	/	/	/	/	/	<a href="#">gi 487851</a> dynamin
A014	++	+	-	+	-	-	+	/	+	(+)	<a href="#">gi 109893</a> dnaK-type molecular chaperone grp78 precursor - mouse
A016	-	-	-	-	+	-	(-)	+	/	-	<a href="#">gi 20892559</a> ATPase, H+ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump), alpha 70 kDa, isoform 1 [Mus musculus]
A021	--	--	--	(+)	-	-	-	+	+	/	<a href="#">gi 40254595</a> dihydropyrimidinase-like 2; collapsin response mediator protein 2 [Mus musculus]
A022	+(+)	++	/	/	-	+	/	+	/	/	<a href="#">gi 14165437</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K isoform a; dC-stretch binding protein; transformation upr
A023	++	+	-	+	/	/	/	+	/	/	<a href="#">gi 13384620</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K [Mus musculus]
A024	++(+)	?	--	-	/	/	+	/	--	/	
A030	++	++	+	+	/	-	+	/	-	/	<a href="#">gi 40254595</a> dihydropyrimidinase-like 2; collapsin response mediator protein 2 [Mus musculus]
A036	--	-	-	--	+	-	+	/	/	+	<a href="#">gi 14714696</a> Sept6 protein [Mus musculus] ( <i>unsicher!</i> )
A037	+(+)	/	+	++	+	-	+	+	+	++	<a href="#">gi 6677681</a> retinoblastoma binding protein 4 [Mus musculus]
A043	+	+	+(+)	+	-	--	-	+	-	++	<a href="#">gi 23956222</a> ARP3 actin-related protein 3 homolog; actin-related protein 3 homolog (yeast) [Mus musculus]

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. B.4: Differentielle Spots Gehim-Gesamtextrakt

SPOT	21 W	18 W <sup>6</sup>	18 W <sup>7</sup>	18 W <sup>8</sup>	14 W <sup>1</sup>	14 W <sup>3</sup>	14 W <sup>4</sup>	11 W <sup>1</sup>	11 W <sup>2</sup>	11 W <sup>5</sup>	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)
A047	++	+	+	+	/	/	/	+	+	/	<a href="#">gi 14193690</a> glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]
A048	+++	+++	++	+++	+	-	+	+	+	+	<a href="#">gi 14193690</a> glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]
A049	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	<a href="#">gi 14193690</a> glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]
A050	++	++	+	++	+	+	+	(+)	(+)	?	<a href="#">gi 14193690</a> glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]
A051	+++	++	++	++	+	+	+	(+)	(+)	(+)	<a href="#">gi 319914</a> glial fibrillary acidic protein, astrocyte - mouse
A052	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	+	<a href="#">gi 14193690</a> glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]
A054	++	++	+	++	+	+	+	/	/	/	<a href="#">gi 14193690</a> glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]
A055	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	<a href="#">gi 14193690</a> glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]
A063	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	
A065	++	++	+	+	/	/	+	/	/	+	<a href="#">gi 387163</a> glial fibrillary acidic protein (GFAP) = 3.Hit glial fibrillary acidic protein, astrocyte - mouse 50 kDa ( <i>unsicher!</i> )
A066	+++	+++	++	+++	++	+	++	+	+	+	<a href="#">gi 14193690</a> glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]
A067	+++	+++	++	+++	++	+	++	+	+	+(+)	<a href="#">gi 14193690</a> glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]
A073	+++	++	++	++	/	?	+	/	/	+	<a href="#">gi 14193690</a> glial fibrillary acidic protein [Mus musculus] ( <i>leicht unsicher</i> )
A074	+	+	+	++	-	/	+	/	+	/	<a href="#">gi 23396882</a> Neuronal tropomodulin (N-Tmod) (Tropomodulin 2)
A076	++	++	++	++	-	-	+	+	-	++	<a href="#">gi 21312564</a> calponin 3, acidic [Mus musculus]
A078	+	+	+	+	/	-	+	--	+	++	<a href="#">gi 20178271</a> Tropomyosin 1 alpha chain (Alpha-tropomyosin)
A083	--	/	/	/	/	/	+	/	/	+	

Fortsetzung nächste Seite



Fortsetzung von Tab. B.4: Differentielle Spots Gehirn-Gesamtextrakt

SPOT	21 W	18 W <sup>6</sup>	18 W <sup>7</sup>	18 W <sup>8</sup>	14 W <sup>1</sup>	14 W <sup>3</sup>	14 W <sup>4</sup>	11 W <sup>1</sup>	11 W <sup>2</sup>	11 W <sup>5</sup>	PROTEINIDENTITÄT (NCBI/NR)
A084	+(+)	(-)	+	+	/	-	(/)	+	/	/	<a href="#">gi 5031931</a> nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide [Homo sapiens] ( <i>sehr unsicher!</i> )
A086	+(+)	+	+	+(+)	/	-	?	/	-	+	
A089	+	+	+	+	+	-	+	/	/	+	
A090	++	++	+	++	(+)	/	+	+	/	?	
A092	++	++	++	++	+	-	++	+	+	-	<a href="#">gi 7304887</a> annexin A3; annexin III [Mus musculus]
A093	++	-	+	+	-	-	+	+	/	/	<a href="#">gi 33859640</a> transaldolase 1 [Mus musculus] ( <i>unsicher!</i> )
A095	++	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
A100	+	+	+	+	-	-	+	+	/	+	<a href="#">gi 12963597</a> eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein) [Mus musculus]
A102	+	+	+	+	/	-	+	+	/	+	<a href="#">gi 15341784</a> Eef1d protein [Mus musculus]
A103	++	+	+	++	-	--	-	+	--	++	<a href="#">gi 6753060</a> annexin A5; annexin V [Mus musculus]
A105	+	+	+	+	+	/	+	+	-	/	
A108	++	++	++	++	+	-	+	+	/	+	<a href="#">gi 10946574</a> creatine kinase, brain [Mus musculus]
A109	+	+	+	+	+	/	+	(+)	/	+	
A110	+	++	++	+	/	-	+	+	/	+	<a href="#">gi 33416530</a> Annexin A4 [Mus musculus]
A111	+++	++	++	++	++	+	+	?	?	?	<a href="#">gi 319914</a> glial fibrillary acidic protein, astrocyte - mouse
A121	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	<a href="#">gi 7106301</a> microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1; adenomatosis polyposis coli binding protein
A124	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	<a href="#">gi 13591860</a> TOLLIP protein [Mus musculus]
A127	++	++	+	++	+	-	+	+	/	+	<a href="#">gi 192005</a> apolipoprotein E
A131	+	+	+	+	/	/	+	+	+	+	Eine Tropomyosin-Isoform (identifiziert: <a href="#">gi 111212</a> tropomyosin 5 - mouse (2x) und <a href="#">gi 20178271</a> Tropomyosin 1 alpha chain (Alpha-tropomyosin) und <a href="#">gi 227136</a> nonmuscle tropomyosin

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. B.4: Differentielle Spots Gehirn-Gesamtextrakt

SPOT	21W	18W <sup>6</sup>	18W <sup>7</sup>	18W <sup>8</sup>	14W <sup>1</sup>	14W <sup>3</sup>	14W <sup>4</sup>	11W <sup>1</sup>	11W <sup>2</sup>	11W <sup>5</sup>	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)
A133	+	+	+	+	/	-	++	+	/	+	Eine Tropomyosin-Isoform (identifiziert: <a href="#">gi 17105362</a> tropomyosin 3, gamma [Rattus norvegicus] und <a href="#">gi 11212</a> tropomyosin 5 - mouse) <a href="#">gi 15617203</a> chloride intracellular channel 1 [Mus musculus]
A138	+	+	+	+	+	-	+	+	(+)	+	<a href="#">gi 10946574</a> creatine kinase, brain [Mus musculus] ( <i>unsicher!</i> )
A143	++	++	++	++	++	-	++	+	/	+	
A145	++	?	+	++	+	-	-	/	-	+	
A149	+(+)	+	/	+	/	--	+	+	/	/	
A155	++	+	-	++	/	/	+	-	--	-	
A159	++	++	++	++	/	--	?	+	+	+	
A163	++	++	++	++	++	?	/	++	?	+	<a href="#">gi 6671549</a> peroxiredoxin 6; acidic calcium-independent phospholipase A2; peroxiredoxin 5; 1-Cys Prx; anti-oxid <a href="#">gi 20384811</a> PC-1 [Mus musculus] ( <i>unsicher!</i> )
A166	+	+	+	+	+	-	?	/	/	+	
A175	++	+	+	++	++	--	?+	-	/	/	
A178	++	(+)	--	++	-	--	?+	++	-	++	
A179	++	++	++	++	-	--	??	+	-	++	
A190	--	-	+	++	--	--	--	+	+	++	<a href="#">gi 5729783</a> complexin 2; synaphin 1 [Homo sapiens]
A200	+(+)	++	++	++	++	-	/	+	+	+	<a href="#">gi 6755300</a> retinol binding protein 1, cellular [Mus musculus] ( <i>unsicher!</i> )
A203	++	+	-	++	+	+	/	/	+	/	<a href="#">gi 21426847</a> phosphoprotein enriched in astrocytes 15; mammary transforming gene 1 [Mus musculus]
A204	++	++	+	?	++	++	+	/	/	-	
A205	++	++	++	?	++	+	+	-	+	-	
A211	++	-	+	+	+	--	+	-	--	++	
A213	+	+	+	+	-	--	/	-	-	+	
A214	--	-	-	-	+	-	+	(+)	+	-	<a href="#">gi 6753960</a> guanine deaminase [Mus musculus]
B001	++	--	/	/	/	-	+	/	++	--	
B006	-	-	-	-	-	/	/	+	+	+	<a href="#">gi 7305533</a> synapsin I

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. B.4: Differentielle Spots Gehirn-Gesamtextrakt

SPOT	21 W	18 W <sup>6</sup>	18 W <sup>7</sup>	18 W <sup>8</sup>	14 W <sup>1</sup>	14 W <sup>3</sup>	14 W <sup>4</sup>	11 W <sup>1</sup>	11 W <sup>2</sup>	11 W <sup>5</sup>	PROTEINIDENTITÄT (NCBI-NR)
B011	++	+	--	++	-	-	+	+	+	+	<a href="#">gi 462608</a> Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)
B012	++	++	-	++	/	/	+	+	+	+	<a href="#">gi 462608</a> Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)
B013	--	-	--	-	-	+	+	/	/	/	<a href="#">gi 8567410</a> synapsin II [Mus musculus]
B015	-	-	--	-	-	-	/	/	/	-	<a href="#">gi 8567410</a> synapsin II [Mus musculus]
B016	++	++	+	++	++	+	++	/	/	+	<a href="#">gi 220349</a> C4 [Mus musculus] ( <i>sehr unsicher!</i> )
B022	+	+	+	+	/	/	-	/	/	+	Gemisch: <a href="#">gi 7106303</a> EH-domain containing 1 [Mus musculus] und <a href="#">gi 1915915</a> Ulip3 protein [Mus musculus]
B024	++	+	+	+	?	-	/	+	-	+	<a href="#">gi 20799847</a> EH-domain containing protein 2 [Mus musculus] ( <i>sehr unsicher!</i> )
B031	--	+	+	-	-	-	+	+	-	+	
B036	--	-	--	-	--	-	/	-	+	+	<a href="#">gi 38328220</a> Unknown (protein for MGC:70304) [Mus musculus]
B039	++	/	?	-	+	+	?	?	?	+	<a href="#">gi 6671519</a> adenylosuccinate synthetase 1; adenylosuccinate synthetase 1, muscle [Mus musculus]
B040	+	+	+	++	++	++	++	++	++	+	<a href="#">gi 1169475</a> Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1) (Elongation factor 1 A-1) (eEF1A-1) (Elongation factor T)
B043	--	/	--	--	-	/	/	/	+	+	<a href="#">gi 9789726</a> Septin 7 (CDC10 protein homolog)
B045	++	+	+	++	+	+	--	+	+	-	<a href="#">gi 21704100</a> hydroxyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzym
B050	++	++	++	++	/	+	+	/	/	/	<a href="#">gi 27370092</a> RIKEN cDNA 2300002G02 [Mus musculus]
B055	++	++	++	++	+	+	+	/	/	/	<a href="#">gi 22267442</a> RIKubiquinol cytochrome c reductase core protein 2 [Mus musculus]
B057	--	-	-	-	-	-	-?	/	/	+	
B063	--	-	+	-	-	+	--	+	+	-	<a href="#">gi 8393646</a> potassium voltage gated channel, shaker related subfamily, beta member 2 [Rattus norvegicus]

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. B.4: Differentielle Spots Gehim-Gesamtextrakt

SPOT	21 W	18 W <sup>6</sup>	18 W <sup>7</sup>	18 W <sup>8</sup>	14 W <sup>1</sup>	14 W <sup>3</sup>	14 W <sup>4</sup>	11 W <sup>1</sup>	11 W <sup>2</sup>	11 W <sup>5</sup>	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)
B069	-	-	-	-	/	+	-	-	/	+	gi 6754690 monoglyceride lipase; EST AA589436 [Mus musculus]
B071	++	++	+	++	+	++	+	+	+	+	gi 31980844 hypothetical protein D14Ert484e [Mus musculus] ( <i>unsicher!</i> )
B073	+	+	+	++	+	+	?	/	+	-	gi 6005854 repressor of estrogen receptor activity; B-cell associated protein [Homo sapiens]
B077	++	++	++	++	/	/	?	/	/	?+	gi 6754856 nitrilase 1 [Mus musculus]
B079	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
B080	+++	++	++	++	++	++	+	+	+	?	gi 6671652 complement component 1, q subcomponent, gamma polypeptide; complement component 1, q subcomponent, ( <i>sehr unsicher!</i> )
B084	+	+	+	+	-	--	--	+	-	/	gi 2624495 Chain A, Glutathione S-Transferase Yfyf Cys 47-Carboxymethylated Class Pi, Free Enzyme ( <i>unsicher!</i> )
B086	-	-	-	-	-	-	-	-	+	/	gi 12084691 Chain A, Crystal Structure Of Murine Arl3-Gdp
B088	+	+	+	+	-	--	--	+	-	+	
B090	+	+	+	+	+	-	+	+	/	+	gi 30519911 transgelin 2 [Mus musculus]
B092	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	gi 6753530 crystallin, alpha B; crystallin, alpha 2; alpha B-crystallin [Mus musculus] (bei Claus identifiziert)
B094	++	+	-	++	+	+	+	/	+	-	gi 6753530 crystallin, alpha B; crystallin, alpha 2; alpha B-crystallin [Mus musculus]
B099	++	++	+	++	++	-	?+	/	/	/	
B100	++	++	++	++	++	-	+	+	+	?	
B101	+++	+	/	++	+	+	+	/	+	-	
B103	++	+	+	+	+	+	?	/	+	/	
B104	++	+	-	+	-	+	+	-	+	+	
B109	++	++	+	++	+	+	+	+	+	?	gi 31981822 cystatin C; cystatin 3 [Mus musculus]
B110	++	+	+	++	+	+	-	+	+	/	gi 31981822 cystatin C; cystatin 3 [Mus musculus]
B112	++	++	+	++	+	/	/	+	+	+	gi 40807498 heat-responsive protein 12 [Mus musculus]

## C Proteintabellen

Die nachfolgenden Tabellen enthalten die Spotveränderungen mit den zugehörigen Proteinidentitäten nach der Identifizierung durch massenspektrometrische Analyse. Zudem sind Synonyme, wie sie in den beiden verwendeten Datenbanken *NCBI*nr und *UniProt* zu finden sind, aufgeführt. Mit deren Hilfe kann in der *Human Protein Reference Database (HPRD)* in vielen Fällen eine Zuordnung zu einem biologischen Prozess (*Biological Process*), einer molekularen Klasse (*Molecular Class*) und einer molekularen Funktion (*Molecular Function*) vorgenommen werden.

## C.1 Milz-Überstand

**Tabelle C.1:** Veränderte Spots des Milz-Überstandes und Proteinidentitäten nach der Recherche der Massenspektren in der *NCBItr*-Datenbank. In der ersten Spalte steht die Spotbezeichnung (vgl. Tab. B.1), die zweite Spalte (VER.) bezeichnet Art und Grad der Veränderung im 20 W-Stadium. Desweiteren sind die in der Datenbank *UniProt* vezeichneten Proteinnamen und mögliche Synonyme sowie die in der *Human Protein Reference Database (HPRD)* vermerkten Einträge zu *Biological Process* (hiernach erfolgt die Sortierung der Einträge), *Molecular Class* und *Molecular Function* des betreffenden Proteins aufgeführt. Zur Erläuterung der Symbole siehe Tab. B.1.

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
A06	--	<a href="#">gi 113963</a> Annexin A6 (Annexin VI) (Lipocortin VI) (P68) (P70) (Protein III) (Chromobindin 20) (67 kDa calelectrin) (Calphobindin-II) (CPB-II)	Annexin A6 (Annexin VI) (Lipocortin VI) (P68) (P70) (Protein III) (Chromobindin 20) (67 kDa calelectrin) (Calphobindin-II) (CPB-II)	Signal transduction; Cell communication	Calcium binding protein	Calcium ion binding
A17	--	<a href="#">gi 6754910</a> nuclear distribution gene C homolog [Mus musculus]	MNUDC protein (Nuclear distribution gene C homolog) (Sig 92 protein) (Mus musculus 10 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6530413H12 product:nuclear distribution gene C homolog (Aspergillus), full insert sequence)	Signal transduction; Cell communication	Cell cycle control protein	Regulation of cell cycle
A46	--	<a href="#">gi 6756037</a> tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide; 14-3-3 eta	14-3-3 protein eta	Signal transduction; Cell communication	Adapter molecule	Receptor signaling complex scaffold activity
A60	--	<a href="#">gi 31560222</a> apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD [Mus musculus]	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (maASC) (PYD and CARD domain containing protein)	Signal transduction; Cell communication	Adapter molecule	Receptor signaling complex scaffold activity
A76	--	<a href="#">gi 11993950</a> glia maturation factor, gamma [Mus musculus]	Glia maturation factor gamma (GMF-gamma)	Signal transduction; Cell communication	Growth factor	Growth factor activity

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.1.: Proteinidentitäten und Klassifizierung Milz-Überstand

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBI/NR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
B16	++	gi 13277819 Stress-induced phosphoprotein 1 [Mus musculus]	Stress-induced-phosphoprotein 1 (ST11) (Hsc70/Hsp90-organizing protein) (Hop) (mST11)	Signal transduction; Cell communication	Adapter molecule	Receptor signaling complex scaffold activity
B18	++	gi 4097668 SH2 phosphatase 1 [Mus musculus]	Tyrosine-protein phosphatase, non-receptor type 6 (Protein-tyrosine phosphatase 1C) (PTP-1C) (Hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase) (70Z-SHP) (SH-PTP1) (SHP-1) (PTPY-42)	Signal transduction; Cell communication	Tyrosine phosphatase	Protein tyrosine phosphatase activity
B68	++	gi 6679805 FK506 binding protein 2; FK506 binding protein 2 (13 kDa) [Mus musculus]	FK506-binding protein 2 precursor (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) (PPIase) (Rotamase) (13 kDa FKBP) (FKBP-13)	Signal transduction; Cell communication	Enzyme: Isomerase	Isomerase activity
A21	--	gi 8394460 tropomodulin 3; ubiquitous tropomodulin [Mus musculus]	Ubiquitous tropomodulin	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal associated protein	Cytoskeletal protein binding
B15	++	gi 462608 Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal protein	Structural constituent of cytoskeleton
B56	++	gi 321246 Smooth muscle protein SM22 homolog - mouse (= gi 6755714 transgelin; SM-22 alpha [Mus musculus])	Transgelin (Smooth muscle protein 22-alpha) (SM22-alpha) (Actin-associated protein p27)	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal associated protein	Cytoskeletal protein binding
B07	++	gi 32363497 Ezrin (p81) (Cytovillin) (Villin 2)	Ezrin (p81) (Cytovillin) (Villin 2)	Cell growth and/or maintenance	Anchor protein	Cytoskeletal anchoring activity
B08	++	gi 6677699 radixin [Mus musculus]	Radixin (ESP10)	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal associated protein	Cytoskeletal protein binding
B09	+(+)	gi 18606238 Gelsolin [Mus musculus]	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor) (ADF) (Brevin)	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal protein	Structural constituent of cytoskeleton
B32	++	gi 26333597 unnamed protein product [Mus musculus] (laut BLASTsearch 100% gi 227256 talin)	Talin 1	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal associated protein	Cytoskeletal protein binding

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.1.: Proteinidentitäten und Klassifizierung Milz-Überstand

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
B01	++	<a href="#">gi 33859482</a> eukaryotic translation elongation factor 2 [Mus musculus]	Elongation factor 2 (EF-2)	Protein metabolism	Translation regulatory protein	Translation regulator activity
B02	++	<a href="#">gi 33859482</a> eukaryotic translation elongation factor 2 [Mus musculus]	Elongation factor 2 (EF-2)	Protein metabolism	Translation regulatory protein	Translation regulator activity
A19	+	<a href="#">gi 31982275</a> heat shock protein 4; heat shock 70 kDa protein 4; heat shock protein, 110 kDa [Mus musculus]	Heat shock 70 kDa protein 4 (Heat shock 70-related protein APG-2)	Protein metabolism	Chaperone	Chaperone activity
A24	--	<a href="#">gi 6678097</a> serine (or cysteine) proteinase inhibitor, calde B, member 6a; serine protease inhibitor 3; serine ...	Placental thrombin inhibitor (Protease inhibitor 6) (PI-6)	Protein metabolism	Protease inhibitor	Protease Inhibitor activity
A25	--	<a href="#">gi 6678097</a> serine (or cysteine) proteinase inhibitor, calde B, member 6a; serine protease inhibitor 3; serine ...	Placental thrombin inhibitor (Protease inhibitor 6) (PI-6)	Protein metabolism	Protease inhibitor	Protease Inhibitor activity
A43	--	<a href="#">gi 3914438</a> Proteasome subunit alpha type 3 (Proteasome component C8) (Macropain subunit C8) subunit C8) (Multicatalytic endopeptidase complex subunit C8) (Proteasome subunit K)	Proteasome subunit alpha type 3 (Proteasome component C8) (Macropain subunit C8) (Multicatalytic endopeptidase complex subunit C8) (Proteasome subunit K)	Protein metabolism	Ubiquitin proteasome system protein	Ubiquitin-specific protease activity
A40	--	<a href="#">gi 1698572</a> Proteasome activator PA28 beta subunit	Proteasome activator complex subunit 2 (Proteasome activator 28-beta subunit) (PA28beta) (PA28b) (Activator of multicatalytic protease subunit 2) (11S regulator complex beta subunit) (REG-beta)	Protein metabolism	Ubiquitin proteasome system protein	Ubiquitin-specific protease activity
B12	++	<a href="#">gi 119531</a> Protein disulfide isomerase A4 precursor (Protein Erp-72) (Erp72)	Protein disulfide-isomerase A4 precursor (Protein Erp-72) (Erp72)	Protein metabolism	Chaperone	Chaperone activity

Fortsetzung nächste Seite



Fortsetzung von Tab. C.1: Proteinidentitäten und Klassifizierung Milz-Überstand

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBI/NR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
A56	--	<a href="#">gi 2499469</a> Peroxiredoxin 2 (Thioredoxin peroxidase 1) (Thioredoxin dependent peroxide reductase 1) ...	Peroxiredoxin 2 (Thioredoxin peroxidase 1) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase 1) (Thiol-specific antioxidant protein) (TSA)	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Peroxidase	Peroxidase activity
B31	++	<a href="#">gi 2499469</a> Peroxiredoxin 2 (Thioredoxin peroxidase 1) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase 1) (Thiol-...	Peroxiredoxin 2 (Thioredoxin peroxidase 1) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase 1) (Thiol-specific antioxidant protein) (TSA)	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Peroxidase	Peroxidase activity
A62	++	<a href="#">gi 6754976</a> Peroxiredoxin 1; proliferation-associated gene A; osteoblast specific factor 3; macrophage 23 Kd ...	Peroxiredoxin 1 (Thioredoxin peroxidase 2) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase 2) (Osteoblast specific factor 3) (OSF-3) (Macrophage 23 kDa stress protein)	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Peroxidase	Peroxidase activity
B47	++	<a href="#">gi 12832236</a> unnamed protein product [Mus musculus] -- laut BLAST 99% Übereinstimmung mit <a href="#">gi 1070515</a> carbonate dehydratase (EC 4.2.1.1) II - mouse	Carbonic anhydrase II (Carbonate dehydratase II) (CA-II)	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Carbonic anhydrase	Catalytic activity
B24	++	<a href="#">gi 7304885</a> Annexin A11; annexin XI [Mus musculus]	Annexin A11 (Annexin XI) (Calcyclin-associated annexin 50) (CAP-50)	Immune response	Unclassified	Unknown
A85	++	<a href="#">gi 52120</a> unnamed protein product [Mus musculus] (Fragment oder Isoform von <a href="#">gi 52140</a> immunglobulin kappa light chain [Mus musculus])	Ig kappa chain V-V region MOPC 21 precursor	Immune response	Immunoglobulin	Antigen binding
A07	--	<a href="#">gi 13384620</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.1.: Proteinidentitäten und Klassifizierung Milz-Überstand

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
A73	++	<a href="#">gi 26389256</a> unnamed protein product [Mus musculus] (Fragment von A071)	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
B50	++	<a href="#">gi 4504445</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform a; nuclear ribonucleoprotein particle A1 protein	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (Helix-stabilizing protein) (Single-strand binding protein) (hnRNP core protein A1) (HDP-1) (Topoisomerase-inhibitor suppressed)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	RNA binding protein	RNA binding
B49	++	<a href="#">gi 21071091</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2 / hnRNP B1)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
B51	++	<a href="#">gi 23266713</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1/B0 [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1/B0	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
A33	++	<a href="#">gi 1288430</a> Nucleolin (Protein C23) [muss <a href="#">gi 128843</a> sein!!!]	Nucleolin (Protein C23)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	RNA binding protein	RNA binding
A54	--	<a href="#">gi 3953617</a> SET [Mus musculus]	SET protein (Phosphatase 2A inhibitor I2PP2A) (I-2PP2A) (Template activating factor I) (TAF-1)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	MHC complex protein	MHC class II receptor activity MHC class I receptor activity
A55	+	<a href="#">gi 5803076</a> chromobox homolog 1 (HP1 beta homolog Drosophila); heterochromatin protein p25 beta;	Chromobox protein homolog 1 (Heterochromatin protein 1 homolog beta) (HP1 beta) (Modifier 1 protein) (M31) (Heterochromatin protein p25)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	DNA binding protein	DNA binding

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.1: Proteinidentitäten und Klassifizierung Milz-Überstand

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBI NR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
B65	++	<a href="#">gi 12805429</a> Park7 protein [Mus musculus]	DJ-1 protein	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	RNA binding protein	RNA binding

## C.2 Milz-Rückstandsextrakt

**Tabelle C.2:** Veränderte Spots des Milz-Rückstandsextraktes und Proteinidentitäten nach der Recherche der Massenspektren in der *NCBI nr*-Datenbank. Die Spaltenbezeichnungen und die Sortierung sind Tab. C.1 zu entnehmen, zur Erläuterung der Symbole siehe Tab. B.1.

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBI NR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
B057	--	<a href="#">gi 6996913</a> annexin A2; calpactin I heavy chain; annexin II; lipocortin II; chromobindin 8; 33-kDa calcimedlin; ...	Annexin A2 (Annexin II) (Lipocortin II) (Calpactin I heavy chain) (Chromobindin 8) (p36) (Protein I) (Placental anticoagulant protein IV) (PAP-IV)	Signal transduction; Cell communication	Calcium binding protein	Calcium ion binding
A032	--	<a href="#">gi 91035</a> ribosomal protein RS.40K - mouse	40S ribosomal protein SA (p40) (34/67 kDa laminin receptor)	Signal transduction; Cell communication	Ribosomal subunit	Ribosomal subunit
A037	--	<a href="#">gi 6679299</a> prohibitin [Mus musculus]	Prohibitin (B-cell receptor associated protein 32) (BAP 32)	Signal transduction; Cell communication	Adapter molecule	Receptor signaling complex scaffold activity
A042	--	<a href="#">gi 13386090</a> breast carcinoma amplified sequence 2 [Mus musculus]	Beas2 protein	Signal transduction; Cell communication	Cell cycle control protein	Regulation of cell cycle

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.2: Proteinidentitäten und Klassifizierung Milz-Rückstandsextrakt

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
B050	--	gi 26352474 unnamed protein product [Mus musculus] (= gi 6755224 twinfilin-like protein; protein tyrosine kinase 9 related protein; A6 related protein; PTK9 protein)	A6 related protein (Twinfilin-like protein) (Mus musculus 12 days embryo, spinal ganglion cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D130077D05 product;protein tyrosine kinase 9-like (A6-related protein), full insert sequence) (Actin monomer-binding protein twinfilin-2)	Signal transduction; Cell communication	Tyrosine kinase	Protein-tyrosine kinase activity
B119	+	gi 21312175 malignant T cell amplified sequence 1 [Mus musculus]	Mus musculus adult male cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:1500019M23 product:MULTIPLE COPIES IN A T-CELL MALIGNANCIES (MCT-1 PROTEIN) homolog (Malignant T cell amplified sequence 1) (Mus musculus 2 days neonate thymus thymic cells cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:E430001L06 product:MULTIPLE COPIES IN A T-CELL MALIGNANCIES (MCT-1 PROTEIN) homolog)	Signal transduction; Cell communication	Cell cycle control protein	Regulation of cell cycle
A009	--	gi 6754556 lamin B1 [Mus musculus]	Lamin B1	Cell growth and/or maintenance	Structural protein	Structural molecule activity
B008	--	gi 32363497 Ezrin (p81) (Cytovillin) (Villin 2)	Ezrin (p81) (Cytovillin) (Villin 2)	Cell growth and/or maintenance	Anchor protein	Cytoskeletal anchoring activity
A076	+	gi 18606238 Gelsolin [Mus musculus]	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor) (ADF) (Brevin)	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal protein	Structural constituent of cytoskeleton
A020	---	gi 49868 put. beta-actin (aa 27-375) [Mus musculus] (zweimal erster gi-Hit; aber viele andere Actinformen in nahem Massenbereich → irgendein Actin)	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal protein	Structural constituent of cytoskeleton

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.2: Proteinidentitäten und Klassifizierung Milz-Rückstandsextrakt

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBI/NR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
A021	-- --	gi 49868 put. beta-actin (aa 27-375) [Mus musculus] (zweimal erster gi-Hit; aber viele andere Actinformen in nahem Massenbereich → irgendein Actin)	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal protein	Structural constituent of cytoskeleton
A040	--	gi 49868 put. beta-actin (aa 27-375) [Mus musculus] (viele andere Actinformen in nahem Massenbereich als frühere Hits, aber sehr uneinheitlich → irgendein Actin)	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal protein	Structural constituent of cytoskeleton
A050	--	gi 809561 gamma actin [Mus musculus]	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal protein	Structural constituent of cytoskeleton
A003	--	gi 6753658 dynein, cytoplasmic, intermediate chain 2 [Mus musculus]	Dynein intermediate chain 2, cytosolic (DH IC-2) (Cytoplasmic dynein intermediate chain 2)	Cell growth and/or maintenance	Motor protein	Motor activity
A010	--	gi 31982755 vimentin [Mus musculus]	Vimentin	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal protein	Structural constituent of cytoskeleton
A011	--	gi 31982755 vimentin [Mus musculus]	Vimentin	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal protein	Structural constituent of cytoskeleton
A026	--	gi 6671672 capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2; capping protein alpha 2 [Mus musculus]	F-actin capping protein alpha-2 subunit (CapZ alpha-2)	Cell growth and/or maintenance	Structural protein	Structural molecule activity
A059	+	gi 14625464 stathmin [Mus musculus]	Stathmin (Phosphoprotein p19) (pp19) (Oncoprotein 18) (Op18) (Leukemia-associated phosphoprotein p18) (pp17) (Prosolin) (Metablastin) (Pr22 protein) (Leukemia-associated gene protein)	Cell growth and/or maintenance	Structural protein	Structural molecule activity
A073	++	gi 7106439 tubulin, beta 5 [Mus musculus]	Tubulin beta-5 chain	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal protein	Structural constituent of cytoskeleton
B010	--	gi 21704156 caldesmon 1 [Mus musculus]	Caldesmon 1	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal associated protein	Cytoskeletal protein binding

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.2: Proteinidentitäten und Klassifizierung Milz-Rückstandsextrakt

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
B011	--	<a href="#">gi 21704156</a> caldesmon 1 [Mus musculus]	Caldesmon 1	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal associated protein	Cytoskeletal protein binding
B053	+	<a href="#">gi 21704156</a> caldesmon 1 [Mus musculus]	Caldesmon 1	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal associated protein	Cytoskeletal protein binding
B068	+	<a href="#">gi 21704156</a> caldesmon 1 [Mus musculus]	Caldesmon 1	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal associated protein	Cytoskeletal protein binding
A044	++	<a href="#">gi 20867687</a> nascent polypeptide-associated complex alpha polypeptide [Mus musculus] (Fragment?)	Alpha NAC/1.9.2. protein (Nascent polypeptide-associated complex alpha polypeptide) (Alpha-NAC, non-muscle form)	Protein metabolism	Chaperone	Chaperone activity
B059	++	<a href="#">gi 13278382</a> Eef1a1 protein [Mus musculus]	Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1) (Elongation factor 1 A-1) (eEF1A-1) (Elongation factor Tu) (EF-Tu)	Protein metabolism	Translation regulatory protein	Translation regulator activity
B035	--	<a href="#">gi 6753738</a> eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene X-linked [Mus musculus]	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3, X-linked (Eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit, X-linked) (eIF-2-gamma X)	Protein metabolism	Translation regulatory protein	Translation regulator activity
B132	+(+)	<a href="#">gi 3914438</a> Proteasome subunit alpha type 3 component C8 (Macropain subunit C8) (Multicatalytic endopeptidase complex subunit C8) (Proteasome subunit K)	Proteasome subunit alpha type 3 (Proteasome component C8) (Macropain subunit C8) (Multicatalytic endopeptidase complex subunit C8) (Proteasome subunit K)	Protein metabolism	Ubiquitin proteasome system protein	Ubiquitin-specific protease activity
B110	+	<a href="#">gi 6679497</a> proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 2 [Mus musculus]	Proteasome subunit alpha type 2 (Proteasome component C3) (Macropain subunit C3) (Multicatalytic endopeptidase complex subunit C3)	Protein metabolism	Ubiquitin proteasome system protein	Ubiquitin-specific protease activity
B116	++	<a href="#">gi 673450</a> proteasome subunit MC13 [Mus musculus]	Proteasome subunit beta type 8 precursor (Proteasome component C13) (Macropain subunit C13) (Multicatalytic endopeptidase complex subunit C13)	Protein metabolism	Ubiquitin proteasome system protein	Ubiquitin-specific protease activity

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.2: Proteinidentitäten und Klassifizierung Milz-Rückstandsextrakt

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBI/NR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
B130	++	gi 6755198 proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 6 [Mus musculus]	Proteasome subunit alpha type 6 (Proteasome iota chain) (Macropain iota chain) (Multicatalytic endopeptidase complex iota chain)	Protein metabolism	Ubiquitin proteasome system protein	Ubiquitin-specific protease activity
A027	--	gi 26349519 unnamed protein product [Mus musculus] (laut BLAST nahezu identisch (66% statt 67% Sequenzabdeckung) mit gi 51593758 Eif3s1 protein [Mus musculus])	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1 alpha	Protein metabolism	Translation regulatory protein	Translation regulator activity
A056	--	gi 6679108 nucleophosmin 1; nucleolar protein NO38 [Mus musculus]	Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23) (Numatrin) (Nucleolar protein NO38)	Protein metabolism	Chaperone	Chaperone activity
B100	++	gi 20806109 ADP-ribosyltransferase (NAD+; poly (ADP-ribose) polymerase) 1 [Mus musculus]	Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) (ADPRT) (NAD(+)-ADP-riboseyltransferase-1) (Poly[ADP-ribose] synthetase-1) (msPARP)	Protein metabolism	Enzyme: Ribosyltransferase	Catalytic activity
B048	++	gi 6680618 acetyl-Coenzym A dehydrogenase, medium chain [Mus musculus]	Acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Dehydrogenase	Catalytic activity
A015	-(-)	gi 31980648 ATP synthase, H+ transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit; ATP synthase, H+ transporting ...	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	Metabolism; Energy pathways	Transport/cargo protein	Transporter activity
A012	++	gi 21313536 dihydroliipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex) [Mus musculus]	Dihydroliipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex)	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Acyltransferase	Acyltransferase activity
B031	++	gi 6680027 glutamate dehydrogenase [Mus musculus]	Glutamate dehydrogenase, mitochondrial precursor (GDH)	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Dehydrogenase	Catalytic activity
B043	++	gi 33859554 fumarate hydratase 1 [Mus musculus]	Fumarate hydratase, mitochondrial precursor (Fumarase) (EF-3)	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Hydratase	Catalytic activity

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.2: Proteinidentitäten und Klassifizierung Milz-Rückstandsextrakt

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
B052	+	<a href="#">gi 6680345</a> isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+), gamma [Mus musculus]	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mitochondrial precursor (Isocitric dehydrogenase) (NAD+-specific ICDH)	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Dehydrogenase	Catalytic activity
B137	++	<a href="#">gi 31981458</a> glutaredoxin 1 (thioltransferase); glutaredoxin (thioltransferase) [Mus musculus]	Glutaredoxin (Thioltransferase) (Ttase)	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Oxidoreductase	Oxidoreductase activity
A045	--	<a href="#">gi 26345182</a> unnamed protein product [Mus musculus] (laut BLASTsearch vermutlich <a href="#">gi 6753096</a> apolipoprotein A-I [Mus musculus])	Apolipoprotein A-I precursor (Apo-AI) (ApoA-I)	Transport	Transport/cargo protein	Transporter activity
A002	--	<a href="#">gi 20912071</a> similar to data source:SPTR, source key:O75300, evidence:ISS homolog to ES/130 putative [Mus musculus]	Ribosome-binding protein 1 (Ribosome receptor protein) (mRRp)	Transport	Integral membrane protein	
A031	--	<a href="#">gi 31543752</a> GS32 protein [Mus musculus]	Synaptosomal-associated protein 29 (SNAP-29) (Vesicle-membrane fusion protein SNAP-29) (Soluble 29 kDa NSF attachment protein) (Golgi SNARE of 32 kDa) (Gs32)	Transport	Membrane transport protein	Auxiliary transport protein activity
A055	++	<a href="#">gi 26389256</a> unnamed protein product [Mus musculus] (Fragment von <a href="#">gi 13384620</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K [Mus musculus])	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
B067	++	<a href="#">gi 4504445</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform a; nuclear ribonucleoprotein particle A1 protein; ...	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (Helix-stabilizing protein) (Single-strand binding protein) (hnRNP core protein A1) (HDP-1) (Topoisomerase-inhibitor suppressed)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	RNA binding protein	RNA binding

Fortsetzung nächste Seite



Fortsetzung von Tab. C.2: Proteinidentitäten und Klassifizierung Milz-Rückstandsextrakt

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
B104	++	<a href="#">gi 4504445</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform a; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B2 protein; nuclear ribonucleoprotein particle A1 protein; helix-stabilizing protein; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein core protein A1; single-strand DNA-binding protein UPI; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1B protein [Homo sapiens]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (Helix-stabilizing protein) (Single-strand binding protein) (hnRNP core protein A1) (HDP-1) (Topoisomerase-inhibitor suppressed)	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	RNA binding protein	RNA binding
B111	++	<a href="#">gi 4504445</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform a; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B2 protein; nuclear ribonucleoprotein particle A1 protein; helix-stabilizing protein; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein core protein A1; single-strand DNA-binding protein UPI; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1B protein [Homo sapiens]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (Helix-stabilizing protein) (Single-strand binding protein) (hnRNP core protein A1) (HDP-1) (Topoisomerase-inhibitor suppressed)	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	RNA binding protein	RNA binding
B077	++	<a href="#">gi 21071091</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 2 [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2 / hnRNP B1)	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
B109	+(+)	<a href="#">gi 32880197</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 2 [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2 / hnRNP B1)	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.2: Proteinidentitäten und Klassifizierung Milz-Rückstandsextrakt

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
B115	++	gi 23266713 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1/B0 [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1/B0	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
B098	++	gi 23266713 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1/B0 [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1/B0	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
B105	++	gi 23266713 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1/B0 [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1/B0	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
B085	++	gi 31559916 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform b [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 (hnRNP A3)	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
B108	++	gi 31559916 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform b; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 (hnRNP A3)	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
B016	--	gi 21313308 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (hnRNP M)	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
B073	++	gi 6671602 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D; AU-rich element RNA-binding protein 1 [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (hnRNP D0) (AU-rich element RNA-binding protein 1)	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.2: Proteinidentitäten und Klassifizierung Milz-Rückstandsextrakt

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
B054	++	<a href="#">gi 29145079</a> Hnrpd protein [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (hnRNP D0) (AU-rich element RNA-binding protein 1)	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
B055	++	<a href="#">gi 29145079</a> Hnrpd protein [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (hnRNP D0) (AU-rich element RNA-binding protein 1)	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
B005	++	<a href="#">gi 10442545</a> PTB-associated splicing factor [Mus musculus]	PTB-associated splicing factor	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	RNA binding protein	RNA binding
A051	--	<a href="#">gi 6680860</a> chromobox homolog 3 (Drosophila HPI gamma); heterochromatin protein 1 gamma [Mus musculus]	Chromobox protein homolog 3 (Heterochromatin protein 1 homolog gamma) (HP1 gamma) (Modifier 2 protein) (M32)	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	DNA binding protein	DNA binding
A052	--	<a href="#">gi 6680860</a> chromobox homolog 3 (Drosophila HPI gamma); heterochromatin protein 1 gamma [Mus musculus]	Chromobox protein homolog 3 (Heterochromatin protein 1 homolog gamma) (HP1 gamma) (Modifier 2 protein) (M32)	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	DNA binding protein	DNA binding
B014	++	<a href="#">gi 6576815</a> SYNCRIP [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q (hnRNP Q) (hnRNP-Q) (Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein) (Glycine-and tyrosine-rich RNA binding protein) (GRY-RBP) (NS1-associated protein 1) (pp68)	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	RNA binding protein	RNA binding
B020	--	<a href="#">gi 418112</a> DNA topoisomerase I	DNA topoisomerase I	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	Enzyme: Topoisomerase	DNA Topoisomerase activity

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.2: Proteinidentitäten und Klassifizierung Milz-Rückstandsextrakt

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
B025	--	<a href="#">gi 38571767</a> Ddx5 protein [Mus musculus]	Probable RNA-dependent helicase p68 (DEAD-box protein p68) (DEAD-box protein 5) (DEAD-box RNA helicase DEAD1) (mDEAD1)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	RNA binding protein	RNA binding
B029	++	<a href="#">gi 129535</a> Polyadenylate-binding protein 1 (Poly(A)-binding protein 1) (PABP 1)	Polyadenylate-binding protein 1 (Poly(A)-binding protein 1) (PABP 1)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	RNA binding protein	RNA binding
B033	++	<a href="#">gi 24659630</a> Tcerg1 protein [Mus musculus]	Transcription elongation regulator 1 (TATA box-binding protein-associated factor 2S) (Transcription factor CA150) (p144) (Formin-binding protein 28) (FBP 28)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	Transcription factor	Transcription factor activity
B065	++	<a href="#">gi 31542602</a> ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R); HU-antigen A [Mus musculus]	ELAV-like protein 1 (Hu-antigen R) (HuR) (Elav-like generic protein) (Me(G)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	RNA binding protein	RNA binding
B066	++	<a href="#">gi 31542602</a> ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R); HU-antigen A [Mus musculus]	ELAV-like protein 1 (Hu-antigen R) (HuR) (Elav-like generic protein) (Me(G)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	RNA binding protein	RNA binding
B082	++	<a href="#">gi 31982373</a> fibrillarin [Mus musculus]	Fibrillarin (Nucleolar protein 1)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
B090	++	<a href="#">gi 31982373</a> fibrillarin [Mus musculus]	Fibrillarin (Nucleolar protein 1)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.2: Proteinidentitäten und Klassifizierung Milz-Rückstandsextrakt

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
B131	++	<a href="#">gi 90626</a> histone H4 (clone 53) – mouse	Histone H4	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	DNA binding protein	DNA binding
B107	++	<a href="#">gi 19911240</a> polypyrimidine tract binding protein [Mus musculus] (geachtet der Position im Gel und aufgrund der ESI- und MALDI-Daten liegt vermutlich ein Fragment hiervon (unwahrscheinlicher eine Isoform) vor)	Polypyrimidine tract binding protein			
B062	+	<a href="#">gi 16716499</a> sideroflexin 3 [Mus musculus]	Sideroflexin 3			
A034	--	<a href="#">gi 18655521</a> Chain L, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of The Mouse Anti- Human Fas Antibody Hfe7a				
A035	++	<a href="#">gi 18655521</a> Chain L, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of The Mouse Anti- Human Fas Antibody Hfe7a				
A036	--	<a href="#">gi 18655521</a> Chain L, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of The Mouse Anti- Human Fas Antibody Hfe7a				
B003	--	<a href="#">gi 37514837</a> Snd1-pending protein [Mus musculus]				
B024	--	<a href="#">gi 2832298</a> pleiotropic regulator 1 [Mus musculus]	Pleiotropic regulator 1			
B070	--	<a href="#">gi 23956266</a> DnaJ homolog, subfamily C, member 9 [Mus musculus]	DnaJ homolog subfamily C member 9			
B092	++	<a href="#">gi 460317</a> chaperonin				

### C.3 Milz-Rückstandssuspension

**Tabelle C.3:** Veränderte Spots der Milz-Rückstandssuspension und Proteinidentitäten nach der Recherche der Massenspektren in der *NCBI*-Datenbank. Die Spaltenbezeichnungen und die Sortierung sind Tab. C.1 zu entnehmen, zur Erläuterung der Symbole siehe Tab. B.1.

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBI NR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
A02	--	<a href="#">gi 18606238</a> Gelsolin [Mus musculus]	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor) (ADF) (Brevin)	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal protein	Structural constituent of cytoskeleton
B05	-(-)	<a href="#">gi 27370092</a> Tu elongation factor, mitochondrial [Mus musculus]	Tu protein	Protein metabolism	Translation regulatory protein	Translation regulator activity
A23	+(+)	<a href="#">gi 7305417</a> proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 10; proteasome (prosome, macropain) subunit ...	Proteasome subunit beta type 10 precursor (Proteasome MECL-1) (Macropain subunit MECL-1) (Multicatalytic endopeptidase complex subunit MECL-1)	Protein metabolism	Ubiquitin proteasome system protein	Ubiquitin-specific protease activity
B28	++	<a href="#">gi 32130449</a> 60S ribosomal protein L12	60S ribosomal protein L12	Protein metabolism	Ribosomal subunit	Ribosomal subunit
A25	++	<a href="#">gi 6753324</a> chaperonin subunit 6a (zeta); chaperonin containing TCP-1 [Mus musculus]	T-complex protein 1, zeta subunit (TCP-1-zeta) (CCT-zeta) (CCT-zeta-1)	Protein metabolism	Chaperone	Chaperone activity
A09	--	<a href="#">gi 7305565</a> t-complex protein 1 [Mus musculus]	T-complex protein 1, alpha subunit A (TCP-1-alpha) (CCT-alpha) (Tailless complex polypeptide 1A) (TCP-1-A)	Protein metabolism	Chaperone	Chaperone activity
B06	--	<a href="#">gi 22267442</a> ubiquinol cytochrome c reductase core protein 2; RIKubiquinol cytochrome c reductase core protein 2 [Mus musculus]	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2, mitochondrial precursor (Complex III subunit II)	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Reductase	Catalytic activity
A34	++	<a href="#">gi 6753914</a> ferritin light chain 1 [Mus musculus]	Ferritin light chain 1 (Ferritin L subunit 1)	Transport	Storage protein	Storage protein
B11	--	<a href="#">gi 7949053</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 1 [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2 / hnRNP B1)	Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.3: Proteinidentitäten und Klassifizierung Milz-<sup>o</sup>Rückstandssuspension

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBI/NR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
B12	--	<a href="#">gi 7949053</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 1 [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2 / hnRNP B1)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
B21	++	<a href="#">gi 7949053</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 1 [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2 / hnRNP B1)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
B26	++	<a href="#">gi 7949053</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 1 [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2 / hnRNP B1)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
B10	--	<a href="#">gi 31559916</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform b; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 (hnRNP A3)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
A51	+(+)	<a href="#">gi 6753178</a> barrier to autointegration factor 1; breakpoint cluster region protein 1 [Mus musculus]	Barrier-to-autointegration factor (Breakpoint cluster region protein 1) (LAP2-binding protein 1)	Biological process unknown	DNA binding protein	DNA binding

## C.4 Gehirn-Gesamtextrakt

**Tabelle C.4:** Veränderte Spots des Gehirns und Proteinidentitäten nach der Recherche der Massenspektren in der *NCBI/tr*-Datenbank. Die Spaltenbezeichnungen und die Sortierung sind Tab. C.1 zu entnehmen, zur Erläuterung der Symbole siehe Tab. B.1.

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
A009	-- (-)	<a href="#">gi 487851</a> dynamin	Dynamin-1	Signal transduction; Cell communication	GTPase	GTPase activity
A021	--	<a href="#">gi 40254595</a> dihydropyrimidinase-like 2; collapsin response mediator protein 2 [Mus musculus]	Dihydropyrimidinase-like 2	Signal transduction; Cell communication	Cytoskeletal associated protein	Cytoskeletal protein binding
A030	++	<a href="#">gi 40254595</a> dihydropyrimidinase-like 2; collapsin response mediator protein 2 [Mus musculus]	Dihydropyrimidinase-like 2	Signal transduction; Cell communication	Cytoskeletal associated protein	Cytoskeletal protein binding
A103	++	<a href="#">gi 6753060</a> annexin A5; annexin V [Mus musculus]	Annexin A5 (Annexin V) (Lipocortin V) (Endonexin II) (Calphobindin I) (GBP-I) (Placental anticoagulant protein I) (PAP-I) (PP4) (Thromboplastin inhibitor) (Vascular anticoagulant-alpha) (VAC- alpha) (Anchorin CII)	Signal transduction; Cell communication	Calcium binding protein	Calcium ion binding
A110	+	<a href="#">gi 33416530</a> Annexin A4 [Mus musculus]	Annexin A4 (Annexin IV)	Signal transduction; Cell communication	Calcium binding protein	Calcium ion binding
A100	+	<a href="#">gi 12963597</a> eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein) [Mus musculus]	Elongation factor 1-delta (EF-1- delta)	Signal transduction; Cell communication	Guanine nucleotide exchange factor	Guanyl-nucleotide exchange factor activity
A102	+	<a href="#">gi 15341784</a> Eef1d protein [Mus musculus]	Elongation factor 1-delta (EF-1- delta)	Signal transduction; Cell communication	Guanine nucleotide exchange factor	Guanyl-nucleotide exchange factor activity
A121	+	<a href="#">gi 7106301</a> microtubule- associated protein, RP/EB family, member 1; adenomatosis polyposis coli binding protein	APC-binding protein EB1 homolog (Microtubule- associated protein, RP/EB family, member 1)	Signal transduction; Cell communication	Cell cycle control protein	Regulation of cell cycle

Fortsetzung nächste Seite



Fortsetzung von Tab. C.4: Proteinidentitäten und Klassifizierung Gehirn

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
A124	-	gi 13591860 TOLLIP protein [Mus musculus]	Toll-interacting protein	Signal transduction; Cell communication	Adapter molecule	Receptor signaling complex scaffold activity
A203	++	gi 21426847 phosphoprotein enriched in astrocytes 15; mammary transforming gene 1 [Mus musculus]	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	Signal transduction; Cell communication	Transport/cargo protein	Transporter activity
B006	-	gi 7305533 synapsin I	Synapsin-1 (Synapsin I)	Signal transduction; Cell communication	Unclassified	Unknown
B013	--	gi 8567410 synapsin II [Mus musculus]	Synapsin-2 [Fragment] (Synapsin II)	Signal transduction; Cell communication	Unclassified	Unknown
B015	-	gi 8567410 synapsin II [Mus musculus]	Synapsin-2 [Fragment] (Synapsin II)	Signal transduction; Cell communication	Unclassified	Unknown
B043	--	gi 9789726 Septin 7 (CDC10 protein homolog)	Septin 7 (CDC10 protein homolog)	Signal transduction; Cell communication	Cell cycle control protein	Regulation of cell cycle
A047	++	gi 14193690 glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP)	Cell growth and/or maintenance	Structural protein	Structural molecule activity
A048	+++	gi 14193690 glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP)	Cell growth and/or maintenance	Structural protein	Structural molecule activity
A049	+++	gi 14193690 glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP)	Cell growth and/or maintenance	Structural protein	Structural molecule activity
A050	++	gi 14193690 glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP)	Cell growth and/or maintenance	Structural protein	Structural molecule activity
A052	+++	gi 14193690 glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP)	Cell growth and/or maintenance	Structural protein	Structural molecule activity
A054	+	gi 14193690 glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP)	Cell growth and/or maintenance	Structural protein	Structural molecule activity
A055	+	gi 14193690 glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP)	Cell growth and/or maintenance	Structural protein	Structural molecule activity
A066	+++	gi 14193690 glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP)	Cell growth and/or maintenance	Structural protein	Structural molecule activity
A067	+++	gi 14193690 glial fibrillary acidic protein [Mus musculus]	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP)	Cell growth and/or maintenance	Structural protein	Structural molecule activity

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.4: Proteinidentitäten und Klassifizierung Gehirn

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
A111	+++	gi 319914	glial fibrillary acidic protein, astrocyte - mouse	Cell growth and/or maintenance	Structural protein	Structural molecule activity
A051	+++	gi 319914	glial fibrillary acidic protein, astrocyte - mouse	Cell growth and/or maintenance	Structural protein	Structural molecule activity
A043	+	gi 23956222	ARP3 actin-related protein 3 homolog; actin-related protein 3 homolog (yeast) [Mus musculus]	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal protein	Structural constituent of cytoskeleton
A074	+	gi 23396882	Neuronal tropomodulin (N-Tmod) (Tropomodulin 2)	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal associated protein	Cytoskeletal protein binding
A076	++	gi 21312564	calponin 3, acidic [Mus musculus]	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal associated protein	Cytoskeletal protein binding
A078	+	gi 20178271	Tropomyosin 1 alpha chain (Alpha-tropomyosin)	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal associated protein	Cytoskeletal protein binding
A131	+	Eine Tropomyosin-Isoform (identifiziert: gi 111212 tropomyosin 5 - mouse (2x) und gi 20178271 Tropomyosin 1 alpha chain (Alpha-tropomyosin) und gi 227136 nonmuscle tropomyosin	Tropomyosin 5 und Tropomyosin 1 alpha chain (Alpha-tropomyosin) und ?	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal associated protein	Cytoskeletal protein binding
A133	+	Eine Tropomyosin-Isoform (identifiziert: gi 17105362 tropomyosin 3, gamma [Rattus norvegicus] und gi 111212 tropomyosin 5 - mouse	Tropomyosin alpha 3 chain (Tropomyosin 3) (Tropomyosin gamma) und Tropomyosin 5	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal associated protein	Cytoskeletal protein binding
B011	++	gi 462608	Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal protein	Structural constituent of cytoskeleton
B012	++	gi 462608	Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	Cell growth and/or maintenance	Cytoskeletal protein	Structural constituent of cytoskeleton
A008	--	gi 40254361	osmotic stress protein; osmotic stress protein 94 kDa [Mus musculus]	Protein metabolism	Heat shock protein	Heat shock protein activity

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.4: Proteinidentitäten und Klassifizierung Gehirn

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBI/NR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
A014	++	gi 109893 dhak-type molecular chaperone grp78 precursor – mouse	78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP 78) (Immunoglobulin heavy chain binding protein) (BiP)	Protein metabolism	Chaperone	Chaperone activity
B040	+	gi 1169475 Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1)	Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1) (Elongation factor 1 A-1) (eEFLA-1) (Elongation factor Tu) (EF-Tu)	Protein metabolism	Translation regulatory protein	Translation regulator activity
B050	++	gi 27370092 RIKEN cDNA 2300002G02 [Mus musculus]	Tufln protein	Protein metabolism	Translation regulatory protein	Translation regulator activity
B092	+	gi 6753530 crystallin, alpha B; crystallin, alpha 2; alpha B-crystallin [Mus musculus] (bei Claus identifiziert)	Alpha crystallin B chain (Alpha(B)-crystallin) (P23)	Protein metabolism	Heat shock protein	Heat shock protein activity
B094	++	gi 6753530 crystallin, alpha B; crystallin, alpha 2; alpha B-crystallin [Mus musculus]	Alpha crystallin B chain (Alpha(B)-crystallin) (P23)	Protein metabolism	Heat shock protein	Heat shock protein activity
B109	++	gi 31981822 cystatin C; cystatin 3 [Mus musculus]	Cystatin C precursor (Cystatin 3)	Protein metabolism	Protease inhibitor	Protease Inhibitor activity
B110	++	gi 31981822 cystatin C; cystatin 3 [Mus musculus]	Cystatin C precursor (Cystatin 3)	Protein metabolism	Protease inhibitor	Protease Inhibitor activity
B112	++	gi 40807498 heat-responsive protein 12 [Mus musculus]	Ribonuclease UK114 (Heat-responsive protein 12)	Protein metabolism	Translation regulatory protein	Translation regulator activity
A108	++	gi 10946574 creatine kinase, brain [Mus musculus]	Creatine kinase, B chain (B-CK)	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Phosphotransferase	Catalytic activity
A092	++	gi 7304887 annexin A3; annexin III [Mus musculus]	Annexin A3 (Annexin III) (Lipocortin III) (Placental anticoagulant protein III) (PAP-III) (35-alpha calcimedlin)	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Hydrolase	Hydrolase activity
A163	++	gi 6671549 peroxiredoxin 6; acidic calcium-independent phospholipase A2; peroxiredoxin 5; 1-Cys Prx; anti-oxid	Peroxiredoxin 6 (Antioxidant protein 2) (1-Cys peroxiredoxin) (1-Cys PRX) (Acidic calcium-independent phospholipase A2) (EC.3.1.1.-) (aiPLA2) (Non-selenium glutathione peroxidase) (EC.1.1.1.7) (NSGPx)	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Peroxidase	Peroxidase activity

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.4: Proteinidentitäten und Klassifizierung Gehirn

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBINR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
A214	--	<a href="#">gi 6753960</a> guanine deaminase [Mus musculus]	Guanine deaminase (Guanase) (Guanine aminase) (Guanine aminohydrolase) (GAH)	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Deaminase	Deaminase activity
B039	++	<a href="#">gi 6671519</a> adenylosuccinate synthetase 1; adenylosuccinate synthetase 1, muscle [Mus musculus]	Adenylosuccinate synthetase isozyme 1 (Adenylosuccinate synthetase, muscle isozyme) (IMP-aspartate ligase 1) (AdSS 1) (AMPSase 1)	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Synthetase	Catalytic activity
B045	++	<a href="#">gi 21704100</a> hydroxyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzym	Trifunctional enzyme beta subunit, mitochondrial precursor (TP-beta) [includes 3-ketoacyl-CoA thiolase (Acetyl-CoA acyltransferase) (Beta-ketothiolase)]	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Dehydrogenase	Catalytic activity
B055	++	<a href="#">gi 22267442</a> RIKubiquinol cytochrome c reductase core protein 2 [Mus musculus]	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2, mitochondrial precursor (Complex III subunit II)	Metabolism; Energy pathways	Enzyme: Reductase	Catalytic activity
B077	++	<a href="#">gi 6754856</a> nitrilase 1 [Mus musculus]	Nitrilase homolog 1	Metabolism; Energy pathways	Unclassified	Unknown
A016	-	<a href="#">gi 20892559</a> ATPase, H+ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump), alpha 70 kDa, isoform 1 [Mus musculus]	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A, ubiquitous isoform (V-ATPase A subunit 1) (Vacuolar proton pump alpha subunit 1) (V-ATPase 69 kDa subunit 1)	Metabolism; Energy pathways	Transport/cargo protein	Transporter activity
A127	++	<a href="#">gi 192005</a> apolipoprotein E	Apolipoprotein E precursor (Apo-E)	Transport	Transport/cargo protein	Transporter activity
A138	+	<a href="#">gi 15617203</a> chloride intracellular channel 1 [Mus musculus]	Chloride intracellular channel protein 1 (Nuclear chloride ion channel 27) (NCC27) (p64 CLCP)	Transport	Intracellular ligand gated channel	Intracellular ligand-gated ion channel activity
A190	--	<a href="#">gi 5729783</a> complexin 2; synaphin 1 [Homo sapiens]	Complexin 2 (Synaphin 1) (921-L)	Transport	Transport/cargo protein	Transporter activity
B063	--	<a href="#">gi 8393646</a> potassium voltage gated channel, shaker related subfamily, beta member 2 [Rattus norvegicus]	Voltage-gated potassium channel beta-2 subunit (K(+) channel beta-2 subunit (Kv-beta-2) (Neuroimmune protein F5)	Transport	Voltage gated channel	Voltage-gated ion channel activity

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tab. C.4: Proteinidentitäten und Klassifizierung Gehirn

SPOT	VER.	PROTEINIDENTITÄT (NCBI/NR)	PROTEINIDENTITÄT (UNIPROT MIT SYNONYMEN)	BIOLOGICAL PROCESS (HPRD)	MOLECULAR CLASS (HPRD)	MOLECULAR FUNCTION (HPRD)
A022	+(+)	<a href="#">gi 14165437</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K isoform a; dC-stretch binding protein; transformation upr	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
A023	++	<a href="#">gi 13384620</a> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K [Mus musculus]	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
A037	+(+)	<a href="#">gi 6677681</a> retinoblastoma binding protein 4 [Mus musculus]	Chromatin assembly factor 1 subunit C (CAF-1 subunit C) (Chromatin assembly factor 1 p48 subunit) (CAF-1 48 kDa subunit) (CAF-1p48 Retinoblastoma binding protein p48) (Retinoblastoma-binding protein 4) (RBBP-4)	Regulation of nucleobase, nucleotide and nucleic acid metabolism	Transcription regulatory protein	Transcription regulator activity
B090	+	<a href="#">gi 30519911</a> transgelin 2 [Mus musculus]	Transgelin-2	Biological process unknown	Unclassified	Unknown
B036	--	<a href="#">gi 38328220</a> Unknown (protein for MGC:70304) [Mus musculus]	Septin 11			
B069	-	<a href="#">gi 6754690</a> monoglyceride lipase; EST AA589436 [Mus musculus]	Monoglyceride lipase			
B073	+	<a href="#">gi 6005854</a> repressor of estrogen receptor activity; B-cell associated protein [Homo sapiens]				
B086	-	<a href="#">gi 12084691</a> Chain A, Crystal Structure Of Murine Arl3-Gdp				



# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Michael Baier für die Überlassung des Themas sowie Laborkapazität für den infektiösen Teil der Versuche und Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Joachim Klose für die Betreuung meiner Arbeit, die Erlaubnis der 2-DE-Versuchsdurchführung in seinem Labor und die gute Zusammenarbeit. Prof. Dr. Carsten Niemitz danke ich herzlich für seine Bereitschaft, die Zweitgutachterschaft zu übernehmen.

Zu großem Dank bin ich Frau Sibyll Lichy verpflichtet, welche die Infektion und Diagnose meiner Versuchstiere übernommen hat, sowie Frau Karin Krohn, deren Immunoblots ich freundlicherweise verwenden durfte.

Marion Herrmann danke ich ganz besonders für die kompetente Einführung in die 2-DE, ihre Hilfestellung bei Problemen und ihre unermüdliche Sorge für stets gefüllte Chemikalien- und sonstige Bestände.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich Grit Nebrich, Maik Wacker (in stillem Gedenken) und Silke Becker für die vielen MS-Identifizierungen aussprechen, ihre stete Antwortbereitschaft bei Fragen zu den Ergebnissen und ihre unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Auch Yvonne Kläre danke ich ganz besonders, denn ihre saubere Arbeit bei der Vielzahl an Gellösungsansätzen hat ganz entscheidend zu guten Gelen beigetragen.

Allen anderen Kollegen in den Laboren danke ich für das gute Arbeitsklima, ihre aufmunternden Worte, die Hilfe bei Kleinigkeiten und bei weniger kleinen Dingen.

Meiner Chefin, PD Dr. L. Wickert, danke ich herzlich für die Ermunterung und Hilfestellung am Ende der Arbeit.

Meinen Eltern sowie meinen zahl- aber nicht namenlosen Freunden danke ich für seelischen und sonstigen Beistand. Jeder einzelne von Euch weiß, wofür.

Ein anders gearteter Dank gilt der großen Linux- und OpenSource-Gemeinde, die so fleißig frei und kostenlos verfügbare Software programmiert, mit deren Hilfe diese Arbeit fast ausschließlich erstellt wurde.